

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Vliv Calculus Bovis na krevní lipidy a expresi endoteliální NO syntázy
u apoE-deficientního myšího modelu aterosklerózy.**

Hradec Králové, 2008

Mgr. Romana Studená

„Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Datum: 30. 8. 2008

podpis rigorozanta

Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D., za odborné vedení rigorózní práce, poskytování rad a materiálových podkladů k práci, dále Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc., a celé katedře biologických a lékařských věd za umožnění vykonávání experimentální části na této katedře.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| ABSTRAKT..... | 5 |
| Seznam použitých zkratk..... | 7 |
| 1. ÚVOD..... | 9 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 2.1. ATEROSKLERÓZA..... | 10 |
| 2.1.1. Patofyziologie aterogenních změn ve stěně cév..... | 12 |
| 2.1.2. Teorie vzniku aterosklerózy..... | 18 |
| 2.1.3. Rizikové faktory aterosklerózy..... | 20 |
| 2.2. ENDOTEL A JEHO FYZIOLOGICKÉ FUNKCE..... | 27 |
| 2.2.1. Regulace permeability..... | 27 |
| 2.2.2. Regulace cévního tonu..... | 28 |
| 2.2.3. Zajištění integrity cévního řečiště..... | 31 |
| 2.2.4. Regulace remodelačních a reparačních procesů..... | 32 |
| 2.3. CALCULUS BOVIS (NIUHUANG, BEZOAR BOVIS)..... | 33 |
| 3. CÍL PRÁCE..... | 34 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 35 |
| 4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA..... | 35 |
| 4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA..... | 35 |
| 4.3. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ..... | 36 |
| 4.4. IMUNOHISTOCHEMIE..... | 36 |
| 4.5. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ..... | 38 |
| 4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA..... | 38 |
| 5. VÝSLEDKY..... | 39 |
| 5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA..... | 39 |
| 5.2. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ..... | 40 |
| 5.3. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ eNOS V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU..... | 42 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.4. | STEREOLOGICKÁ ANALÝZA HISTOLOGICKÉHO BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ..... | 44 |
| 5.5. | STEREOLOGICKÁ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ eNOS | 45 |
| 6. | DISKUSE..... | 46 |
| 7. | ZÁVĚR..... | 49 |
| 8. | LITERATURA..... | 50 |

ABSTRAKT

Calculus Bovis (Niuhuang) představuje substanci používanou v tradiční čínské medicíně přes 2 tisíce let. Jedná se v podstatě o drcené sušené hovězí žlučové kameny společně s některými žlučovými kyselinami a bilirubinem.

Tato rigorózní práce se zabývala vlivem Calculus Bovis na parametry lipidového spektra a aterogenezi ve stěně cévy u apoE-deficientních myší.

ApoE-deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení standardní dietou po dobu 2 týdnů. Ve věku 8 týdnů jim začala být podávána aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21% tuku (11% nasycených mastných kyselin) a 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů (kontrolní skupina). V Calculus Bovis skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 50 mg/kg b.wt. Calculus Bovis (Artificial bezoar, Biopharma, Australia) denně. Byla provedena biochemická analýza lipidního spektra, a dále provedena imunohistochemická a stereologická analýza exprese endoteliální NO syntázy (eNOS).

Podávání Calculus Bovis však nevedlo k ovlivnění parametrů lipidového spektra reprezentovaného celkovým cholesterolem, VLDL, LDL, HDL a TAG. Podávání Calculus Bovis nevedlo ani k ovlivnění velikosti plátů, vyjádřeno plochou barvení olejovou červení. Podávání Calculus Bovis také nevedlo k ovlivnění endoteliální exprese eNOS ve stěně cévy. Tento neúspěch podávání Calculus Bovis může pravděpodobně souviset s tím, že šlo o pilotní projekt a zvolená dávka bude pravděpodobně velmi nízká.

ABSTRACT

Calculus Bovis is one of the most precious and commonly-used medicinal materials in China. It consists predominantly bilirubin and bile acids. In this thesis we focused on possible effects of Calculus Bovis on lipids and atherogenesis in apoE-deficient mice.

ApoE-deficient mice were fed standard diet for 2 weeks. At the age of 8 weeks the control group of animals were fed with the western type diet, which contained 21% fat and 0,15% cholesterol for 8 weeks. The same atherogenic diet was used in Calculus Bovis group, where Calculus Bovis was added to the atherogenic diet at the dosage of 50 mg/kg b.wt. Calculus Bovis (Artificial bezoar, Biopharma, Australia) per day. The biochemical analysis of lipid spectrum was done, area of atherosclerotic lesions was determined and immunohistochemical and stereological analysis of eNOS expression was performed as well.

Calculus bovis treatment did not affect blood lipids, total cholesterol, VLDL, LDL, HDL and TAG when compared with control mice. Moreover Calculus bovis treatment did not decrease either atherosclerotic plaque area or endothelial expression of eNOS.

The failure of Calculus Bovis treatment in this pilot study could be probably related to insufficient dose of Calculus Bovis.

Seznam použitých zkratek

| | |
|-----------------|---|
| ACE | angiotenzin konvertující enzym |
| ACH | acetylcholin |
| ADP | adenosindifosfát |
| AP-1 | transkripční faktor |
| apoE | apolipoprotein E |
| bFGF | basic fibroblast growth factor, základní fibroblastový růstový faktor |
| BH ₄ | tetrahydrobiopterin |
| CAM | cell adhesion molecules, buněčné adhezivní molekuly |
| cGMP | cyklický guanosinmonofosfát |
| CMP | cévní mozková příhoda |
| CMV | cytomegalovirus |
| CRP | C – reaktivní protein |
| DAB | diaminobenzidin |
| EBV | virus Epsteinova a Barrové |
| EDGF | endothelium-derived growth factor, růstový faktor produkovaný endotelem |
| EDHF | endothelium-derived hyperpolarizing factor |
| eNOS | endoteliální NO syntáza |
| Hb | hemoglobin |
| HDL | high density lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě |
| ICAM-1 | intercellular cell adhesion molekule-1, adhezní molekula |
| IDL | intermediate density lipoproteins, lipoproteiny o střední hustotě |
| IGF-1 | inzulinu podobný růstový faktor |
| ICHS | ischemická choroba srdeční |
| IL-1, 6, 8 | interleukin- 1, 6, 8 |
| iNOS | indukovatelná forma NOS |
| INF γ | interferon γ |
| Lp (a) | lipoprotein (a) |
| LDL | low density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě |
| LPS | lipopolysacharidy |
| MCP-1 | monocytární chemotaktický protein-1 |

| | |
|------------------------|--|
| M-CSF | macrophage colony stimulating factor, růstový hormon pro makrofágy |
| MDGF | monocyte-derived growth factor, růstový faktor monocytů |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfát |
| NF- κ B | nukleární faktor kappa B |
| nNOS | nervová NOS |
| NO | oxid dusnatý |
| NOS | NO syntéza |
| OTC | tissue freezing medium (zmrazovací směs) |
| OxLDL | oxidované LDL částice |
| PAF | faktor agregace destiček |
| PAI-1 | inhibitor aktivátoru plazminogenu |
| PBS | phosphate buffered saline (fosfátový pufr – PH 7,4) |
| PDGF | platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor |
| PECAM-1 | platelet endothelial cell adhesion molecule-1, adhezní molekula |
| PGI ₂ | prostacyklin |
| ROS | reactive oxygen species |
| SAA | sérový amyloid A |
| TAG | triacylglyceroly |
| TGF α , β | transforming growth factor α , β , transformující růstový faktor α , β |
| TNF α | tumor necrosis factor α , tkáňový nekrotizující faktor α |
| t-PA | tkáňový aktivátor plazminogenu |
| VCAM-1 | vascular cell adhesion molecule-1, adhezní molekula |
| VLDL | very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě |

1. ÚVOD

Ateroskleróza je vlastně nejznámější skleróza vůbec. Nejčastější příčinou úmrtí ve většině civilizovaných zemí je právě toto onemocnění, způsobené pomalým, mnoho let postupujícím, „zacpáváním“ cév. Nánosy v cévách zapříčiňuje tuhnutí cévní stěny. Důsledkem této skutečnosti se prokrvení cílového orgánu stává nedostačujícím. Takto stupňující se tuhnutí stěny cévní nabývá na vážnosti se zvyšujícím se věkem. Faktickou příčinou aterosklerózy je ukládání tukových látek, v prvé řadě cholesterolu, jež mění strukturu i funkčnost cévní stěny.

Termín arterioskleróza byl poprvé použit v roce 1829 k popisu kalcifikací ve stěně arterií. Pojem ateroskleróza pak byl použit v roce 1904 k popisu lipidových depozit v arteriosklerotické arterii. Objev vztahu mezi klinickými symptomy infarktu myokardu, aterosklerózou a trombózou koronárních arterií učinil v roce 1912 James Herrick.

Zvýšené riziko pro rozvoj aterosklerózy představují především nevhodná životospráva a životní styl (kouří téměř polovina populace v ČR; žen (49 %), mužů jen pak o něco méně (46 %); zvýšenou hladinu cholesterolu má 70 % populace; vyšší tlak téměř čtvrtina (24 % mužů, 19 % žen); kvůli nedostatku pohybových aktivit se potýká s obezitou 30 % žen a 20 % mužů. Dalšími rizikovými faktory, zvyšující pravděpodobnost výskytu aterosklerózy jsou pak hypertenze a diabetes mellitus (20 % všech nemocných aterosklerózou trpí tímto onemocněním). Nesmíme opomenout ani genetickou predispozici, která zde rovněž hraje podstatnou roli [1].

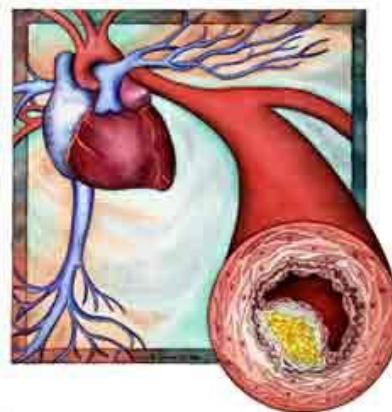
Současná data Světové zdravotnické organizace ukazují, že kardiovaskulární onemocnění jsou zodpovědná asi za 30 % celkové mortality na světě.

V Evropské unii zemře na jedno z kardiovaskulárních onemocnění 42 % obyvatel, v České republice je toto číslo ještě vyšší – více než 50 %. V podstatě lze říci, že každých 9 minut zemře jeden Čech na onemocnění srdce a cév (178 osob denně, 65 000 ročně). Postižení věnčitých tepen aterosklerózou a z toho vznikající komplikace tak stále zůstávají na prvním místě jako příčina smrti u mužů starších 45 let a žen nad 65 let. Náklady na léčbu a další péči o nemocné s kardiovaskulárními chorobami jsou přitom v Evropské unii odhadovány na 169 miliard eur za kalendářní rok.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je dlouhodobě probíhající onemocnění cévní stěny, jejíž struktura je alterována tvorbou ateromu. Onemocnění se klinicky manifestuje podle toho, která část řečiště je postižena: při zúžení koronárních tepen vzniká ischemická choroba srdeční (IČS), projevující se arytmiemi, anginou pectoris, infarktem myokardu, selháváním srdce nebo náhlou smrtí; zúžení až



uzávěr karotid a mozkových tepen může vyústit v cévní mozkovou příhodu (CMP). Při makroangiopatii tepen dolních končetin se postupně rozvíjí intermitentní klaudikace a diabetická noha. Vzácně se objevuje stenóza arterie renální, která vede k renální hypertenzi, nebo stenóza *a. mesenterica*, způsobující abdominální anginu až ischemickou nekrózu střeva [2].

Aterosklerózu lze definovat jako chronické zánětlivé onemocnění cévní intimy, provázené akumulací cholesterolu, fibrózní tkáně, některých dalších komponent krve (monocyty, makrofágy, pěnové buňky, T lymfocyty) a změnami v medii cévní stěny. Dochází k postupnému zužování lumen cévy, zhoršení krevního průtoku a zhoršení zásobování kyslíkem a živinami, oslabení pružnosti cévní stěny a její snadnější lomivosti, usnadnění shlukování faktorů krevního srážení a tím i náchylnosti vzniku trombů (viz obr. 1). Etiopatogeneze aterosklerózy je komplexní (multifaktoriální). Vzniká jako specifická reakce na nespecifické poškození cévní stěny. Neznáme sice jednoznačnou příčinu jejího vzniku, známe ale řadu faktorů, které se na jejím vzniku podílejí a které nazýváme rizikovými faktory [3].

