

Progetto di ricerca

Emendamento n°1 del 05/05/2012

La LDL-afèresi nel trattamento del piede diabetico ischemico

Studio clinico **randomizzato, multicentrico, prospettico**, per verificare l'effetto del trattamento con LDL-afèresi in aggiunta alla terapia tradizionale sulla guarigione delle ulcere in pazienti con piede diabetico ischemico e vasculopatia periferica non rivascolarizzabile

Coordinatore scientifico e responsabile dello studio: Dott.ssa Maria Grazia Zenti

Divisione di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Verona

e-mail: mariagrazia.zenti@ospedaleuniverona.it

Personale impegnato nella ricerca:

Prof. Riccardo Bonadonna, Dott. Vincenzo Stoico, Dott. Giovanni Targher, Dott.ssa Laura Salvotelli, Dott.ssa Giulia Fainelli, Dott.ssa Federica Zardi, Sig.ra Antonella Tacconi, Sig.ra Monica Zardini, Sig.ra Federica Moschetta, Dott. Michele Messa.

Obiettivi del progetto

Verificare l'effetto del trattamento aferetico in aggiunta alla terapia tradizionale sulla guarigione delle ulcere in pazienti con piede diabetico ischemico e vasculopatia periferica non rivascolarizzabile

Background

Il Piede Diabetico è una comune, severa e costosa complicanza del diabete. Viene definito dalla presenza di una ulcerazione o da distruzione dei tessuti profondi che si associa ad anomalie neurologiche e a vari gradi di vasculopatia periferica. Nei casi

più gravi tali lesioni evolvono in maniera da richiedere amputazioni, talora estese, che determinano disabilità permanente. Il piede diabetico rappresenta la prima causa di amputazione non traumatica degli arti ed è un frequente motivo di ricovero in ospedale per il paziente diabetico. I dati di economia sanitaria dimostrano che la cura del piede rappresenta una delle maggiori voci di spesa per il trattamento del diabete e che la cura del piede diabetico è particolarmente onerosa nei pazienti con severa vasculopatia e alterazioni del microcircolo.

Note epidemiologiche:

I dati epidemiologici documentano che circa il 15% dei diabetici nell'arco della loro vita presentano una lesione al piede (1). Il range di incidenza annuale è variabile tra lo 0,3 e il 7,1 % con una prevalenza tra l'1 e il 10% (2-4). Nella realtà italiana lo Studio DAI, multicentrico di coorte, su 2788 soggetti affetti da diabete di tipo 2 alla visita di arruolamento ha rilevato una prevalenza dell'1% di amputazioni (5).

Patogenesi:

La vasculopatia periferica predispone alla comparsa dell'ulcera. I pazienti con neuropatia possono presentare una vasculopatia asintomatica essendo la claudicatio nel diabetico spesso inesistente o mascherata da parestesie e dolori neuropatici. Nel Diabetico l'arteriopatia presenta una maggiore aggressività rispetto al paziente vasculopatico non diabetico. L'arteriopatia occlusiva periferica del diabetico è più frequente, più precoce, è prevalentemente distale con diffuse lesioni calcifiche e prevalenza di occlusioni rispetto alle stenosi. L'ischemia critica si associa ad alterazioni del microcircolo caratterizzate da disfunzione endoteliale, alterata emoreologia con attivazione dei leucociti e dell'infiammazione (6). In questo contesto l'iperlipidemia, specialmente quando caratterizzata da aumentati livelli di LDL-colesterolo, e gli aumentati livelli di fibrinogeno giocano un ruolo patogenetico.

