

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE



FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Vliv vybraných hypolipidemik na iniciaci aterogenního procesu u
experimentální modelu aterosklerózy**

Hradec Králové, 2006

Mgr. Petra Nejtková

PODĚKOVÁNÍ

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení rigorózní práce a poskytnuté rady. Dále chci poděkovat Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. a celé katedře biologických a lékařských věd za to, že mi umožnili zabývat se tématem této diplomové práce.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	5
1. Úvod	7
2. Teoretická část	9
2.1 Mikroskopická anatomie cév.....	9
2.2 Biologická funkce endotelu za fyziologických a patologických podmínek.....	12
2.3 Endoteliální dysfunkce.....	19
2.4 Endoglin.....	20
2.5 Ateroskleróza.....	21
2.5.1 Rizikové faktory aterosklerózy.....	21
2.5.2 Patofyziologie aterosklerózy.....	25
2.6 Statiny v léčbě hyperlipidemií.....	32
2.6.1 Mechanismus účinku statinů.....	32
2.6.2 Atorvastatin.....	33
2.6.3 Farmakokinetické údaje atorvastatinu.....	34
2.6.4 Extralipidové účinky statinů.....	35
2.7 Apolipoprotein E.....	40
3. Cíl práce	43
4. Experimentální část	44
4.1 Zvířata a předepsaná dieta.....	44
4.2 Biochemická analýza.....	45
4.3 Imunohistochemie.....	45
4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí.....	47
4.5 Statistická analýza.....	48

5.	Výsledky	49
5.1	Biochemická analýza.....	49
5.2	Imunohistochemické barvení endoglinu u apoE-deficientních myší.....	50
5.3	Stereologická analýza exprese endoglinu u apoE-deficientních myší.....	52
6.	Diskuse	53
7.	Závěr	56
8.	Seznam použité literatury	57

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
Ang-II	angiotensin-II
AP-1	transkripční faktor aktivátor protein-1
apoE	apolipoprotein E
apoE ^{-/-} myš	myš s deficitem apolipoproteinu E
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovine serum albumin
BMI	body mass index, index tělesné hmotnosti
CD105	endoglin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CRP	C - reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin tetrahydrochlorid
EDHF	endotelium-derivovaný hyperpolarizační faktor
GTP	guanosintrifosfát
HLA II	histokompatibilní antigeny třídy II
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
NOS	NO syntáza
FPP	farnesylpyrofosfát
GGPP	geranylgeranylpyrofosfát
HDL	high density lipoprotein , lipoproteiny o vysoké hustotě
HMG-Co A	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
ICAM-1	intercellular cell adhesion molekule 1
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1	interleukin 1

IL-6	interleukin 6
LDL	low density lipoprotein, lipoproteiny o nízké hustotě
LDLR	receptor pro LDL
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1
NF- κ B	nukleární faktor- κ B
NO	oxid dusnatý
OCT	optimal cutting temperature, zmrazovací směs
oxLDL	oxidované lipoproteiny o nízké hustotě
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr: pH 7,4
PDGF	platelet-derived growth factor, trombocytární růstový faktor
PECAM - 1	platelet endothelial cell adhesion molekule
PGI ₂	prostacyklin
TAG	triacylglyceroly
TGF- β	transformační růstový faktor β
TNF	tumor nekrotizující faktor
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
VLDLR	receptor pro VLDL

1. ÚVOD

Ateroskleróza je difúzní proces, který začíná v časném dětství, postupně asymptomaticky progreduje a v dospělosti se klinicky manifestuje jako ischemická choroba srdeční, ischemické poškození centrálního nervového systému a periferní cirkulace.¹