Obr. 1: Růst ateromového plátu

(http://www.msdi.cz/content/patients/diseases/kardiovaskularni_onemocneni.html)



Nejčastějšími lokalizacemi plaků jsou břišní aorta, koronární tepny (zejména *ramus interventricularis posterior* a *ramus diagonalis*), *aa. popliteae*, vzestupná hrudní aorta, *aa. carotis internae* a *circulus arteriosus cerebri* (seřazeno podle četnosti). Periferní řečiště je nejvíce postižováno na místech s velkými mechanickými nároky (místa větvení).

Aterosklerózu identifikujeme na základě těchto vyšetření:

Nejčastěji se užívá **zátěžového testu**. Je-li dodávka krve do srdečního svalu nedostatečná, pak se na elektrokardiogramu objeví typické změny, třebaže se člověk sám může cítit bez závažnějších problémů.

Druhým vyšetřením, které pomáhá odhalovat aterosklerózu koronárních tepen, je **koronární angiografie**. Při tomto vyšetření se do koronárních tepen vstříkne kontrastní látka, která pak umožní zobrazit průtok krve touto oblastí za pomoci rentgenových paprsků. Lékař tak může odhalit zúžené místo, jímž krev s kontrastní látkou protéká pomaleji, obtížněji, nebo dokonce vůbec.



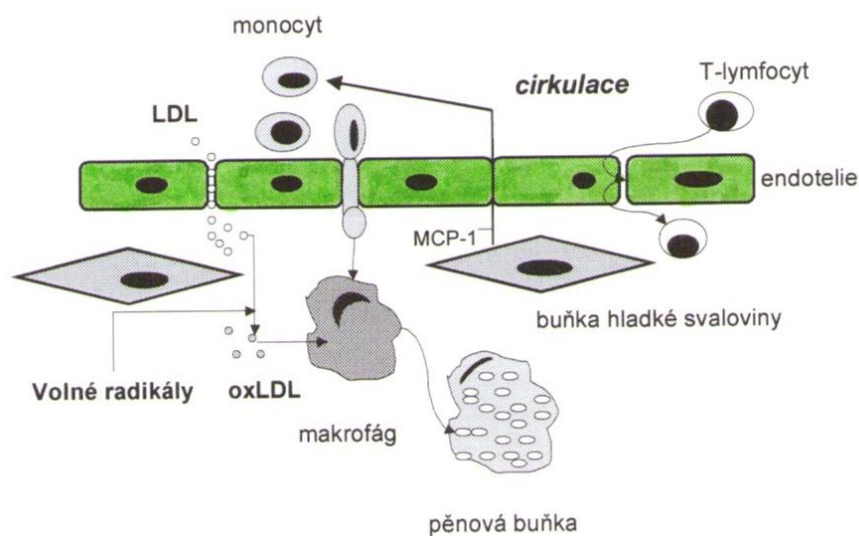
Další vyšetření, tzv. **thaliová scintigrafie** za užití thalia (Tl^{201}), kombinuje zátěžový test s dvojrozměrným zobrazením [4].

2.1.1. Patofyziologie aterogenních změn ve stěně cév

Jak již bylo zmíněno, endoteliální dysfunkce je spouštěcím faktorem v iniciaci aterogenního procesu, podílí se na vývoji jak časných tak i pozdních fází aterosklerózy. Vlivem dysfunkce endotelu a působení aterogenních faktorů dochází ke zvýšené kumulaci LDL v intimě cév. LDL-částice, které mohou být modifikovány oxidací, glykací (u diabetu), agregací, asociací s proteoglykany nebo inkorporací do imunních komplexů, jsou hlavní příčinou poškození stěny arterií. Když LDL částice proniknou do subendotelového prostoru intimy, podléhají zde progresivní lipoperoxidaci a jsou fagocytovány makrofágy. Modifikované LDL částice mají chemotaktický účinek na další monocyty, podporují expresi genů pro faktor stimulující kolonie makrofágů (MCSF) a pro monocytní chemotaktický protein (MCP-1) z endotelií a participují na zvýšené endoteliální expresi P-selektinu, VCAM-1 a ICAM-1. Všechny tyto faktory aktivují cirkulující monocyty a T lymfocyty, které začnou na svém povrchu exprimovat ve větším množství sacharidové (lektínové) receptory, pro chemotaktické faktory a integriny [3]. Tyto děje vedou pak k prostupu monocytů a T-lymfocytů do intimy cév. Výše popsané jednotlivé kroky jsou znázorněny na obr. 2.

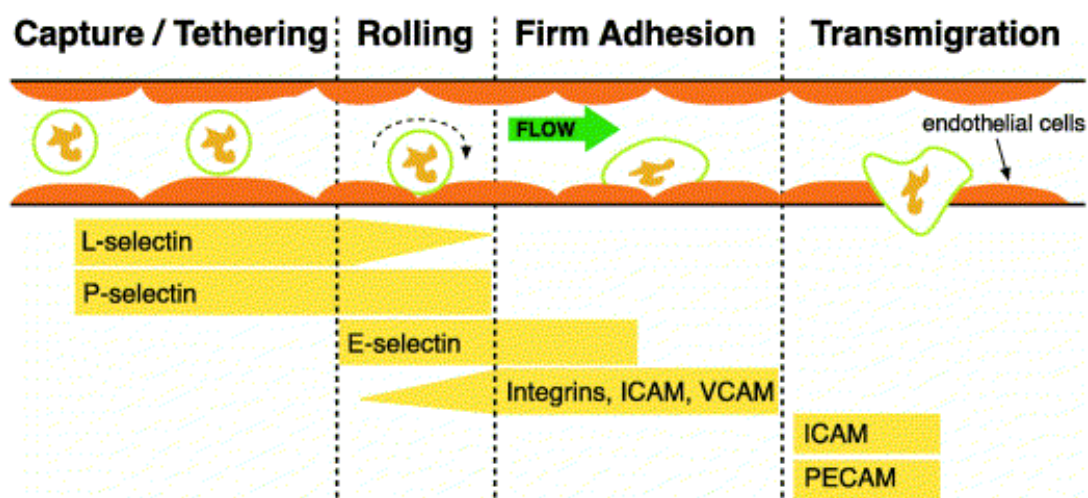
Obr. 2: Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu

(https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_1426.html)



Prostup leukocytů do subendoteliálních prostor má 4 fáze (viz obr. 3). V první a druhé fázi se zpomalí pohyb leukocytů a dojde k jejich „kutálení po endotelu“. Třetí fáze je charakterizována vytvořením pevných vazeb mezi leukocyty a endoteliálními buňkami. Tyto vazby jsou zprostředkovány zejména interakcí mezi adhezivními molekulami VCAM-1 a ICAM-1 a $\alpha 4\beta 1$, $\alpha L\beta 2$ integriny. V poslední fázi dochází k transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostorů. Na tomto kroku se podílí chemotaktické faktory, ty však musí být v subendoteliálních prostorech přítomné ve větším množství než v krvi, aby se vytvořil dostatečný chemotaktický gradient. Velice důležitá pro proces transmigrace je adhezivní molekula PECAM-1, která se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk, na tomto kroku se podílí homofilní interakcí mezi PECAM-1 molekulou na endotelu a PECAM-1 molekulou na leukocytech [5].

Obr. 3: Schéma adheze a prostupu leukocytů přes cévní endotel
(*J Clin Invest* 2001;107:1255-62)



Prvními leukocyty, které se objevují v intimě cév jsou monocyty. Tyto monocyty jsou vystaveny působení růstových faktorů jako EDGF (endothelium-derived growth factor) nebo faktorům stimulujícím tvorbu kolonií jako např. M-CSF a díky nim dochází k jejich transformaci na makrofágy. Makrofágy internalizují prostřednictvím svých „scavenger receptorů“ modifikované (oxidované) lipoproteiny, protože tyto lipoproteiny nemohou být katabolizovány cestou LDL receptorů. Protože internalizace oxLDL cestou scavengerových receptorů nepodléhá přesné zpětnovazební regulaci jako

internalizace normálními LDL receptory, dochází k intracelulární akumulaci esterů cholesterolu a vzniku tzv. *pěnových buněk*. Nashromážděné pěnové buňky vytvářejí nejranější typ aterosklerotické léze nazvaný jako lipidní proužkování (*fatty streaks*). Jsou makroskopicky viditelné a mají definovanou histologickou strukturu. Vznikají v místech se zvýšeným obsahem lipoproteinů v intimě díky jejich zvýšené vazbě na makromolekuly extracelulární matrix. Toto stádium není sice klinicky významné, ale může se dále vyvíjet ve fibrózní plak. Tento typ lézí se hojně nachází již u dětí i dospívajících jedinců [1].

Makrofágy vytvářející lipidní proužky produkují řadu látek, které ovlivňují další formování aterosklerotické léze. Ve velké míře produkují chemokin MCP-1, který zesiluje chemotaxi a podílí se na další akumulaci makrofágů v lézi. Dále produkují společně s endotelem destičkový růstový faktor (PDGF), monocytový růstový faktor (MDGF) a zánětlivé IL-1 β a IL-8, které přispívají ke změně kontraktálního fenotypu hladkosvalových buněk. Fenotyp kontraktální se mění na fenotyp sekreční. Kontraktální fenotyp udržuje cévní tonus a podílí se na reparaci při poškozeních. Fenotyp sekreční produkuje růstové faktory, cytokiny, elastin a kolagen. Dochází k proliferaci a migraci hladkosvalových elementů do intimy [6].

Kromě buněčné složky se v aterosklerotických lézích nachází také složka vláknitá, která je reprezentována nejvíce kolagenem. Kolagen je bílkovina tvořená ze tří polypeptidových řetězců vzájemně propletených ve trojšroubovici. Obsahuje dvě charakteristické aminokyseliny, hydroxyprolin a hydroxylyzin. Kolagen tvoří až 60% všech proteinů, které se nacházejí v aterosklerotické lézi a výrazně přispívá k růstu plátu a tedy zužování cévního lumen. Také slouží jako depo, kde se kumulují modifikované lipoproteiny, růstové faktory a koncové produkty glykace. Syntéza kolagenu je úzce spjata se změnou fenotypu, migrací a proliferací hladkosvalových buněk. Syntéza kolagenu je ovlivněna řadou lokálních i systémových činitelů. TGF- β , PDGF, endotelin-1, angiotensin II, IL-1, homocystein a i mechanické napětí stimulují tvorbu kolagenu. Naopak TGF- α , INF- γ , NO a estradiol inhibují syntézu kolagenu v plátu. Z výše uvedeného vyplývá, že po akumulaci makrofágů a T lymfocytů v intimě dochází v další fázi k transmigraci hladkosvalových buněk z medie do intimy a proliferaci extracelulární matrix, zejména kolagenu a vytvoření *fibromuskulárního typu aterosklerotické léze* [7].

Od začátku rozvoje aterosklerózy až po vznik fibromuskulárního plátu se může aterogenní proces vyvíjet dvěma směry:

a) Aterogenní faktor přestane působit, endotelové buňky regenerují a postupně obnoví svou funkci. Výsledkem tohoto častého procesu je pouhé ztluštění intimy, která obsahuje pouze jednu nebo dvě vrstvy myocytů, které se zde normálně nevyskytují. Tento typ lézí (fatty streaks) je často prokazatelný i u dětí, protože aterogeneze ve velkých tepnách začíná již u 2-3letých batolat a je závislá na hladině LDL cholesterolu.

b) Aterogenní faktory působí dále, dochází k progresi aterosklerotických změn.

Makrofágy dále internalizují lipoproteinové částice a částečně dochází k jejich kumulaci ve střední části plátu. Na rozdíl od iniciačních stádií, kdy makrofágy akumulovaly především estery cholesterolu, v této fázi dochází ke zvýšené kumulaci volného cholesterolu v makrofázích. Takto výrazně stoupá poměr volný cholesterol/fosfolipidy, což díky cytotoxickým účinkům volného cholesterolu zřejmě vede k odumírání makrofágů. Makrofágy podléhají jak nekróze tak apoptóze. Po odumření makrofágů dochází k extracelulární akumulaci lipidů, uvolnění hydrolytických enzymů a zánětlivých substancí a vytvoření nekrotického lipidového jádra [7].