Trattamento:

Il trattamento del piede diabetico prevede una gestione globale e coordinata della lesione cutanea (*wound bed preparation*: sbrigliamento, gestione dell'essudato e dell'infezione, stimolazione della granulazione e della riepitelizzazione) finalizzata a rimuovere barriere locali alla guarigione. Tra le tecniche innovative va segnalata la terapia a pressione negativa (*vacuum assisted closure*), che attraverso la creazione di una pressione negativa sulla ferita, si è rivelato un trattamento in grado di accelerare il processo di guarigione. Anche l'utilizzo di innesti di colture cellulari può aumentare la percentuale di guarigione e ridurre i tempi di riparazione delle ulcere

dorsali. Tra le misure terapeutiche va annoverata anche l'ossigeno terapia iperbarica sistemica per il trattamento delle ulcere ischemiche

LDL-aferesi nel trattamento delle alterazioni del microcircolo del paziente vasculopatico

Negli ultimi anni numerose evidenze hanno documentato che il **trattamento con LDL-aferesi**, oltre alla riduzione del colesterolo, determina anche una serie di effetti pleiotropici (riduzione di sostanze pro-trombotiche e pro-infiammatorie, modificazioni reologiche, miglioramento della funzione endoteliale), che promuovono la funzione del microcircolo con aumento della perfusione dei tessuti periferici oltre che del microcircolo coronarico (8-15).

Sulla base di questi presupposti alcuni Trials Clinici hanno valutato il ruolo della procedura di LDL-aferesi in pazienti con severa vasculopatia nell'ipotesi che il miglioramento dell'emoreologia possa portare anche ad un miglioramento dei sintomi clinici (16-29). In pazienti con piede diabetico ischemico il trattamento aferetico si è associato ad un netto miglioramento clinico (delimitazione dei processi necrotici evitando amputazioni maggiori) favorendo la completa guarigione delle ulcere nella maggior parte dei pazienti trattati. Anche in pazienti diabetici emodializzati la terapia aferetica si è associato ad un miglioramento dei parametri di funzione endoteliale e di attivazione piastrinica (30-34).

Questi studi suggeriscono la possibilità di considerare la LDL-aferesi come un valido approccio terapeutico nei pazienti con piede diabetico ischemico refrattario alle comuni manovre di rivascularizzazione.

PROTOCOLLO DI STUDIO

Si tratta di uno studio clinico **randomizzato, multicentrico, prospettico**, non in cieco, con valutazione degli esiti dell'intervento da parte dei singoli Centri partecipanti. I pazienti eleggibili saranno randomizzati (1:1) a ricevere il trattamento medico tradizionale in associazione al trattamento aferetico (gruppo A) o esclusivamente il trattamento tradizionale (gruppo B).

End-point primario: proporzione di soggetti che ottengono la guarigione delle ulcere (classe 0A secondo la classificazione TEXAS) a 12 mesi dall'inizio dello studio.

End-point secondari:

- proporzione di pazienti sottoposti ad amputazioni minori/disarticolazione (qualsiasi resezione distale o resezione a livello mediotarsale)
- proporzione di pazienti sottoposti ad amputazioni maggiori (qualsiasi resezione prossimale al livello mediotarsale: TF = transfemorale, al di sopra del ginocchio; KD= disarticolazione al ginocchio, attraverso il ginocchio; TT= transtibiale, sotto il ginocchio; AD=disarticolazione della caviglia)
- Miglioramento dell'ossigenazione periferica valutata mediante ossimetria transcutanea a livello dei piedi: TcP O₂ (mmHg).
- Valutazione della variazione dell' Intensità del dolore (scala numerica verbale; score da 1 a 10)
- Abbattimento dei marcatori circolanti di flogosi (PCR, Fibrinogeno). Concentrazione plasmatiche di PCR (mg/L) e di fibrinogeno (g/L) valutate all'inizio dello studio e dopo 3-6 - 9 e 12 mesi.
- Tasso di eventi cardiovascolari nel periodo di osservazione (follow-up di un anno).

Criteri di inclusione: Pazienti diabetici, maschi e femmine, età ≤ 80 anni, con ulcera diabetica ischemica (classe I-II-III Texas wound classification System) e documentata vasculopatia (angiografia, angio-RMN, angio-TAC), con almeno un pregresso fallimento di rivascolarizzazione (mancata guarigione dell'ulcera).