Ve vyspělých zemích Evropy a Severní Ameriky je dnes ateroskleróza nejčastější příčinou smrti, má za následek 50% všech úmrtí, přičemž ve 20-25% jde o samotnou sklerózu věnčitých tepen srdce. Ve vyspělých zemích ale četnost začala prudce stoupat a ateroskleróza se stala epidemií 20. století. Avšak zatímco ve státech s dříve nejvyšším postižením (USA, Finsko, Velká Británie) začala incidence počátkem 70. let klesat (zřejmě jako důsledek osvěty, tj. boje proti rizikovým faktorům), v České republice i v ostatních postkomunistických zemích Evropy stále stoupá a již v 80. letech převýšila hodnoty v USA. Česká republika dnes bohužel patří v úmrtnosti na aterosklerózu na přední místa ve světě.²

Ateroskleróza je složitý proces, při němž se postupně zužuje cévní lumen. Uvnitř cévy se hromadí celulární a extracelulární hmota, dochází k obstrukci cévy. Proces má tři stádia. Prvním stádiem se vyznačuje tvorbou tukových proužků. Je charakterizováno přítomností makrofágů, které pohltily tuk (pěnové buňky), ty se nachází v subendoteliálním prostoru. Ve druhém stádiu dochází k tvorbě fibrózních plaků. Ty se skládají z materiálu, který vznikl nekrózou pěnových buněk, ten pokrývá fibrózní čepička obsahující hladkosvalové buňky a kolagen. Konečným stádiem je komplexní léze s tvorbou trombů, depozity fibrinu a destiček.³

Rizikové faktory aterosklerózy jsou jednak endogenní, jednak exogenní (získané a tedy potenciálně ovlivnitelné). K endogenním faktorům patří věk, pohlaví a rodinná dispozice. Mezi získané faktory patří hyperlipidémie, hypertenze, kouření, diabetes

mellitus a dále nedostatek tělesného pohybu, nadváha a stres. Čím více rizikových faktorů je přítomno, tím větší je pravděpodobnost vzniku aterosklerózy. Ateroskleróza však může vzniknout i u osob bez zjevných rizik.²

Velmi důležitou skutečností je fakt, že od roku 1992 dochází i u nás k poklesu úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění. Při analýzách těchto příznivých změn je největší význam připisován zavádění nejnovějších diagnostických a léčebných postupů a v neposlední řadě prevenci, změnám životního stylu a ovlivnění rizikových faktorů.⁴

Tato rigorózní práce byla zaměřena na studium vybraných markerů endoteliální dysfunkce u geneticky modifikovaného kmene myši a možnostem ovlivnění této dysfunkce atorvastatinem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Systém krevních cév se skládá z následujících součástí: ze srdce, arterií, kapilár a vén. Krevní cévy se obvykle skládají z několika vrstev neboli tunik.

A) Tunica intima – sestává se z vrstvy endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cév. Tyto buňky jsou uloženy na bazální lamině. Pod endotelem se nachází subendotelová vrstva řídkého vaziva, která může příležitostně obsahovat elementy hladkého svalstva.

B) Tunica media – se skládá především ze šroubovitě vinutých koncentrických vrstev hladkých svalových buněk. Mezi hladkými svalovými elementy se nachází množství elastických a kolagenních vláken a proteoglykanů. Zdrojem tohoto extracelulárního materiálu jsou hladké svalové buňky. V arteriích odděluje intimu od medie lamina elastica interna. Lamina, tvořená elastinem, je opatřena průchody (fenestracemi), které umožňují difúzi substancí a výživy buňkám uloženým v hloubi arteriální stěny. V tepnách většího kalibru se často setkáváme s tenčí lamina elastica externa, která odděluje medii od zevní tunica adventitia. V kapilárách a postkapilárních venulách je tunica media zastoupena buňkami, zvanými pericyty.

C) Tunica adventitia – adventicie je tvořena podélně orientovanými kolagenními a elastickými vlákny. Vrstva adventicie postupně přechází do vaziva orgánů, kterým céva prochází. V tunica adventitia se dále nachází vasa vasorum, tukové buňky, lymfatické cévy, fibroblasty a nervy.

Pohyb krve v oběhovém systému kromě srdce zajišťují krevní cévy. Distribuují krev k jednotlivým orgánům (tepny), umožňují přístup krve k jednotlivým tkáním a buňkám (kapiláry) a zprostředkují návrat zpět k srdci (vény).