V této fázi pokračuje migrace hladkosvalových buněk z intimy do medie. Tyto hladkosvalové buňky cestují přes oblasti lipidového jádra směrem k povrchu aterosklerotické plátu. K dalším faktorům je možno uvést také větší produkci chemotaktických substancí endotelem, které takto mohou přitahovat hladkosvalové elementy k povrchu plátu. Tyto hladkosvalové buňky pokračují v syntéze extracelulární matrix, zejména kolagenu, elastinu a proteoglykanů (dermatan a heparan sulfát). Všechny tyto děje vedou k vytvoření tzv. fibromuskulární čepičky na povrchu aterosklerotického plátu. V nekrotických oblastech plátu navíc dochází k ukládání vápníku a mineralizaci. Na této mineralizaci se podílí zejména hladkosvalové buňky, které pod vlivem růstových faktorů, syntetizují proteiny jako je např. osteopontin, podílející se na kalcifikaci plátu. Na druhé straně makrofágy působí v lézi jako osteoklasty v kostní tkáni a podílejí se na inhibici ukládání vápníku. Vytvořením nekrotického lipidového jádra ve střední části léze, formováním fibromuskulární čepičky na povrchu a ukládáním vápenatých iontů dochází k vytvoření pokročilé aterosklerotické léze, která se nazývá *ateromový plát* [8].

Pokročilé aterosklerotické léze jsou vždy potenciálně velmi nebezpečné, protože často způsobují stenózu cévy. Pokud se propustnost cévy zmenší pod 15%, dochází často k projevům ischemie, nejčastěji anginy pectoris. Klinické komplikace aterosklerózy jako je infarkt myokardu, ale nezávisí na stupni cévní obstrukce, ale vznikají především jako následek trombózy.

Ke vzniku trombu může dojít buď při erozi endotelu, nebo při ruptuře plátu. K prvnímu typu vzniku trombózy obvykle dochází u cév s velkou obstrukcí cévního lumen plátem. Naopak k trombóze při ruptuře plátu dochází u cév s malou obstrukcí lumen [8].

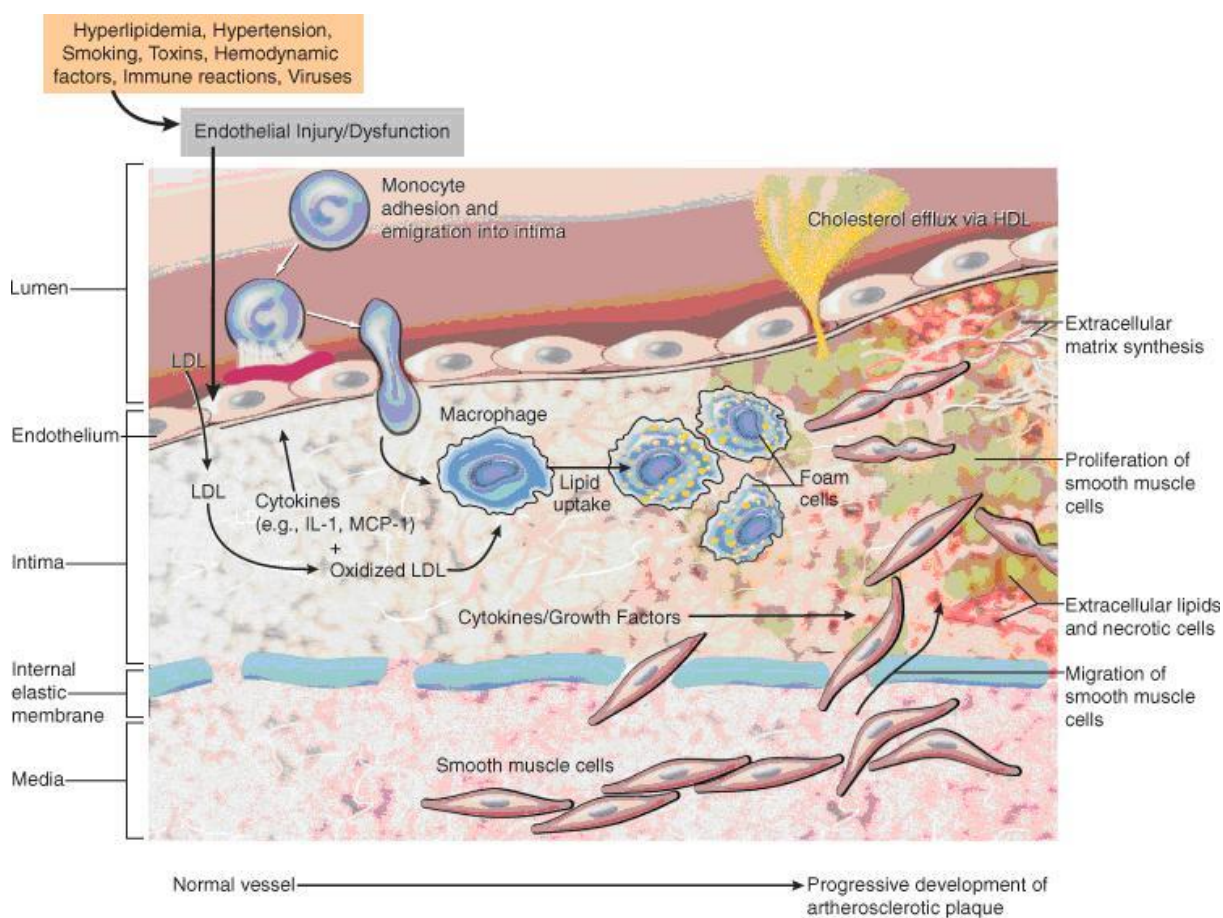
Malá eroze endotelu vede k expozici kolagenu a tkáňového faktoru destičkám, což vede ke vzniku malých mikrotrombů, které nemají žádný klinický význam. Pokud je eroze a destrukce endotelu větší dochází ke vzniku tzv. *červeného trombu*, který obsahuje velké množství destiček, červených krvinek a fibrinu. Tento trombus postupně uzavírá lumen, cévy až může dojít k úplné okluzi. Kromě toho se v místě vzniku trombu rozvíjí zánětlivá reakce s akumulací makrofágů a T lymfocytů.

Pokud dojde k ruptuře fibromuskulární čepičky plátu dochází ke styku krve s nejvíce trombogenní oblastí plátu, kterou je kašovitá hmota s velkou koncentrací tkáňového faktoru, který je produkován makrofágy, hladkosvalovými i endotelovými buňkami. Trombus se vytváří v intimě, kde dochází k jeho inkorporaci do plátu. Pokud je ruptura plátu hluboká, průtok krve pomalý, nízká fibrinolytická aktivita a velká aktivita tkáňového faktoru, dochází k postupné expanzi trombu, až může dojít k úplné okluzi cévního lumen. Lze také říci, že čím hlubší je ruptura plátu, tím déle trombus uzavírá lumen cévy. Když je ruptura plátu malá, průtok krve rychlý a vysoká fibrinolytická aktivita, trombus se může uvolnit a dochází k embolizaci nebo může být postupně degradován a žádné klinické komplikace se neobjeví. Na vzniku trombózy se podílí celá řada faktorů, které často patří mezi obecné rizikové faktory aterosklerózy.

O tom zda k ruptuře plátu dojde, či nikoliv rozhoduje několik faktorů. Vždy jde v podstatě o křehkou rovnováhu mezi hemodynamickými vlivy krevního proudu a vnitřním chováním plátu. Pro stabilitu aterosklerotického plátu je důležitá pevnost fibromuskulární čepičky. Makrofágy a T lymfocyty snižují stabilitu plátu zejména produkcí zánětlivých cytokinů a proteolytických enzymů, které snižují syntézu a zvyšují degradaci extracelulární matrix [9].

Ruptura aterosklerotického plátu je tedy způsobena mechanickými silami, které působí na plát, a které převáží nad mechanickými vlastnostmi plátu, které jsou významně oslabeny zánětlivou reakcí v plátu, kumulací lipidů, degradací kolagenu, apoptózou a sníženou migrační a proliferační aktivitou hladkosvalových buněk.

Obr. 4: Schematický diagram buněčných interakcí v patogenezi aterosklerózy (<http://www.biology.estranky.cz/clanky/patologie/patologie-aterosklerozy>)



2.1.2. Teorie vzniku aterosklerózy

V minulosti se vycházelo ze dvou hlavních teorií vzniku aterosklerózy; *teorie lipidová a teorie endoteliálního poškození*, které byly později spojeny do tzv. „sjednocené hypotézy aterosklerózy“. V současné době se dostává do popředí zájmu infekční teorie aterosklerózy. Všechny tyto teorie mají mnoho společných rysů a do značné míry se prolínají. Velký význam v rozvoji aterosklerózy mají ale také fyzikální faktory, které rozhodují především o lokalizaci aterosklerotického ložiska.

Lipidová teorie

Tato teorie předpokládá, že primární příčinou aterosklerózy je akumulace lipidů (především LDL, ale i IDL a VLDL) v cévním endotelu. Jejich zvýšený průnik je dán především jejich zvýšenou koncentrací v krvi. V endotelu jsou lipoproteiny ve zvýšené míře vylučovány makrofágy a buňkami hladké svaloviny prostřednictvím jejich specifických i nespecifických receptorů. Tím dochází k nahromadění lipidů a přeměně na pěnové buňky = základ aterosklerotického ložiska [9].

Teorie endoteliálního poškození

Tzv. Rossova teorie předpokládala, že prvotní příčinou rozvoje aterosklerózy je poškození cévního endotelu. Na něj adherují trombocyty, které uvolňují řadu faktorů (především PDGF) a které stimulují proliferaci hladkých svalových buněk a syntézu extracelulární matrix. Chemotaktické faktory atrahují monocyty, které se transformují v makrofágy, a samy makrofágy i hladké svalové buňky syntetizují PDGF. Ukládání lipidů do aterosklerotického ložiska je podle této teorie sekundární záležitostí [10].

Sjednocená teorie aterosklerózy

Teorie vychází z předpokladu, že základním krokem v rozvoji aterosklerózy je endoteliální dysfunkce. Většinou se jedná o lokalizované poškození endotelu, kdy není porušena jeho integrita, ale jsou alterovány jeho funkce a endoteliální buňky mají zvýšený obrát a zvýšenou propustnost pro některé molekuly. Vzniká nerovnováha mezi vazoaktivními mechanismy (vazokonstrikční × vazodilatační) a hemokoagulačními působky (prokoagulační, protrombotické × antikoagulační, antitrombotické).

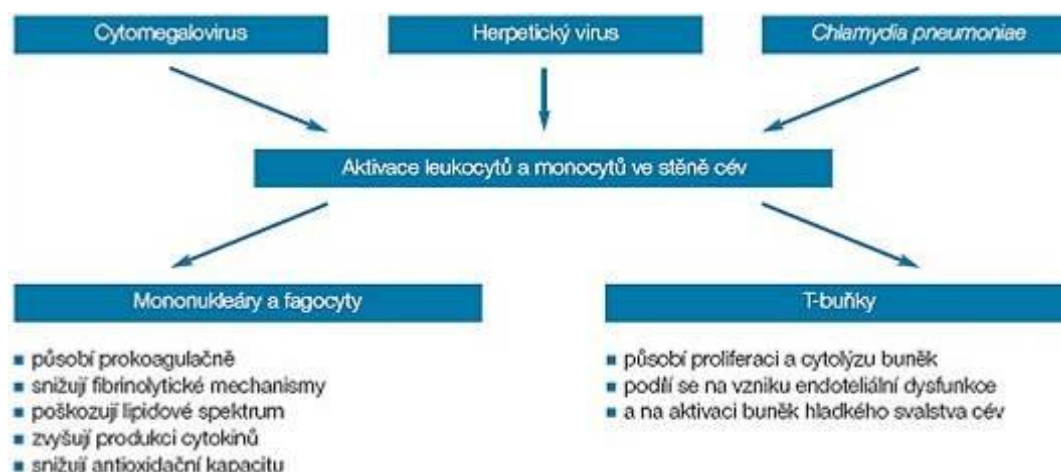
Výsledkem je převaha vazokontričních a protrombotických pochodů a aktivace zánětlivých a proliferačních dějů. Dochází mimo jiné ke zvýšené adhezenci trombocytů a jejich agregaci se zvýšeným uvolňováním růstových a proliferačních faktorů (především PDGF, který stimuluje proliferaci buněk hladké svaloviny). Chemotaktické faktory přitahují další monocyty, které se transformují v makrofágy. Lipoproteiny snáze pronikají poškozeným endotelem do subendoteliálních prostor a masivně infiltrují cévní stěnu, kde jsou oxidovány. Oxidované lipoproteiny dále aktivují makrofágy a proces aterosklerózy progreduje [9].