Criteri di esclusione: BMI > 35 kg/m². Pazienti con diatesi emorragica, neoplasie maligne, insufficienza cardiaca tale da non tollerare la tecnica extracorporea. Pazienti Emodializzati.

Lo studio prevede una visita di arruolamento, la successiva randomizzazione al trattamento tradizionale associato a terapia aferetica (gruppo A) o al solo trattamento tradizionale (gruppo B), e follow-up a 3, 6, 9 e 12 mesi, nel corso dei quali verrà confrontata l'efficacia dei due interventi sulla guarigione delle ulcere nel piede diabetico

Randomizzazione

Il disegno dello studio prevede una randomizzazione stratificata per gravità della lesione (3 strati: classe TEXAS I vs II vs III) a blocchi di ampiezza 6 e 4 (allocazione 1:1). Le liste di randomizzazione (una per ciascuna classe Texas: I - II - III) saranno generate tramite il software statistico stata 11. Tali liste di randomizzazione verranno gestite dal centro coordinatore. Quando un paziente soddisfa i criteri di eleggibilità allo studio, sarà contattato telefonicamente il centro coordinatore che provvederà a comunicare l'allocazione del paziente secondo la classe Texas dell'ulcera.

Trattamento

Tutti i pazienti riceveranno il trattamento tradizionale per la correzione delle ulcere (sia gruppo A che gruppo B)

Medicazione Standardizzata:

Tutte le lesioni considerate andranno medicate in modo standardizzato, con approccio diverso secondo la possibilità che sia o meno presente infezione.

Lesione NON INFETTA: ogni 4-5 giorni

- disinfezione dei margini e del fondo della lesione con Dermacyn soluzione (se non disponibile il Dermacyn, utilizzare Betadine liquido avendo cura di sciacquare la lesione con soluzione fisiologica sterile dopo la disinfezione);
- rimozione con tagliente delle componenti non vitali (margini callosi, detriti del fondo della lesione) fino ad ottenere un fondo e dei margini detersi
- applicazione sulla ferita di garza di Connettivina (in alternativa Fitostimoline) se ferita superficiale, di idroalginato (SilverCel) o idrofibra (AquaCel Ag) ricoperti con garza di Connettivina se ferita profonda.
- Copertura del tutto con garza sterile.
- Adozione di presidio di scarico non fisso (calzatura temporanea Tera Diab, Stabil D, Optima; in caso di lesioni achillee si impone l'adozione di presidio di immobilizzazione di caviglia, quale la valva gessata rimovibile)

Lesione INFETTA: a di alterni

- disinfezione dei margini e del fondo della lesione con Dermacyn soluzione (se non disponibile il Dermacyn, utilizzare Betadine liquido);
- rimozione con tagliente delle componenti non vitali (margini callosi, detriti del

fondo della lesione) fino ad ottenere un fondo e dei margini detersi

- applicazione sulla ferita di garza imbevuta di Dermacyn o Betadine liquido.
- Adozione di presidio di scarico non fisso (calzatura temporanea Tera Diab, Stabil D, Optima; in caso di lesioni achillee si impone l'adozione di presidio di immobilizzazione di caviglia, quale la valva gessata rimovibile)

L'evoluzione delle lesioni potrà essere documentata mediante mappatura delle stesse disegnandone i profili su pellicola Opsite.

Terapia antibiotica mirata (secondo antibiogramma)

Terapia antiaggregante (ASA + ticlopidina)

Terapia con statine

I pazienti del gruppo A verranno sottoposti, in aggiunta al trattamento standardizzato delle lesioni, ad un ciclo di LDL-afèresi

La LDL afèresi, verrà eseguita con **Sistema H.E.L.P.** della B.Braun Avitum (7). Tale metodica aferetica ha in scheda tecnica l'indicazione al trattamento di patologie caratterizzate da alterazioni del microcircolo (come la microangiopatia diabetica).