A) Arterie se podle velikosti dělí na arterioly, svalové arterie středního a velkého kalibru a velké arterie elastického typu.

1) Arterioly – mají obecně průměr menší než 0,5mm a relativně úzký průsvit. Jejich lumen je vystláno endotelovými buňkami. Subendotelová vrstva je velmi tenká a vnitřní elastická blanka s výjimkou velkých arteriol zcela chybí. Svalová medie je tvořena 1-5 cirkulárně uspořádanými vrstvami hladkých svalových buněk. Adventicie je tenká a nemá vyvinutou zevní elastickou blanku.

2) Arterie svalového typu – většina arterií v lidském těle je právě tohoto typu. Intima je shodná s arterioly, subendotelová vrstva je však tlustší a může obsahovat i hladké svalové buňky. Membrána elastica interna je zřetelně vyvinuta. Medie může obsahovat svalové elementy, jejich množství se snižuje s velikostí průsvitu cévy. Buňky jsou proloženy různým počtem elastických membrán, retikulárních vláken a proteoglykany. Membrána elastica externa je přítomna jen ve větších svalových arteriích. Adventicie obsahuje kolagenní a elastická vlákna, fibroblasty, tukové buňky, lymfatické cévy, vasa vasorum a nervy.

3) Velké arterie elastického typu – obsahují velké množství elastinu v medii. Intima je silnější než v arteriích svalového typu, je vystlána endotelovými buňkami. Subendotelová vrstva je silně vyvinuta, její vazivová vlákna jsou důležitá pro kontrakci a dilataci tepen. Medie sestává z řady perforovaných, koncentricky uspořádaných elastických membrán, jejich počet narůstá s věkem, sílí s dalším

ukládáním elastinu. Mezi elastickými lamelami se nachází hladké svalové buňky a retikulární vlákna. Tunica adventitia nemá zevní membránu, je málo vyvinutá a obsahuje elastická a kolagenní vlákna.

B) Žíly (vény) představují rezervoár, ve kterém se neustále nachází 70% celkového objemu krve. Žíly dělíme na venuly, vény malého, středního a velkého kalibru.

1) Venuly - mají průměr 0,2-1 mm. Intima se skládá z endotelu, dále z tenké medie a adventicie. Adventicie je nejsilnější a je tvořena vazivem, které je bohaté na kolagenní vlákna. Stěny jsou tenké.

2) Vény malého a středního kalibru - mají průměr 1-9 mm. Intima má někdy subendotelovou vrstvu. Medie se skládá z malých svazečků hladkých svalových buněk smíšených s retikulárními vlákny a jemnou síťovinou vláken elastických. Kolagenní vrstva adventicie je dobře vyvinuta.

3) Velké vény - mají dobře vyvinutou intimu. Tunica media je tenčí, obsahuje hladké svalové buňky a vazivo. Adventicie je nejsilnější, obsahuje svazky hladké svaloviny. Velké vény jsou uvnitř opatřeny chlopněmi.

C) Kapiláry (vlásečnice) - umožňují výměnu metabolitů mezi krví a okolními tkáněmi. Skládají se z jediné vrstvy endotelových buněk. Mají v průměru malý průsvit, kolísá od 7 do 9 μm . Jejich délka se obvykle pohybuje mezi 0,25 až 1 mm. Podél kapilár a venul jsou rozmístěny pericyty. Pericyty obsahují aktin, myosin a tropomyosin, a tudíž tyto buňky mají kontrakční schopnost. Kapiláry a postkapilární venuly jsou obklopeny tenkou vrstvou kolagenních vláken, která je ekvivalentem adventicie větších krevních cév.⁵

2.2 BIOLOGICKÁ FUNKCE ENDOTELU ZA FYZIOLOGICKÝCH A PATOLOGICKÝCH PODMÍNEK

Cévní endoteliální buňky jsou z anatomického hlediska jednovrstevnou buněčnou strukturou, která tvoří hranici mezi cirkulující krví a okolními tkáněmi. V současnosti je endotel pokládán za jeden z největších a nejaktivnějších endokrinních orgánů, který hraje klíčovou roli při udržování vitálních fyziologických funkcí.