Infekční teorie aterosklerózy

Ateroskleróza je chronický zánětlivý proces a velkou roli v něm hraje nepochybně imunitní systém. Teorie předpokládá, že základním etiologickým agens, vyvolávajícím endoteliální dysfunkci a zánětlivou reakci v cévní stěně, jsou chronické bakteriální a virové infekce. Ty aktivují imunitní systém, což vede ke zvýšené tvorbě imunitních komplexů, které způsobují kromě dysfunkce endotelu i aktivaci zánětlivého procesu v cévní stěně. Na toto poškození pak nasedají další procesy (akumulace lipidů, makrofágů, uvolňování proliferačních a chemotaktických působků a progresu procesu aterogeneze). Za možné etiologické agens jsou dnes považovány především Chlamydia pneumoniae, Cytomegalovirus, Helicobacter pylori a herpetické viry (viz obr. 5) [11].

Obr. 5: Předpokládané mechanismy, jimiž se infekční agens uplatňuje v trombogenezi a aterogenezi

(<http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/modules/access/login.php>)



2.1.3. Rizikové faktory aterosklerózy

Obr. 6:

(https://www.zdravcentra.sk/zc/imgsk/Onlineknihovna/PML_aterosklerozaz.jpg)



Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění. Rizikové faktory se podílí nejen na vzniku, ale i na její progresi. Poškozují cévní endotel a způsobují jeho dysfunkci. Můžeme je rozdělit takto [12]:

I. Faktory životního stylu

- strava s vysokým obsahem nasycených tuků, cholesterolu a nadbytečným energetickým obsahem
- kouření cigaret a tabáku vůbec
- nadměrná spotřeba alkoholu
- nízká tělesná aktivita

II. Biochemické a fyziologické charakteristiky

- zvýšený celkový cholesterol v plazmě (především LDL-frakce)
- nízký HDL-cholesterol
- zvýšené triglyceridy
- zvýšený krevní tlak
- hyperglykémie, diabetes mellitus, porucha glycidového metabolismu; hyperinzulinémie
- obezita centrálního typu
- trombogenní faktory (zvýšená hladina fibrinogenu, faktoru VII, PAI-1)
- mírná hyperhomocysteinémie

III. Nemodifikovatelné osobní charakteristiky

- věk (vyšší než 45 let u mužů, postmenopauzální věk u žen)
- mužské pohlaví
- rodinná anamnéza předčasné ICHS (u mužů ve věku nižším než 55 let a u žen nižším než 65 let) nebo jiné manifestace aterosklerózy u příbuzného 1. stupně (tj. rodiče, sourozenci, děti)
- osobní anamnéza ICHS nebo jiné manifestace aterosklerózy nebo nález asymptomatické formy chorob

K dalším neméně důležitým rizikovým faktorům patří zvýšená hladina CRP, psychický stres a některá infekční agens [13].

Bližší charakteristika nejvýznamnějších rizikových faktorů a ukazatelů aterosklerózy

Hyperlipidémie, krevní lipidy

Jednu z nejdůležitějších rolí mají LDL a HDL částice (viz obr. 7).

LDL (Low-density lipoprotein)

Současná doporučená koncentrace < 3 mmol/l je doporučena pro primární i sekundární prevenci ICHS. Intervenční studie ale ukazují, že i další pokles LDL cholesterolu pod tuto hranici a dokonce i pod 2,5 mmol/l dále redukuje riziko koronárních příhod.

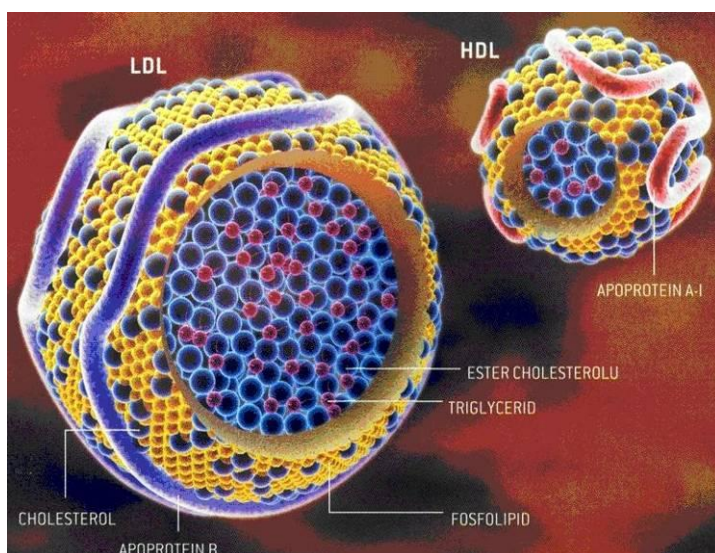
Obr. 7:

(<http://www.biology.estranky.cz/clanky/patologie/patologie-aterosklerozy>)

HDL (High-density lipoprotein)

Nízká koncentrace HDL cholesterolu je rizikovým faktorem předčasné ICHS a kardiovaskulárních příhod. Jeho vysoká koncentrace eliminuje riziko zvýšeného LDL cholesterolu a má ateroprotektivní charakter.

Žádoucí koncentrace HDL je $> 1,0$ mmol/l [14].



Triacylglyceroly (TAG)

Triglyceridy zvyšují riziko aterosklerózy mnoha mechanismy, především jsou ale indikátorem přítomnosti lipoproteinů, bohatých také cholesterolem, které mohou přestupovat přes cévní endotel.

Lipoprotein(a) /Lp(a)/

Svojí strukturou se velmi podobná LDL částici, která ale není katabolizována cestou LDL receptorů. Obsahuje další glykoprotein - apolipoprotein(a), který je strukturálně

homologní s plazminogenem. Soutěží s ním o vazbu na plazmin, ale protože plazmin neaktivuje, působí antifibrinolyticky a tím trombogenně.

CRP (C – reaktivní protein)

Je to protein akutní fáze tvořený v játrech pod vlivem IL-6. IL-6 je syntetizován v aktivovaném monocytu, CRP je tedy nespecifickým ukazatelem zánětlivého procesu.

Sérový amyloid A (SAA), ceruloplazmin a feritin. Mají podobný význam jako CRP, jsou to reaktanty zánětlivého procesu [15].

Fibrinogen

Ke vzniku aterosklerózy může přispívat dvěma způsoby:

- je zánětlivým reaktantem (tedy podobně jako CRP)
- jeho zvýšená hladina může přispívat ke zvýšené koagulační pohotovosti → ke zvýšenému riziku vzniku trombózy.

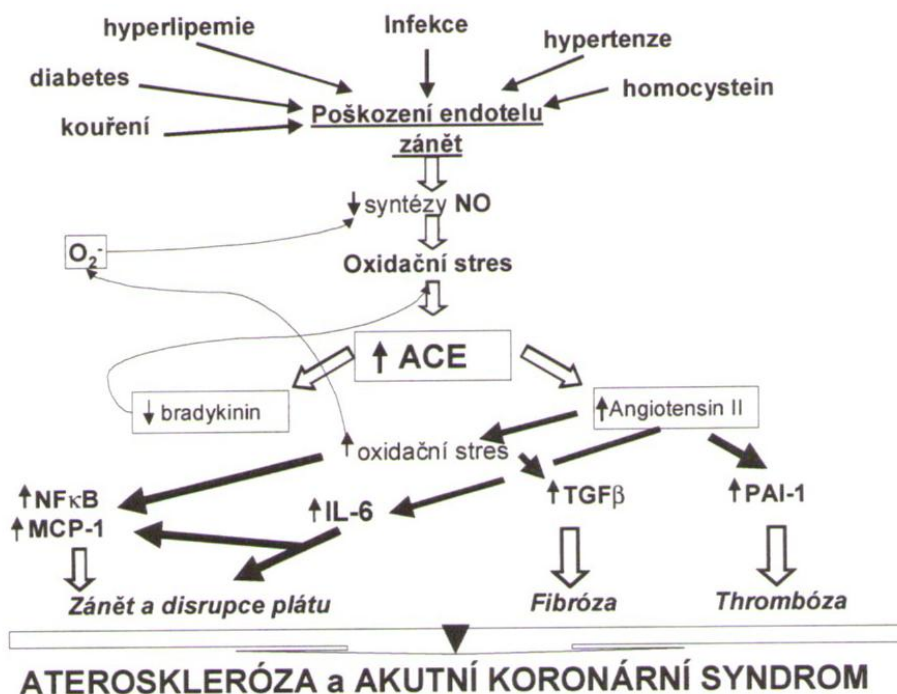
Hypertenze

Dalším velmi důležitým rizikovým faktorem je vysoký krevní tlak (významnější je zvýšení systolického krevního tlaku - nad 140/90 mmHg, u diabetiků 135/85 mmHg).

Angiotenzin II (hlavní produkt renin-angiotenzinového systému), který je silným vazokonstriktorem a způsobuje hypertenzi (viz obr. 8), přispívá k rozvoji aterogeneze stimulací proliferace buněk cévní hladké svaloviny. Váže se totiž na specifický receptor (AT-1), což má za následek uvolnění reaktivních forem kyslíku a dusíku v různých buňkách stěny arterií. Oxidační stres navozuje atrakci a aktivaci monocytů, což vede k produkci MCP-1. Cestou superoxidového aniontu nabuzeného AT-1 receptorem je stimulována tvorba ICAM-1 a VCAM-1 v endotelových buňkách. Rovněž stimuluje tvorbu NF-κB (faktor spouštějící transkripci zánětlivých genů).

Receptor angiotenzinu II (AT-1) také zvyšuje aktivitu lipooxygenázy v buňkách hladké svaloviny, což podporuje zánětlivou reakci a lipoperoxidaci LDL [16].

Obr. 8: Působení angiotenzin-konvertujícího enzymu na aterosklerózu
 (https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_1426.html)



Důležitým působkem, kterým endotel zasahuje do vývoje hypertenze, je prostacyklin (PGI₂), ten inhibuje agregaci trombocytů a působí vazodilačně. Je známo, že uvolnění PGI₂ je mimo jiné regulováno NO, a nízká dostupnost NO tak může druhotně vést ke zvýšení tonu arteriol též cestou nedostatečného uvolnění prostacyklinu.

Diabetes mellitus

Hyperglykémie vede ke zvýšené glykozylaci proteinů, zejména LDL, za vzniku tzv. AGEs (Advanced Glycation Endproducts). Tyto glykované LDL mají změněné vazebné chování, už nejsou rozpoznávány receptory pro apolipoproteiny. Snáze podléhají oxidaci a jsou rozpoznávány i scavengerovými receptory makrofágů, mohou aktivovat leukocyty a endoteliální buňky a navodit zánětlivý proces (CRP a cytokiny). AGE snižují biologickou aktivitu NO, a tím omezují vazodilataci. Příčinou tohoto jevu je především inaktivace NO reaktivními kyselými radikály (hlavně superoxidový aniont). Kyselé radikály kromě toho navozují řetěz reakcí, které přeměňují endotel z klidového antiadhezivního a antiproliferativního spojitého stavu na trombogenní

proliferující a nespojitý povrch. V důsledku působení kyselých radikálů dochází k aktivaci proteinkinázy C, ke zvýšené tvorbě glukosaminů, ke snížení antioxidantní kapacity, ke glykozylaci proteinů a k aktivaci transkripčních faktorů s následnou zvýšenou expresí cytokinů a adhezivních proteinů (např. ICAM-1) [17].

Infekce

Infekce působí na spektrum lipidů (zvyšují VLDL, TAG, snižují HDL), indukují tvorbu volných radikálů v cévní stěně, aktivují prozánětlivé a prokoagulační faktory, zvyšují expresi CAM a hladinu CRP. Byla nalezena přítomnost herpetických virů a Chlamydia pneumoniae v ateromových plátech a zvýšený titr protilátek proti různým infekčním agens (Helicobacter pylori, cytomegalovirus, virus Epstein a Barrové, Hemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae) u pacientů s akutním koronárním syndromem.

Rovněž chronický zánět periodontia je považován za přispívající faktor rozvoje aterosklerózy [13].

Zánět

Na rozvoji zánětu se podílí endotel, trombocyty, leukocyty, koagulační systém a komplement a všechny prozánětlivé mediátory. Existují predilekční místa v arteriálním řečišti (bifurkace, kurvatury, větvení), kde dochází k poškození stěny cévní změny v proudu krve, zvýšenou turbulencí apod. Endotel v těchto místech na to odpovídá tvorbou specifických molekul, odpovědných za adherenci, migraci a akumulaci monocytů a T-lymfocytů [18].