L'acronimo H.E.L.P. sta per Heparin-induced Extracorporeal Low-density lipoprotein Precipitation. La tecnica opera incrementando il numero di cariche positive sulle LDL e sulla Lp(a) ad un basso pH (5.12), consentendo alle stesse particelle di formare un aggregato con eparina e fibrinogeno in assenza di ioni bivalenti. Nel primo passaggio, il plasma è separato dalla componente cellulare del sangue tramite un plasmafiltro. Al plasma viene quindi addizionato continuativamente un tampone acetato a pH 4,85, contenente 100 UI di eparina per millilitro. Ad un pH di 5,12 si realizza un'immediata precipitazione degli aggregati che sono poi rimossi da un filtro in policarbonato. L'eccesso di eparina è successivamente completamente assorbito attraverso un passaggio in una colonna a scambio anionico che ad un dato pH lega soltanto l'eparina. Infine, la miscela di plasma e tampone è sottoposta ad una bicarbonato-dialisi e ad un'ultrafiltrazione per rimuovere l'eccesso di fluidi e ripristinare un fisiologico pH, prima che il plasma si rimescoli con la componente cellulare e venga restituito al paziente.

Durante ogni seduta di aferesi sarà trattato un **volume di plasma**, calcolato secondo la seguente formula: $PV=0,069 * \text{peso corporeo} * (1-Htc)$.

Schema di trattamento aferetico: esecuzione di 10 sedute aferetiche, le prime 2 a distanza di 3 giorni (2 sedute in una settimana), successivamente a cadenza settimanale (ogni 7 giorni)

L'accesso vascolare per l'esecuzione della procedura sarà attuato attraverso la puntura di vene superficiali dell'avambraccio, mediante aghi 17 G o in alternativa CVC a due vie.

Valutazioni ematochimiche:

Gruppo A: Al basale, e al termine delle sedute aferetiche numero 2 e 10 saranno prelevati campioni ematici per la determinazione dei seguenti parametri: emocromo, fibrinogeno, colesterolo totale, col-HDL, col-LDL, trigliceridi, Lp(a), proteina C reattiva, PTX3.

Nel gruppo B, gli stessi parametri saranno valutati con la stessa cadenza temporale, al basale, dopo 1 settimana e alla nona settimana.

Per entrambi i gruppi di pazienti, le identiche valutazioni proseguiranno, effettuandosi alla 12° settimana (3 mesi), 24° settimana (6 mesi), 36 settimane (9 mesi) e a 48 settimane (12 mesi,) quando il trattamento consisterà nella sola terapia farmacologica per tutti i soggetti arruolati.

In tutti i pazienti verranno inoltre valutati (al basale e dopo 3-6-9-12 mesi) parametri di compenso glicemico: glicemia, insulina, emoglobina glicata, microalbuminuria/creatininuria.

I valori degli esami di laboratorio ottenuti a fine aferesi saranno normalizzati per l'eventuale emodiluizione secondo la formula: $F_{dil} = (1 - Htc_{pre-aferesi}) / (1 - Htc_{post-aferesi})$. $X_{corretto} = X_{misurato} * F_{dil}$.

Valutazioni strumentali

Valutazione dell'ulcera: superficie (diametri), stadiazione secondo Texas Wound classification System al basale, alla nona settimana, a 3-6-9-12 mesi di follow-up (mappatura delle lesioni disegnandone i profili su pellicola Opsite, foto digitale).

La valutazione dell'evoluzione dell'ulcera verrà effettuata da "valutatore in cieco", che valuterà i pazienti senza conoscere a quale braccio di trattamento sono stati

assegnati, al basale, dopo 9 settimane e a 3-6-9-12 mesi di follow-up. Ogni centro identificherà il proprio “valutatore in cieco”

Flussimetria doppler: basale, alla nona settimana (alla fine delle 10 sedute di aferesi) e nel successivo follow-up a 6 e 12 mesi.