Endoteliální buňky vylučují různé faktory a reagují na podněty jak vazodilatační, tak i vazokonstrikční, udržují rovnováhu mezi faktory, které ovlivňují růst v oblasti cévní stěny (např. hypertrofie a proliferace buněk hladkého svalstva), reagují na řadu zánětlivých mediátorů, vstupují do interakcí s faktory urychlujícími hemostázu a trombózu.

Struktura endoteliálních buněk a regulace cévní permeability

Endoteliální buňky jsou vybaveny kompletním kontraktálním aparátem, který obsahuje vlákna aktinu, myozinu, tropomyozinu a α -aktinu.⁶ Celistvost endotelu je zajišťována mezibuněčnými spoji, přítomností elektrostatického náboje a složením bazální membrány. Pro udržení správné permeability cév jsou nejdůležitější mezibuněčné spoje.⁷

Dle struktury a funkce rozlišujeme tyto typy mezibuněčných spojů:

- 1) Zonula occludens neboli tight junctions – patří mezi nejtěsnější spojení mezi buňkami. Těsné spoje jsou velmi časté mezi mozkovými buňkami, kde jsou součástí hematoencefalické bariéry.⁸
- 2) Nexy neboli gap junctions – se uplatňují při vzájemné komunikaci endoteliálních buněk.⁹
- 3) Zonula adherentes neboli adherentes junctions – jsou ovlivňovány řadou zánětlivých substancí, které je často rozrušují a zvyšují tak cévní permeabilitu.

Tyto spoje ovlivňují složení a funkci těsných spojů i nexů a jsou proto důležité pro udržení cévní permeability.¹⁰

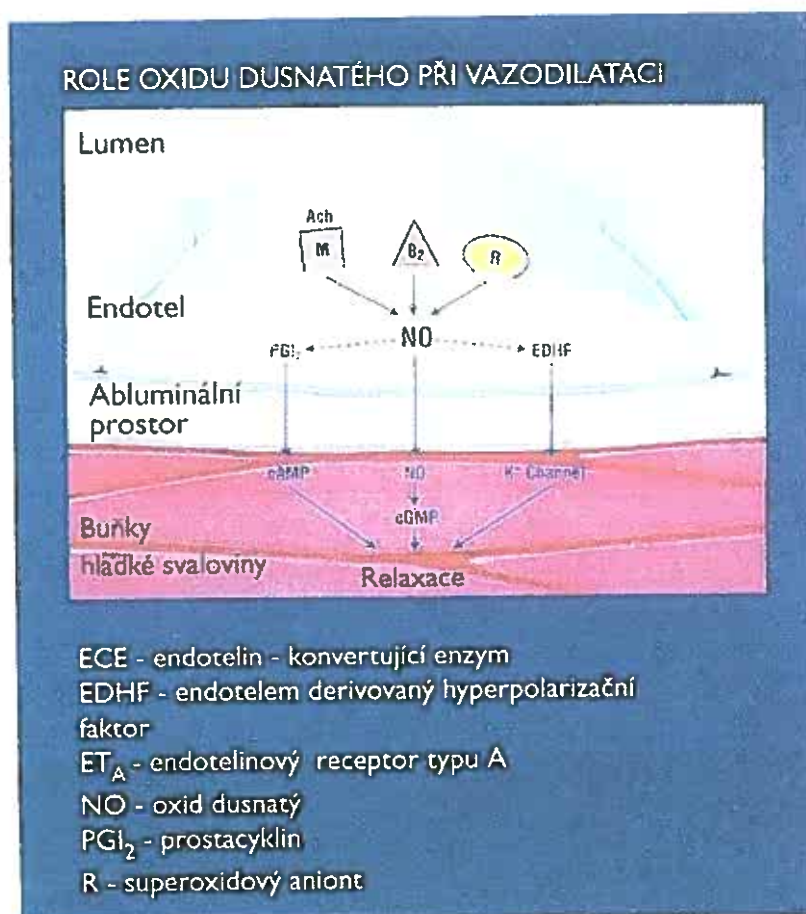
Oxid dusnatý (NO) a regulace napětí cévní stěny