Kouření

Předpokládá se přímý toxický vliv zplodin cigaretového kouře na cévní endotel. Kouření zvyšuje riziko úmrtí následkem koronární aterosklerózy na 1,4 až 2,4násobek (i slabé kouření!), u silných kuřáků až na 3,5 násobek. Mechanismem účinku kouření je nejen indukce endoteliální dysfunkce, ale i rozvoj dyslipidémie (nízký HDL cholesterol, více oxidovaných LDL), hemodynamický stres (tachykardie, přechodný vzestup TK), zvýšení koagulační pohotovosti, vyšší arytmogenní pohotovost a relativní hypoxie (CO

redukuje kapacitu Hb pro kyslík). Kompenzačně k relativní hypoxii se vyvíjí polycytémie, zvyšující viskozitu krve, a tím riziko trombotické příhody. Snižuje se tolerance k fyzické zátěži.

Obezita

V současné době se čím dál víc poukazuje na to, že rozhodující je i typ obezity, zvýšené riziko představuje tzv. centrální typ. Jedná se o intraabdominální kumulaci tukových buněk, které jsou nejen zásobárnou tuku, ale zároveň produkují zánětlivé a koagulační faktory (CRP, TNF- α , PAI-1) [19].



Pohlaví

Je jednoznačně prokázán projektivní vliv estrogenů, příznivě ovlivňují složení krevních lipidů (klesá hladina LDL a hladina HDL se naopak zvyšuje). Proto mají muži výrazně vyšší riziko aterosklerózy než ženy do menopauzy. Riziko žen se po menopauze bez substituční terapie estrogenů zvyšuje [19].

2.2. ENDOTEL A JEHO FYZIOLOGICKÉ FUNKCE

Endotel tvoří jednovrstevnou vnitřní výstelku cévního lumen. Endoteliální buňky mají nepravidelný podlouhlý tvar. Celkový povrch endotelu představuje plochu asi 500 - 1000 m², jeho hmotnost je odhadována na 1,5–3 kg.

Základní funkce endoteliálních buněk je regulace permeability, udržení nesmáčivého a antitrombogenního povrchu, včetně kontroly hemostázy, syntéza extracelulární matrix intimy, regulace cévního tonu a regulace remodelačních a reparačních procesů [20]. Endoteliální buňky jsou metabolicky aktivní, produkují celou řadu působků:

| | |
|--|--|
| Vazodilatační <ul style="list-style-type: none">• oxid dusnatý (NO)• prostacyklin• EDHP• typ C natriuretického peptidu | Vazokonstrikční <ul style="list-style-type: none">• endotelin-1• tromboxan A₂• prostaglandin H₂ |
| Antitrombotické <ul style="list-style-type: none">• TPA | Protrombotické <ul style="list-style-type: none">• PAI-1 |
| Inhibitory růstu <ul style="list-style-type: none">• oxid dusnatý• prostacyklin• typ C natriuretického peptidu | Prorůstové <ul style="list-style-type: none">• endotelin-1• angiotenzin II• superoxidový radikál |
| Protizánětlivé <ul style="list-style-type: none">• oxid dusnatý | Prozánětlivé <ul style="list-style-type: none">• TNF-α• superoxidový radikál |

2.2.1. Regulace permeability

Endotel zajišťuje řízenou propustnost mezi krví a okolními tkáněmi, kontroluje prostup jak pro buněčné elementy, tak pro nebuněčné krevní komponenty. Nebuněčné komponenty využívají pro svou cestu paracelulární i transcelulární transportní

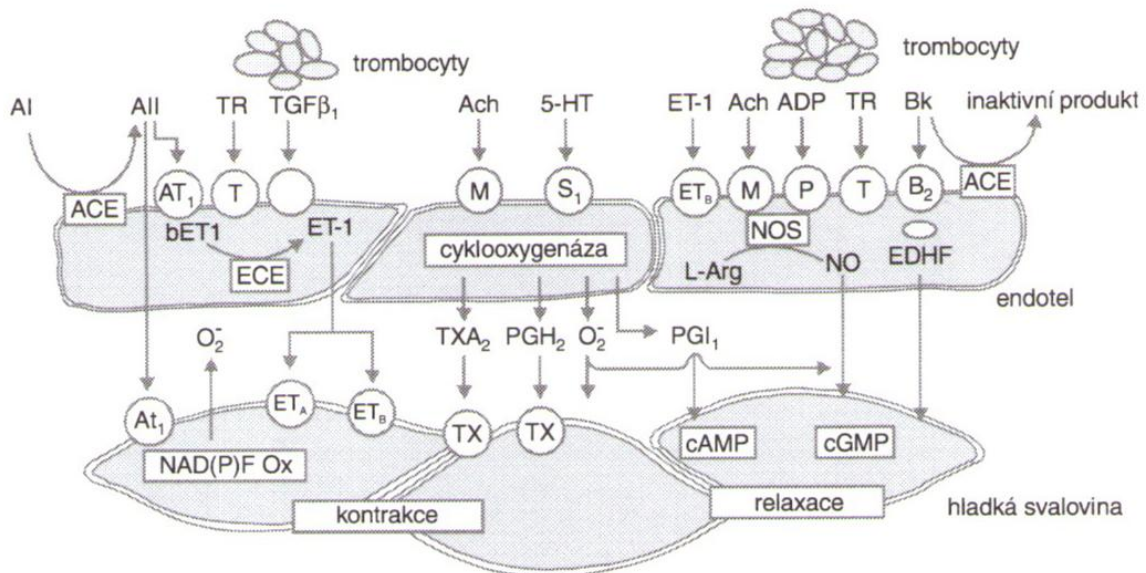
mechanismy. Prostup krevních elementů – leukocytů je realizován za pomoci vazoadhezivních molekul, kterých endotel na svém povrchu exprimuje celou řadu (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) [21].

2.2.2. Regulace cévního tonu

Endotel kontroluje optimální průtok krve cévou, produkuje látky s vazodilatačními a vazokonstrikčními vlastnostmi (viz obr. 9), a tím udržuje napětí cévní stěny.

Obr. 9: Endoteliální vazoaktivní působky

(<http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/modules/access/login.php>)



Oxid dusnatý NO, látka s vazodilatačním účinkem, a jeho syntéza pomocí eNOS

Oxid dusnatý (NO), je substance, která slouží jako klíčová signální molekula ve fyziologických procesech jako je: obrana organismu, nervový přenos a regulace tonu cév. I přesto, že je NO nepostradatelnou molekulou, její produkce není vždy prospěšná, zvýšená nebo snížená produkce může mít v patofyziologických procesech škodlivé důsledky [22].

NO vzniká z terminálního guanidinového dusíku z L-argininu přes N^G – hydroxy –L-arginin, meziproduct poskytující L-citrulin, tato reakce je katalyzována NO syntázou (NOS). Existují 3 různé izoformy enzymu NO syntázy, které mohou být rozděleny do

dvou funkčních skupin. První skupina se, skládá se z endoteliální NOS (eNOS) a nervové NOS (nNOS). Tyto Ca^{2+} /kalmodulin dependentní enzymy produkují za fyziologickým účelem v nárazech a ve velice nízkých koncentracích (nM) NO. Další třída je tvořená indukovatelnou formou enzymu (iNOS). Tento enzym produkuje NO ve vysokých koncentracích (μM) po celou dobu, co je enzym aktivován. Ačkoliv je iNOS v některých tkáních (jako je plicní epitel a distální tubuly ledvin) přítomen stále, tak především je tento enzym aktivován buňkami zánětu, po jejich předchozí indukcii cytokiny a dalšími mediátory zánětu. Jeho aktivita je závislá na Ca^{2+} [23].

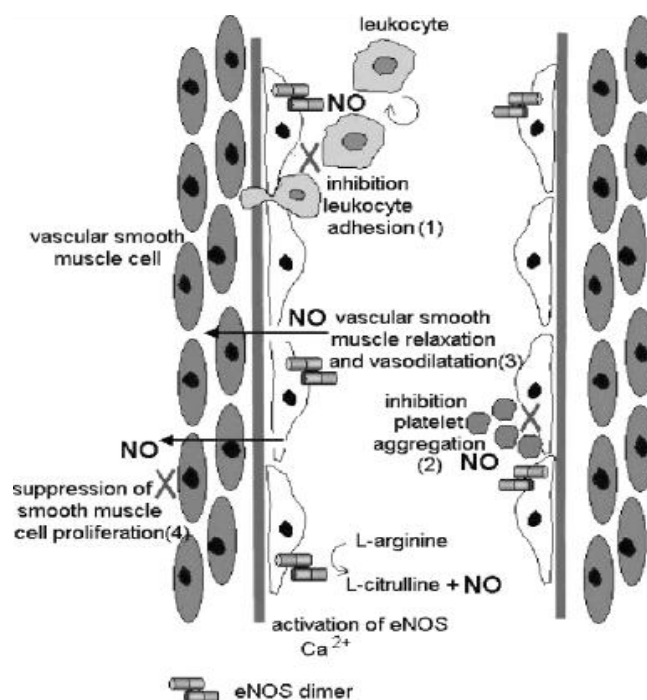
Bylo poukázáno na to, že NO produkovaný iNOS ve velkém množství je toxickým, škodlivým činitelem, zatímco eNOS je chápán jako protektivní enzym. Proto je vynaloženo mnoho úsilí za účelem porozumění role NO a jeho syntézy v patogenezi různých onemocnění.

Obr. 10: Endoteliální NO syntáza

(Journal of pathology. J Pathol 2003; 199: 8–17)

Endoteliální NO syntáza je dimer (viz obr. 10) skládající se ze dvou identických monomerů. Genetická informace pro eNOS je umístěná na chromozómu 7q35 – 36 a obsahuje 26 exonů. Enzym je plně funkční pouze v dimerní formě [24].

Dimerizace eNOS začíná jeho vázáním s hemem, bez hemu se enzym vyskytuje jen jako monomer. Díky vazbě na hem a tvorbě dimeru je možné spojení



s tetrahydrobiopterinem (BH_4), toto spojení pak přechází v ustálenou formu dimeru. Stabilizace dimeru je také závislá na přítomnosti zinečnatých iontů, které udržují celistvost BH_4 vazebných míst. Funkční aktivita eNOS dimeru je závislá na počtu BH_4 molekulových vazeb. Dimer eNOS bez vazby BH_4 je schopný produkce O_2^- . V případě, že váže eNOS jednu molekulu BH_4 , je schopný produkce jak NO, tak O_2^- . V případě

vyššího počtu BH₄ je pak enzym nasycený dimer, který pak funguje čistě jako NO syntáza [25].

Přesná buněčná lokalizace enzymu eNOS není známá. Jeho přítomnost je připisována Golgiho aparátu, plazmatické membráně a dutinkám v plazmalemě. Předpokládá se, že nejvíce eNOS je právě v dutinkách, kde je vázána na kaveolin, zde přítomný obalový protein. Vazba kaveolinu vede k inhibici aktivity eNOS, regulace jeho aktivity je pak řízena prostřednictvím interference s navázaným kalmodulinem CaM a elektronovým přenosem na podjednotku hemu. Zvyšující intracelulární koncentrace volných Ca²⁺ způsobí tvorbu komplexu Ca²⁺/CaM, tento komplex vázající se na enzym způsobí disociaci kaveolinu. V tento okamžik je enzym eNOS aktivován, v tomto aktivním stavu zůstává do té doby, než se sníží intracelulární koncentrace Ca²⁺ a komplex Ca²⁺/CaM je pak následně zaměněn zpět za kaveolin. Aktivovaný eNOS produkuje NO po dobu, co jsou přítomny substráty, tedy L-arginin, kyslík a NADPH. Pozměněné složení lipidů v dutinkách plazmalemy může vytěsnit eNOS, těmito změnami v lipidovém složení je tedy ošetřena aktivita enzymu [26].

Ačkoli je eNOS enzym často považován za NOS, jež je soustavně exprimován, je známo mnoho faktorů, které ovlivňují bazální úroveň exprese a jeho aktivitu. Těmito faktory jsou: hypoxie, smykové napětí krevního proudu (shear-stress), estrogeny, oxidované lipoproteiny s nízkou hustotou (LDLs) a mechanické namáhání. Tyto faktory mohou vyvolat transkripci eNOS, například prostřednictvím aktivace AP-1 během hypoxie nebo mohou vést k aktivaci eNOS prostřednictvím zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺, což může být zapříčiněno buď influxem extracelulárního Ca²⁺ nebo Ca²⁺ uvolněným z nitrobuněčných zásob [27].