Ossimetria transcutanea: : basale, alla quarta settimana (che coincide con la 5° seduta aferetica) alla nona settimana (alla fine delle 10 sedute aferetiche) e nel successivo follow-up a 3-6-9-12 mesi

Rivalutazione della vasculopatia a 12 mesi (angiografia, angioRMN, angioTAC)

Questionario sulla qualità di vita (SF36): basale, alla nona settimana (alla fine delle 10 sedute aferetiche) e nel successivo follow-up a 6 e 12 mesi.

Scala intensità del dolore (Scala Numerica verbale) basale, alla nona settimana (alla fine delle 10 sedute aferetiche) e nel successivo follow-up a 3-6-9-12 mesi

Nell’eventualità che le lesioni più gravi presentino una evoluzione tale da richiedere una **amputazione**, tale procedura dovrà essere eseguita in modo che la parte residua permetta di portare il peso e che possa consentire se necessario, l’uso di una protesi, ortesi, o calzature speciali. **Secondo il “Documento di Consenso Internazionale sul Piede Diabetico. Terza edizione italiana-2010:**

Amputazioni minori (transmetatarsali o amputazioni distali)

Le amputazioni minori possono essere utilizzate per rimuovere la gangrena, dopo la rivascolarizzazione per ischemia, come parte del debridement di infezione al piede, o per la correzione di deformità del piede che verosimilmente possono provocare le ulcere. L’amputazione per gangrena da demarcazione spontanea (auto-amputazione) spesso richiede diversi mesi, con un costante rischio di infezione invasiva della zona di delimitazione. L’opinione degli esperti è favorevole alla resezione chirurgica della gangrena ogni volta che un’articolazione o un tendine sono coinvolti, a condizione che l’apporto arterioso sia sufficiente per la guarigione .

Amputazioni maggiori (qualsiasi resezione prossimale a livello del metatarso)

La grave ischemia della gamba che non può essere rivascolarizzata è il principale motivo di amputazione della parte inferiore della gamba.

Va sottolineato che una mancata guarigione dell’ulcera non è una indicazione per un’amputazione maggiore. L’amputazione maggiore è indicata per il trattamento di progressiva necrosi ischemica o di grave dolore a riposo, che non possono essere trattati con rivascolarizzazione, controllati con farmaci o risolti con un’amputazione minore.

Rischi e benefici:

Reazioni avverse al trattamento aferetico: Vengono segnalate come reazioni avverse in corso di trattamento aferetico l'ipotensione (secondaria sia all'ipovolemia sia a reazione vasovagale). Più raramente sono stati descritti episodi di angina, emolisi e reazioni allergiche. Dopo il trattamento si possono verificare sanguinamenti dalla sede di prelievo/infusione, e reazioni vaso-vagali

I benefici attesi sono rappresentati dal miglioramento della funzione del microcircolo periferico con scomparsa del dolore ischemico e una maggiore possibilità di ottenere la guarigione dell'ulcera

Durata dello studio

La durata dell'**arruolamento** nello studio sarà di **12 mesi**. Per ogni paziente arruolato la durata complessiva tra intervento e follow-up sarà di **12 mesi**. Per i pazienti del gruppo B le prime nove settimane saranno destinate alla terapia aferetica

Dimensione del campione

La stima delle dimensioni del campione si basa sull'ipotesi della guarigione dell'ulcera con la strategia aferetica secondo alcuni studi pilota riportati in letteratura (16,19,22).

Per il calcolo delle dimensioni del campione è stato considerato quanto segue:

- incidenza di guarigione dell'ulcera con terapia tradizionale : 5%
- potenza statistica 80% (alfa a due code =0.05)
- miglioramento atteso dell'evento guarigione con la procedura aferetica: 25%

Secondo quanto sopra esposto, è sufficiente reclutare un campione di 114 soggetti (57 soggetti per braccio) per individuare le differenze sopra ipotizzate dopo 12 mesi utilizzando il log-rank test. Ipotizzando un drop-out del 10% sarebbe necessario reclutare 128 pazienti. Tuttavia per garantire la stratificazione comprendente 3 categorie di gravità della lesione (classe TEXAS I-II-III) dovranno essere reclutati 132 pazienti (66 pazienti per braccio).