Enzym eNOS je exprimován v endoteliálních buňkách, trombocytech, buňkách hladké svaloviny, srdečních myocytech, kostních buňkách a neuronech. Endoteliální NO může reagovat s mnoha různými molekulami. Radikály NO rychle difundují a působí na okolní buňky prostřednictvím vazby na složku hemu rozpustné guanylycyklázy, která je tímto aktivovaná. Způsobí tak zvýšení koncentrace cGMP, což vede k aktivaci dalších kaskád reakcí. Na buňky hladké svaloviny cév působí tato aktivace guanylycyklázy uvolněním svaloviny - relaxací. NO může také přímo ovlivnit Ca-dependentní draselné kanály, což vede k hyperpolarizaci buněk hladké svaloviny cév, a tedy k vazodilataci. Ale ne všechna endotel-dependentní uvolnění hladké

svaloviny cév mohou být vysvětlena uvolněním NO nebo prostacyklinu. Buňky hladké svaloviny cév mohou být také uvolněny v závislosti na odezvě endotel-dependentním hyperpolarizačním faktoru (EDHF). Tento faktor se zdá být alternativní cestou v řízení tonu cévní svaloviny [22].

Účinky NO produkovaného eNOS jsou všestranné. K regulaci tonu svaloviny cév přibývá i řízení adheze leukocytů na endotel, inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny cév a agregabilitu trombocytů, spotřebu kyslíku ledvinami a angiogenezi. Díky těmto všestranným funkcím má endoteliální NO ohromný vliv na cévní funkci a její integritu. Dosud jsou patologické účinky pozmeněné produkce a biodostupnosti eNOS spojovány s hypertenzí, hypercholesterolémií a arteriosklerózou, diabetem, srdečním selháním a zhoršeným hojení ran.

Další vazoaktivní látky

Další vazodilatační látkou je prostacyklin, uvolňovaný za obdobných situací jako NO, jejich účinek se navzájem potencuje.

Třetím vazodilatačně působícím faktorem je EDHF, jehož hlavní biologickou úlohou je pravděpodobně vazodilatace v koronárním řečišti.

Aby byla zachována rovnováha, endotel rovněž produkuje několik látek s vazokonstrikčním působením. Jde především o endotelin-1. V intaktních cévách působí endotelin-1 bimodálně – vazokonstrikční účinek je mírněn současnou stimulací produkce NO a prostacyklinu. Plná vazokonstrikce se objeví až při poškození endotelu. Endotelin-1 také stimuluje proliferaci myocytů v cévní stěně.

Na povrchu endotelu je též vázán angiotenzin-konvertující enzym, endotel může prostřednictvím změny jeho aktivity ovlivňovat hladiny angiotenzinu II a bradykininu [28].

2.2.3. Zajištění integrity cévního řečiště

Intaktní endotel je dokonale nesmáčivým povrchem. Již při pouhé deskvamaci endoteliálních buněk dochází k absorpci von Willebrandova faktoru (vWF) a ten prostřednictvím destičkových receptorů aktivuje adhezi trombocytů, které se vážou na

vlákna kolagenu. Následně dochází k jejich aktivaci a degranulaci, což vede k uvolnění řady dalších proagregačně a vazokonstrikčně působících látek. Prostřednictvím destičkových receptorů IIb/IIIa a fibrinogenu destičky agregují. Primární, destičková fáze hemokoagulace je doprovázena sekundární hemostázou, na jejímž konci je přeměna fibrinogenu trombinem v nerozpustný fibrin. I tato fáze je ovlivnitelná endotelem. Endotel váže na svém povrchu antitrombin III, který inaktivuje trombin a vzniklý komplex je z cirkulace odstraněn. Endotel také produkuje trombomodulin. Komplex trombomodulin-trombin má již omezenou schopnost štěpit fibrinogen, navíc aktivuje protein C, který - v komplexu s proteinem S – inaktivuje faktory Va a VIIa a tím inhibuje koagulaci. Endotel kontroluje navíc i fibrinolýzu. Klíčovým enzymem štěpícím molekuly fibrinu je plazmin. Ten vzniká z cirkulujícího plazminogenu působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA). Ten naopak může být inhibován svým inhibitorem (PAI-1) [29].

2.2.4. Regulace remodelačních a reparačních procesů

Reparativní pochody v cévní stěně jsou kontrolovány řadou cytokinů. Endotel ovlivňuje strukturu cévní stěny produkcí látek se stimulačními nebo inhibičními účinky na růst. Růstové faktory jsou produkovány tehdy, dojde-li ke zvýšení mechanického napětí cévní stěny. Mezi růstové faktory a cytokiny endoteliálního původu patří např. transformující růstový faktor beta (TGF- β), fibroblastový růstový faktor, destičkový růstový faktor (PDGF), interleukin-1, endotelin-1. Tyto látky stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendoteliálního prostoru z medie s následnou hyperplazií intimy a hypertrofií cévní stěny. Naopak NO a prostacyklin inhibují proliferaci buněk hladké svaloviny a zabraňuje hypertrofii cévní stěny [28].

2.3. CALCULUS BOVIS (NIUHUANG, BEZOAR BOVIS)

Calculus Bovis (Niuhuang) představuje substanci používanou v tradiční čínské medicíně přes 2 tisíce let. Tato látka představuje v podstatě drcené sušené hovězí žlučové kameny společně s některými žlučovými kyselinami. Protože tato substance je velmi vzácná (2x dražší než zlato) připravuje se uměle právě indukcí vzniku žlučových kamenů u různých zvířat [1].

Hlavní účinnou složkou je bilirubin, který je známý mnohými pozitivními účinky, zejména jako silné antioxidační činidlo. Kromě toho byly u této substance nalezeny také protizánětlivé účinky [2].

Obr. 11: Calculus Bovis v nedrcené formě

(http://www.alibaba.com/catalog/10831313/Cattle_Gallstone_Bezoar_Bovis_/showimg.html?autoplay=1×pan=3#productDetailpageLocation)



3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo ověřit potenciální antiaterogenní účinky *Calculus Bovis* na experimentálním zvířecím modelu, kterým byly apoE-deficientní myši. K tomu byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi a detekována exprese eNOS na cévním endotelu. K hodnocení morfologických nálezů byly použity imunohistochemické a stereologické metody.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Samci myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}), vážící 15-20 gramů, byli laskavě poskytnuti Prof. Polednem (IKEM, Praha, Česká Republika) a ustájeni v SEMEDu (Praha, Česká Republika). Všechny myši byly v 6-ti týdnech života odstaveny od matky, náhodně rozděleny do 2 skupin.

ApoE-deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení standardní dietou po dobu 2 týdnů. Ve věku 8 týdnů jim začala být podávána aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21% tuku (11% nasycených mastných kyselin) a 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů (kontrolní skupina). V Calculus Bovis skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 50 mg/kg b.wt. Calculus Bovis (Artificial bezoar, Biopharma, Australia) denně.

Každá z myši ve skupině krmené Calculus Bovis byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vylačněna a byla provedena euthanasie předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při – 80°C.

4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol v 510 nm, triglyceridy v 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

4.3. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ

Barvení olejovou červení se používá k detekci lipidů ve tkáních. Zde byla tato metodika použita pro stanovení množství lipidů v aterosklerotických lézích.

Postup barvení olejovou červení:

Barvení Oil Red O:

- | | | |
|----|--------------------------|-------------------|
| 1) | Oil Red O | 15 minut (králík) |
| 2) | pramenitá voda | oplach |
| 3) | Gill hematoxylin | asi 5 sekund, RT |
| 4) | pramenitá voda | modrání 1 minuta |
| 5) | montování nevodné medium | |

Zásobní roztok Oil Red O se připraví rozpuštěním 0,5 g Oil Red O ve 100 ml isopropanolu. Pracovní roztok se připravuje v čas potřeby z 60 ml zásobního roztoku smíchaného se 40 ml destilované vody a filtruje se přes papírový filtr.

4.4. IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Vzorky se ponořily do OCT směsi, následně byly zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy v ledničce při - 80°C. Na zmrazovacím mikrotomu byly poté nakrájeny série příčných řezů o tloušťce (7 µm) a ty byly přeneseny na sklíčka předem upravené v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout a pak se na 20 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v - 20°C. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy vložily do 0,3% roztoku peroxidu vodíku v PBS (15 minut), čímž se zablokovala endogenní peroxidázová aktivita. Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nescifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Po oplachu v PBS se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou – goat anti-mouse Ig konjugovaným na peroxidázou označený polymer (DAKO En Vision+™, Carpinteria, USA). K tomu, aby navázané protilátky mohly být

zobrazeny, se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Pro kontrolní sklíčka byl zvolen stejný postup, ale místo primární protilátky se použil roztok PBS.

Byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka rabbit anti-mouse eNOS BD Pharmingen (California, USA).

Pracovní postup

EnVision systém

1. sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
2. fixace v acetonu (-20°C; 30min)
3. oschnutí řezů (15min)
4. promytí v PBS (2 x 5 min)
5. aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
6. aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
7. promytí v PBS (2 x 5 min)
8. promytí v 3% H₂O₂ (15 min)
9. promytí v PBS (2 x 5 min)
10. aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
11. promytí v PBS (2 x 5 min)
12. inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (doba inkubace různá pro každou protilátku)
13. oplach řezů v acetonu
14. odvodnění řezů (aceton)
15. odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
16. odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
17. odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
18. montování řezů do Eukittu

4.5. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ

Plocha velikosti barvení olejovou červení a exprese eNOS byla kvantifikována pomocí stereologických metod [3]. Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μm (0,385 mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 5. řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou olejové červeně, respektive eNOS barvením v intimě cévy na jednu cévu [4]. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$\text{estA} = a * P,$$

kde parametr **a** charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a **P** je počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení.

Fotodokumentace a digitalizace z mikroskopu byla provedena mikroskopem Nikon Eclipse E2000, digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) a za pomoci softwaru LUCIA verze 5.0 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA

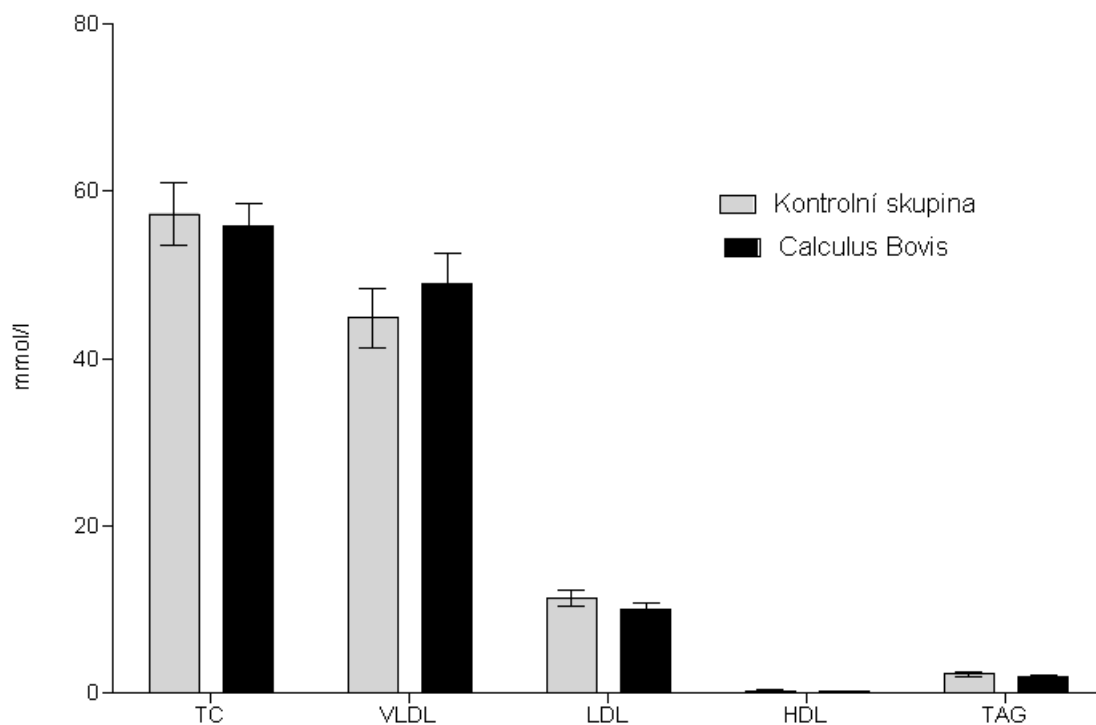
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u Calculus Bovis a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 5.0).

5. VÝSLEDKY

5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu (TC), jednotlivých lipoproteinů (VLDL, LDL a HDL) a triacylglycerolů. Podávání Calculus Bovis neovlivnilo žádný ze sledovaných lipidových parametrů (viz graf 1).

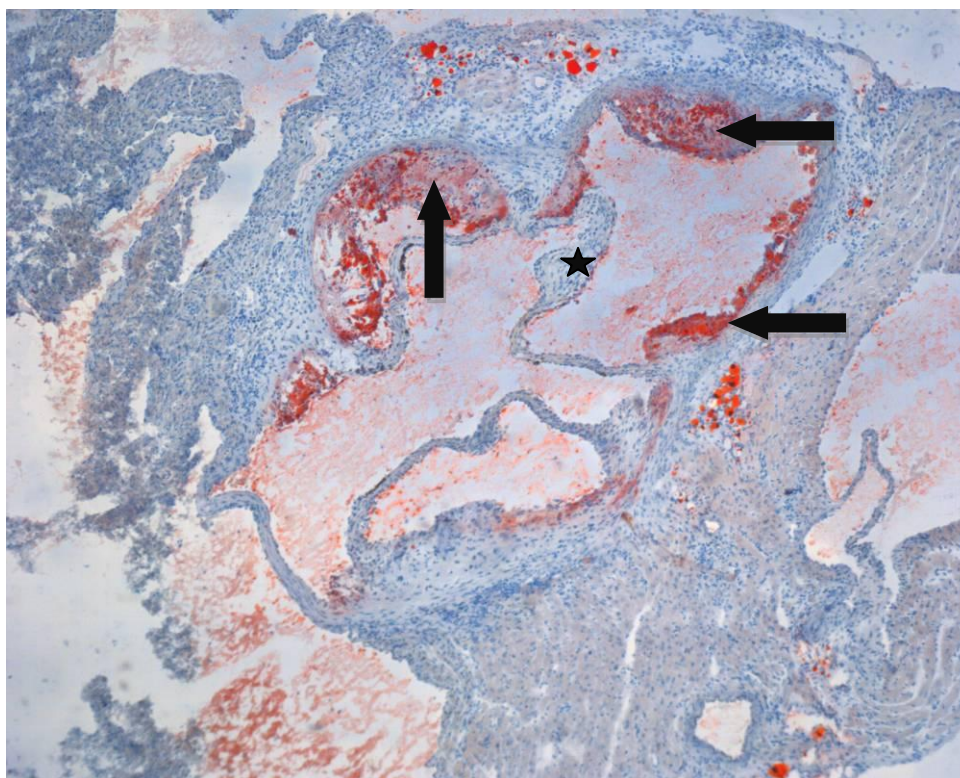
Graf 1: Lipidový profil u kontrolních a Calculus Bovis krměných myší. Osmítýdenní podávání Calculus Bovis nevedlo ke změně žádného sledovaného parametru v porovnání s kontrolní skupinou.



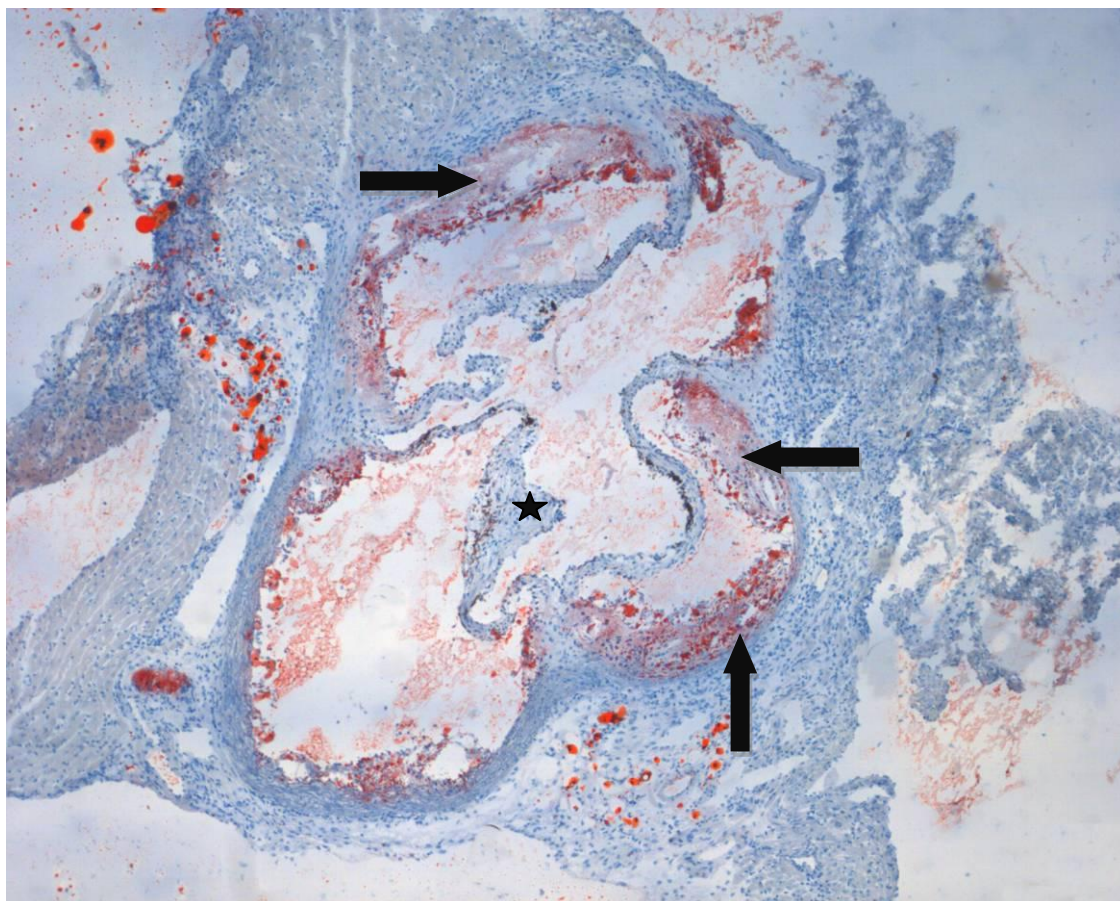
5.2. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ

U všech řezů v kontrolní i Calculus Bovis léčené skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí. Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Aterosklerotické léze byly výrazně vyvinuty, přičemž u řady z nich byla již nalezena ateromová nekrotická jádra. Obrázky naznačují, že podávání Calculus Bovis nemělo výrazný vliv na velikost a intenzitu barvení olejovou červení.

Obr. 12: Barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Zvětšení preparátu 40x.



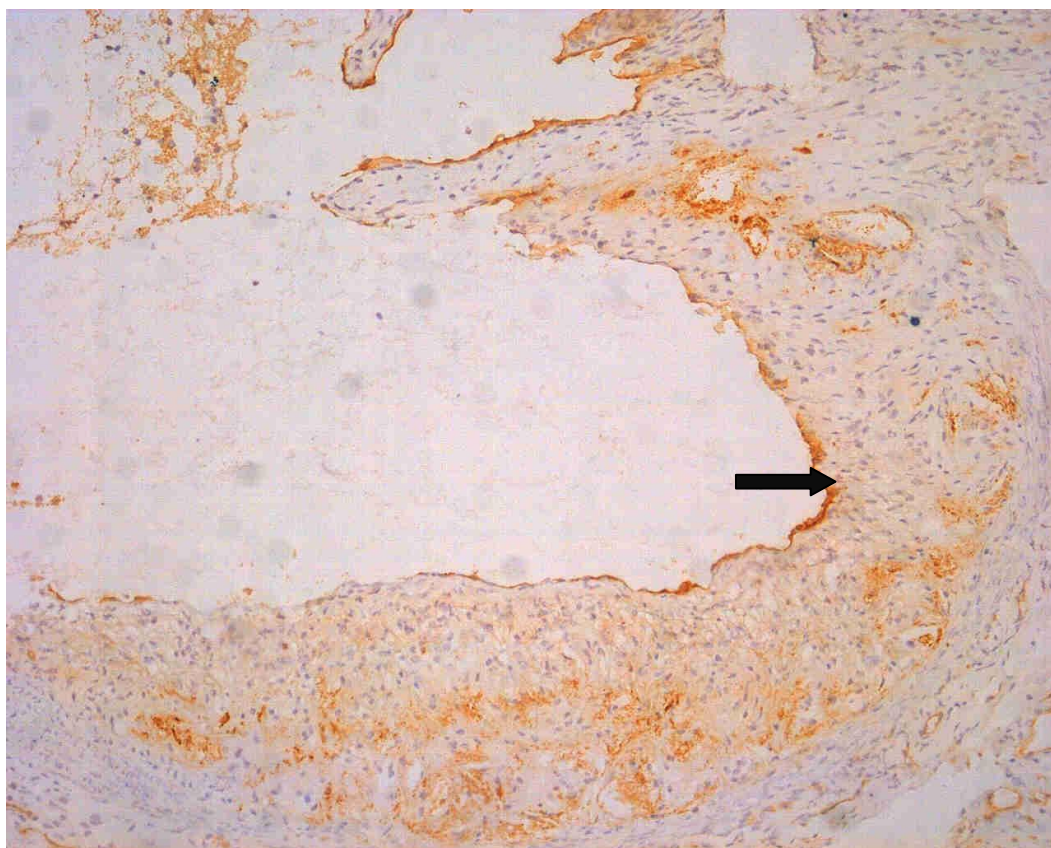
Obr. 13: Barvení olejovou červení u skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta společně se Calculus Bovis. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní. Intenzita a plocha barvení olejovou červení se zdá být srovnatelná s kontrolní skupinou. Zvětšení preparátu 40x.



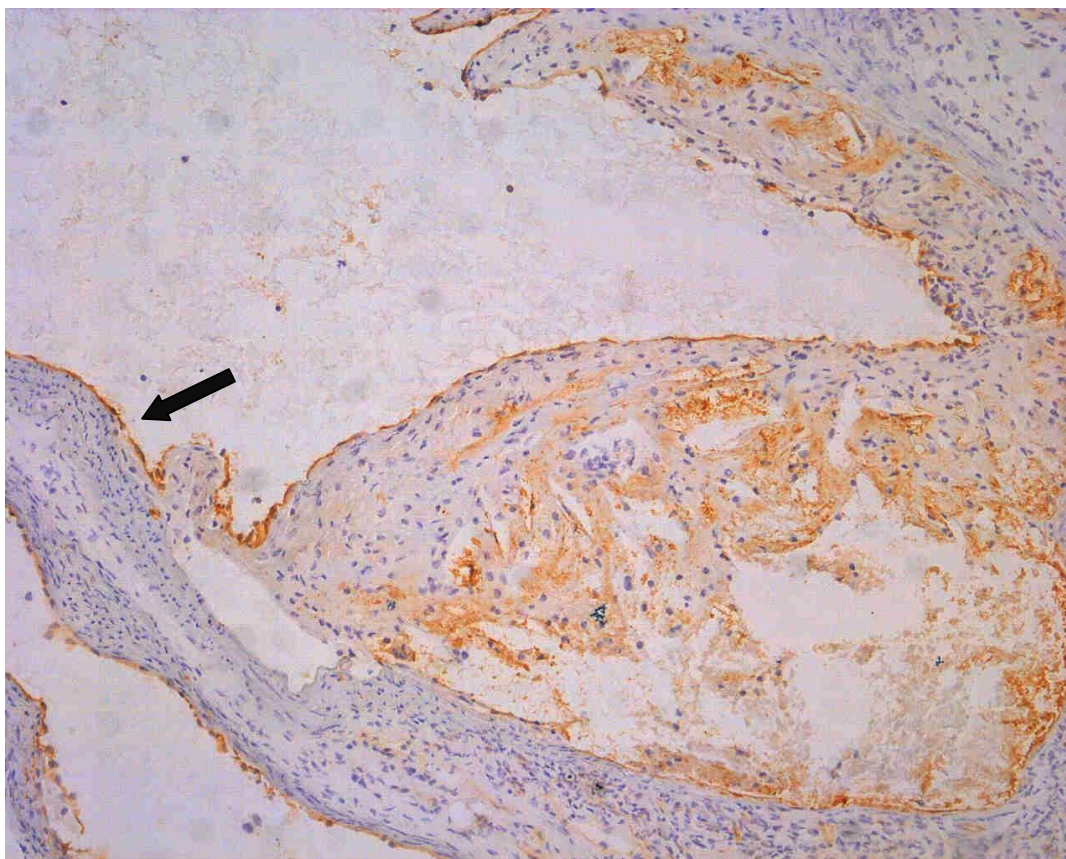
5.3. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ eNOS V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU

Expresie endoteliální NO syntázy byla pozorována u obou skupin zvířat. Silná exprese byla pozorována na cévním endotelu a to jak na povrchu aterosklerotického plátu tak i mimo něj (viz obr. 14). Dále byla u některých cév pozorována exprese v aterosklerotických plátech, což poukazuje na expresi některými buňkami uvnitř plátu (viz obr. 15).