Analisi Statistica

L'end-point principale sarà analizzato mediante la metodica di Kaplan Meier e la significatività valutata tramite il log-rank test.

Per quello che riguarda gli end-points secondari, le variabili continue saranno analizzate usando medie e deviazioni standard. Le variabili categoriche saranno espresse come frequenze assolute e percentuali. Le caratteristiche basali dei pazienti saranno confrontate mediante l'analisi della varianza (ANOVA) e il test t di Student per dati non appaiati e test del Chi quadro per le variabili categoriche.

Saranno inoltre applicate analisi multivariate, utilizzando il modello di Cox, per valutare l'influenza dei diversi parametri sull'esito dell'ulcera.

I dati verranno raccolti in un unico centro (Verona) dove si procederà all'elaborazione statistica

Elenco dei Centri Partecipanti

Abano Terme (Dott. Brocco Enrico, Centro del piede diabetico)

Bari (Dott. Ramunni Alfonso, Nefrologia Dialisi)

Legnago (Dott. Loschiavo Carmelo, Nefrologia Dialisi)

Mantova (Dott. Tarchini Renzo, Dott.ssa Brescia Paola; Nefrologia Dialisi;)

Reggio Emilia (Dott. Russi Gianpaolo, Servizio Immuno-trasfusionale; Dott.ssa Manicardi Enrica, Medicina II)

Trieste (Prof. Cattin Luigi, III Medica)

Verona (Dott.ssa Zenti Maria Grazia, Endocrinologia e Malattie del Metabolismo; Dott. Messa Michele, Nefrologia Dialisi)

BIBLIOGRAFIA

1. Reiber GE. The epidemiology of diabetic foot problems. *Diabet Med* 1996; 13 (suppl.1): S6-11
2. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 2005; 366:1719-24
3. Boulton AJ. The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24(suppl.1):S3-6
4. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes: *JAMA* 2005;12:293: 217-28
5. Lombardo F, Spila Alegiani S, Maggini M, Raschetti R, Avogaro A, Ferranini E et al. Prevalenza e incidenza delle complicanze del diabete: studio DAI: Istituto superiore di Sanità 2007 (Rapporti ISTISAN 07/225)
6. Poredos P, Zizek B. Plasma viscosity increase with progression of peripheral arterial atherosclerotic disease. *Angiology* 1996;47:253-259.
7. Susca M. Heparin-Induced extracorporeal low-density lipoprotein precipitation futura, a new modification of HELP apheresis: technique and first clinical results. *Ther Apher*. 2001 Oct;5(5):387-93.
8. Ebihara I. et al. Blood Flow Analysis of the Head and Lower Limbs by the Laser Doppler Blood Flowmeter During LDL Apheresis. *Ther Apher Dial* 2007; 11(5):325–330.
9. Schuff-Werner, Schultz E, Seyde WC, et al. Improved hemorheology 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;19:30-37.
10. Kobayashi S, Moriva H, Maesato K, et al. LDL-apheresis improves peripheral arterial occlusive disease with an implication for anti-inflammatory effects. *J Clin Apher* 2005;20(4):239-243
11. Lechner H. et al. The impact of H.E.L.P. on haemorheology in peripheral arterial disease. *Clin Hemorheol* 1994; 14:181-188.

12. Kizaki Y, Ueki Y, Yoshida K, et al. Does the production of nitric oxide contribute to the early improvement after a single low-density lipoprotein apheresis in patients with peripheral arterial obstructive disease? *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:341-9.
13. Kobayashi S, Moriya H, Negishi K, et al. LDL-apheresis up-regulates VEGF and IGF-I in patients with ischemic limb. *J Clin Apher* 2003; 18: 115-9.
14. Ferrero S. VEGF levels in patients with peripheral arterial occlusive disease receiving LDL-apheresis. *J Clin Apher* 2004;19:160.
15. Utsumi K, Kawabe M, Hirama A, 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;377:198-200.
16. Iizuka T, et al. Clinical trial of low density lipoprotein-Apheresis for treatment of diabetic gangrene. *Internal Medicine*, 1997;36(12):898-902.
17. Suzuki T. et al. Efficacy of Low-Density Lipoprotein Apheresis in Arteriosclerosis Obliterans of the Lower Extremities: Two Cases With Marked Alleviation of Clinical Symptoms. *J Clin Apher* 22:287–291 (2007).
18. Kamimura M, et al. Improvements in artery occlusion by low-density lipoprotein apheresis in a patient with peripheral arterial disease. *Ther Apher* 2002,6(6):467-470.
19. Klingel R. Rheopheresis in patients with ischemic diabetic foot syndrome: results of an open label prospective pilot trial. *Ther Apher Dial* 2003; 7: 444-55
20. Klingel R, Erdtracht B, Gauss V, et al. Rheopheresis in patients with critical limb ischemia – results of an open label prospective pilot trial. *Ther Apher Dial* 2005;9(6):473-481.
21. Tsuchida H, et al. Effect of low-density lipoprotein apheresis on patients with peripheral arterial disease. *Peripheral Arterial Disease LDL Apheresis Multicenter Study (P-LAS)*. *Internal Angiology*, 2006,25(3):287-292.
22. Rietzsch H, et al. Heparin-induced Extracorporeal LDL precipitation (HELP) in Diabetic foot Syndrome – Preventive and Regenerative potential? *Horm Metab Res* 2008; 40:487-490

23. Kroon AA, van Asten WN, Stalenhoef AF. Effect of apheresis of low density lipoprotein on peripheral vascular disease in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ann Intern Med* 1996;125:945-954.
24. Richter WO, Jahn P, Jung N, et al. Fibrinogen adsorption in the diabetic foot syndrome and peripheral arterial occlusive disease: first clinical experiences. *Ther Apher* 2001;5(5):335-339.
25. Blessing et al. Heparin-mediated extracorporeal LDL precipitation treating a peripheral arterial disease patient suffering from repeated postoperative bypass occlusion. *Thrombosis Research*, vol. 115, Issue 1-2, 2005, 39-43
26. Agishi T, Naganuma S, Nakasato S et al. Treatment of arteriosclerotic obstruction by LDL adsorption. *Angiology* 1993;44:222-227.
27. Walzl M, Lechner P, Walzl B, et al. First experiences with the heparin induced extracorporeal low-density lipoprotein precipitation in the treatment of critical limb ischaemia: a new therapeutical approach? *Haemostasis* 1993;23:237-43.
28. Smilde TJ et al. The effect of cholesterol lowering on carotid and femoral artery wall stiffness and thickness in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2000; 30 (6): 473-480.
29. Weiss N. Lipid apheresis and rheopheresis for treatment of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis Supplements* 10 (2009) 62-69.
30. Morimoto S, Yano Y, Maki K, et al. Efficacy of low-density lipoprotein apheresis in patients with peripheral arterial occlusive disease undergoing hemodialysis treatment. *Am J Nephrol* 2007; 27:643-8.
31. Nakamura T, Matsuda T, Suzuki Y, et al. Effects of low-density lipoprotein apheresis on plasma matrix metalloproteinase-9 and serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in diabetic hemodialysis patients with arteriosclerosis obliterans. *Asaio J* 2003; 49: 430-4.
32. Nakamura T, Ushiyama C, Osada S, et al. Effect of low-density lipoprotein apheresis on plasma endothelin-1 levels in diabetic hemodialysis patients with arteriosclerosis obliterans. *J Diabetes Complications* 2003;17:349-54.
33. Ferrannini M, Vischini G, Staffolani E, et al. Rheopheresis in vascular diseases. *Int J Artif Organs* 2007;30:923-9.

34. Ramunni A, Brescia P, Quaranta D, Plantamura M, Ria R, Coratelli P. Fibrinogen apheresis in the treatment of peripheral arterial diseases. *Blood Purif* 2007;25(5-6):404-10.