Obr. 14: Imunohistochemické barvení eNOS u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je pozorována v aterosklerotickém plátu, slabší exprese pak na cévním endotelu (šipka). Zvětšení 100x.



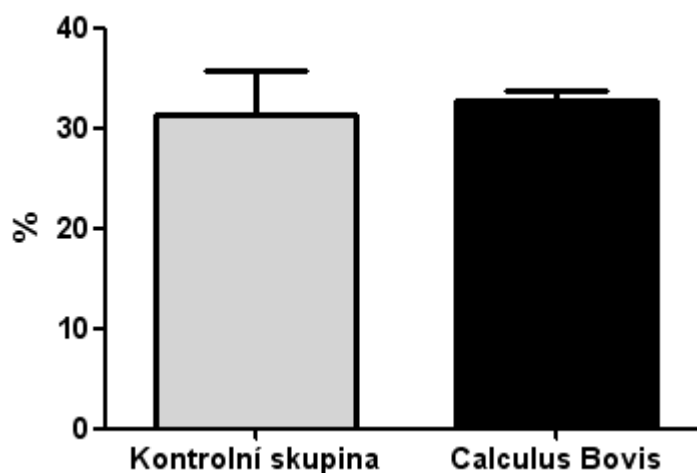
Obr. 15: Imunohistochemické barvení eNOS u skupiny zvířat, kterým byl podáván Calculus Bovis. Silná exprese je pozorována v aterosklerotickém plátu, a také na cévním endotelu. Intenzita barvení se zdá být srovnatelná s kontrolní, neléčenou skupinou. Zvětšení 100x.



5.4. STEREOLOGICKÁ ANALÝZA HISTOLOGICKÉHO BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ

Stereologická analýza prokázala, že 8 týdenní podávání Calculus Bovis neovlivnilo statisticky významně velikost aterosklerotických plátů posuzováno plochou barvení olejovou červení (viz graf 2).

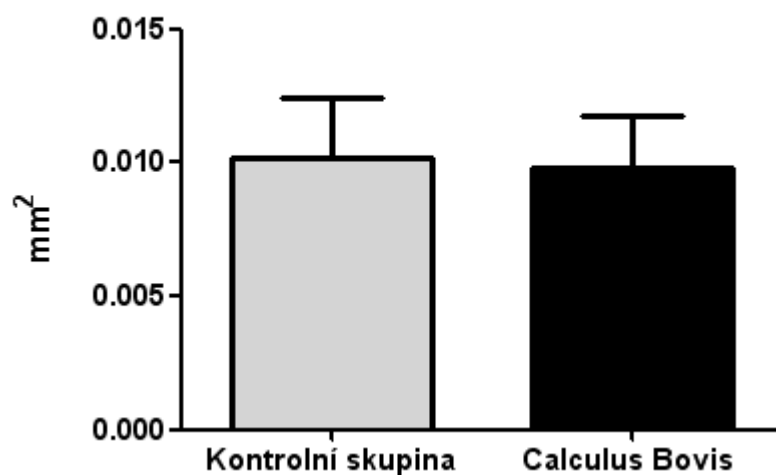
Graf 2: Stereologická analýza velikosti plochy barvení olejovou červení. Podávání Calculus Bovis nevedlo k signifikantnímu ovlivnění velikosti aterosklerotických plátů ve srovnání s kontrolní skupinou.



5.5. STEREOLOGICKÁ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ eNOS

Stereologická analýza exprese eNOS byla provedena pouze na cévním endotelu, z toho důvodu, abychom selektivně zachytili expresi endotelem bez ohledu na celkovou expresi v intimě. Stereologická analýza endoteliální exprese eNOS neprokázala vliv podávání Calculus Bovis ve srovnání s kontrolní skupinou (viz graf 3).

Graf 3: Stereologická analýza pouze endoteliální exprese eNOS v cévní stěně. Podávání Calculus Bovis nevedlo ke změně endoteliální exprese eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou.



6. DISKUSE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze [30]. V souvislosti se zánětem se intenzivně studuje úloha adhezivních molekul, složek imunitního systému, ale i dalších faktorů modifikujících zánětlivou reakci, které tak obecně participují na rozvoji a vzniku klinických komplikací aterosklerózy. Studium aterogenních změn na morfologické úrovni je dnes často doplňováno používáním různých morfometrických metod, které se snaží detekované aterogenní změny objektivizovat. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze.[31].

Transgenní myši poskytují vynikající příležitost studovat vzájemné ovlivňování genů během aterogeneze. Jako první úspěšně vymazaný gen u myši byl apolipoprotein E (apoE) [32]. Postupně vznikla celá řada dalších myších modelů s upravenými geny. Například LDL KO myši, což jsou modely s inaktivovaným ligandem pro LDL receptor [33]. Dále pak hepatic-lipase KO myši exprese lidského apoB100 a CETP. Tyto modely vyvíjejí léze všech fází s morfologickými charakteristikami blízce podobnými člověku na stejných místech cévního stromu. Aterosklerotické léze mají několik společných charakteristických rysů jako u člověka. ApoE-KO myši jsou nejčastěji používané experimentální modely aterosklerózy [34].

ApoE jsou tvořeny primárně v játrech a mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE-deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá – jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků, obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myši se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také

fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech, léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneurysmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly [35].

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky *statiny*.

Nicméně bylo také prokázáno, že je stále snaha najít nová léčiva, či dietární doplňky, které by přinesly pozitivní vliv na aterogenní proces.

Tato rigorózní práce byla tedy zaměřena na sledování účinků Calculus Bovis, na aterogenezi u apoE-deficientním myším modelu krměným aterogenní dietou.

Calculus Bovis (Niuhuang) představuje substanci používanou v tradiční čínské medicíně přes 2 tisíce let. Jedná se v podstatě o drcené sušené hovězí žlučové kameny společně s některými žlučovými kyselinami [36]. Jedna práce již prokázala vliv podávání Calculus Bovis na proliferaci hladkých svalových buněk u potkanů [37]. Nicméně hlavní účinnou složkou Calculus Bovis je bilirubin, který je známý mnohými pozitivními účinky, zejména jako silné antioxidační agens. Kromě toho byly u této substance nalezeny také protizánětlivé účinky. Vzhledem k tomu, že oba výše zmíněné účinky hrají významnou roli v procesu aterogeneze naší snahou bylo ověřit, jestli je skutečně proces aterogeneze u apoE-deficientních myší nějak ovlivněn.

V této rigorózní práci jsme ukázali, že 8 týdenní aplikace Calculus Bovis apoE-deficientním myším neovlivnilo žádný ze sledovaných parametrů lipidového spektra. Tento účinek se dal celkem očekávat především z toho důvodu, že zatím není znám žádný hypolipidemický efekt Calculus Bovis. V této souvislosti nás dále zajímalo, jestli

případný až 50% obsah bilirubinu Calculus Bovis může ovlivnit aterogenní proces v cévní stěně. Účinky bilirubinu jsou velmi dobře známé. Bilirubin má silné antioxidační a protizánětlivé účinky, takže jsme předpokládali jeho možný vliv na aterogenezi v cévní stěně. Podávání Calculus Bovis však neovlivnilo velikost aterosklerotických plátů ve srovnání s kontrolní skupinou.

Z hlediska funkce a stavu endotelu jsme se zaměřili na studium endoteliální NO syntázy. Tento enzym je klíčový z hlediska endoteliální produkce oxidu dusnatého [23]. Oxid dusnatý má mnoho pozitivních funkcí ve vztahu k cévnímu endotelu. Má vazodilatační, antiadhezní, antiproliferační účinky. Je produkován právě eNOS, který je sice do jisté míry konstitutivní enzym, nicméně jeho exprese je ovlivněna řadou faktorů, které ovlivňují proces aterogeneze jako např. zvýšená hladina LDL cholesterolu, oxidační stres a další [22]. Snížená exprese eNOS je také základním markerem rozvoje endoteliální dysfunkce.

V této rigorózní práci jsme zjistili, že endoteliální exprese eNOS nebyla po podávání Calculus Bovis ovlivněna.

Tato rigorózní práce se zabývala vlivem Calculus Bovis na parametry lipidového spektra a aterogenezi ve stěně cévy u apoE-deficientních myší. Podávání Calculus Bovis však nevedlo k ovlivnění parametrů lipidového spektra, velikosti plátů nebo endoteliální exprese eNOS. Tento neúspěch podávání Calculus Bovis může pravděpodobně souviset s tím, že šlo o pilotní projekt a zvolená dávka bude pravděpodobně velmi nízká.

7. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce se zabývala vlivem Calculus Bovis na parametry lipidového spektra a aterogenezi ve stěně cévy u apoE-deficientních myší.

Podávání Calculus Bovis však nevedlo k ovlivnění parametrů lipidového spektra reprezentovaného celkovým cholesterolem, VLDL, LDL, HDL a TAG.

Podávání Calculus Bovis nevedlo ani k ovlivnění velikosti plátů, vyjádřeno plochou barvení olejovou červení.

Podávání Calculus Bovis také nevedlo k ovlivnění endoteliální exprese eNOS ve stěně cévy.

Tento neúspěch podávání Calculus Bovis může pravděpodobně souviset s tím, že šlo o pilotní projekt a zvolená dávka bude pravděpodobně velmi nízká.

8. LITERATURA

- [1] Dargel R. [Lipoproteins and the etiopathogenesis of atherosclerosis]. *Zentralbl Allg Pathol* 1989; 135:501-4.
- [2] Daubresse JC. [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux* 2000; 21:A359-62.
- [3] Brasen JH, Niendorf A. [Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance]. *Pathologe* 1997; 18:218-27.
- [4] Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA *et al.* Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2333-40.
- [5] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H *et al.* A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107:1255-62.
- [6] Dowell FJ, Hamilton CA, Lindop GB, Reid JL. Development and progression of atherosclerosis in aorta from heterozygous and homozygous WHHL rabbits. Effects of simvastatin treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1152-60.
- [7] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3:63-8.
- [8] Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K *et al.* The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 1998; 4:135-9.
- [9] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- [10] Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; 69:S30-7.
- [11] Laurila A, Bloigu A, Nayha S *et al.* Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2910-3.
- [12] Hallan S, de Mutsert R, Carlsen S *et al.* Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis* 2006; 47:396-405.
- [13] Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G. [Novel risk factors for atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and cholesterol as predictors of peripheral arteriopathy]. *Ital Heart J Suppl* 2001; 2:1031-3.

- [14] Muntner P, He J, Astor BC *et al.* Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:529-38.
- [15] McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW *et al.* Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation* 2001; 103:1546-50.
- [16] Catena C, Novello M, Lapenna R *et al.* New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a). *J Hypertens* 2005; 23:1617-31.
- [17] Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1048-54.
- [18] Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1217-25.
- [19] Coniglio RI, Colombo O, Vasquez L *et al.* [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. *Medicina (B Aires)* 1997; 57:21-8.
- [20] Lind L. Lipids and endothelium-dependent vasodilation--a review. *Lipids* 2002; 37:1-15.
- [21] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS *et al.* Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:842-51.
- [22] Cannon RO, 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998; 44:1809-19.
- [23] Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P *et al.* Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199:8-17.
- [24] Dusting GJ, Fennessy P, Yin ZL, Gurevich V. Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998; 25:S34-41.
- [25] Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M *et al.* Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria. *Eur J Pharmacol* 1999; 380:37-48.

- [26] Ikeda U, Maeda Y, Shimada K. Inducible nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Clin Cardiol* 1998; 21:473-6.
- [27] Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M *et al.* Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* 2004; 18:609-11.
- [28] Gryglewski RJ, Chlopicki S, Swies J, Niezabitowski P. Prostacyclin, nitric oxide, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748:194-206; discussion 206-7.
- [29] Taylor AL. Endothelial dysfunction and nitric oxide enhancing therapy: a new approach to the treatment of heart failure. *Congest Heart Fail* 2004; 10:237-42.
- [30] Dansky HM, Barlow CB, Lominska C *et al.* Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1662-7.
- [31] Mareckova Z, Heller S, Horky K. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 1999; 45:46-50.
- [32] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW *et al.* ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; 14:133-40.
- [33] Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996; 272:685-8.
- [34] Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55:503-17.
- [35] Hofker MH, Breuer M. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 1998; 110:63-78.
- [36] Cai H, Guang Y, Liu L. The protective effects of in vitro cultivated calculus bovis on the cerebral and myocardial cells in hypoxic mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27:635-8.
- [37] Mizuno M, Chung HJ, Maruyama I, Tani T. Inhibitory effects of bezoar bovis on intimal formation and vascular smooth muscle cell proliferation in rat. *Am J Chin Med* 2005; 33:439-47.