Za fyziologických okolností endoteliální buňky trvale uvolňují malé množství NO a účastní se tak regulace klidového napětí cévní stěny (viz Obr. 1).⁶

Mezi nejvýznamnější stimulatory NO patří mechanické vlivy,¹¹ hormon acetylcholin, ale také řada látek uplatňujících se při hemokoagulaci, jako je serotonin, ADP (adenosindifosfát) a trombin.

Některé zánětlivé cytokiny, jako tumor nekrotizující faktor (TNF)¹², nebo oxidovaný LDL (oxLDL) tvorbu NO endotelem snižují.

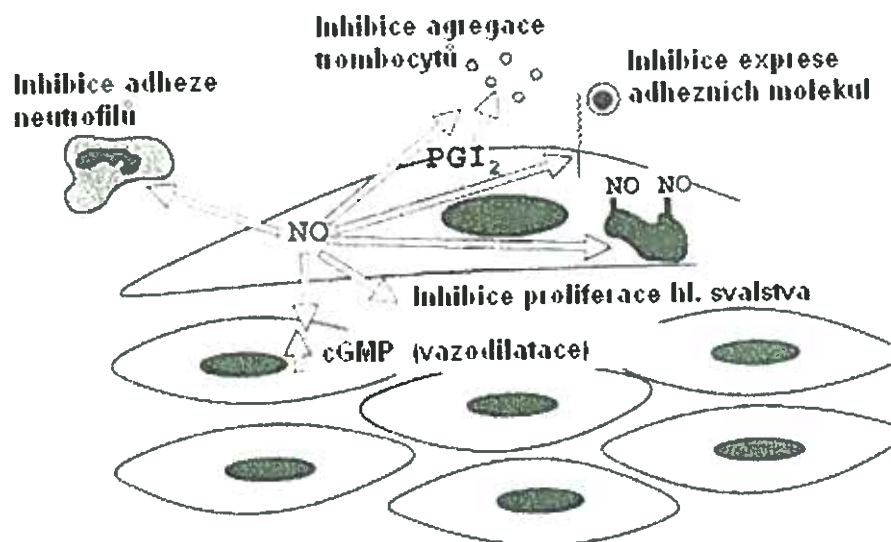
Obr. 1: Role NO při vazodilataci⁶



V podmínkách experimentální hypoxie dochází v důsledku zvýšené produkce NO k poklesu vylučování trombocytárního růstového faktoru PDGF (platelet derived growth factor). Za patologických podmínek byl v oblasti aterosklerotického plátu pozorován jev opačný – zvýšená produkce PDGF snižuje vylučování NO, v důsledku toho cévní segment postižený aterosklerózou není schopen fyziologické vazodilatace. Při ateroskleróze je tedy lumen cévy zúženo jednak samotným sklerotickým plátem, zároveň ale k omezení průtoku přispívá i omezená schopnost dilatace v důsledku poklesu produkce NO v oblasti sklerotického plátu. Kromě omezení vazodilatace má dlouhodobé lokální snížení produkce NO za důsledek rovněž vzestup agregace trombocytů, zvýšenou adhezivitu leukocytů a podílí se také na remodelaci cévní stěny.⁶

NO je vysoce difúzní plyn, syntetizovaný rodinou enzymů, které jsou společně nazývány syntázy NO (NOS). Vzniklý NO reaguje s guanylylcyklázou, což vede ke vzniku cGMP (cyklický guanosinmonofosfát) z GTP (guanosintrifosfát). Výsledné zvýšení cGMP působí na proteinkinázy, cyklické nukleotidfosfodiesterázy, iontové kanály a další proteiny. Tyto účinky vedou ke snížené odpovědi na kontraktální a proagregační agonisty. Následně vyvolává NO hyperpolarizaci hladké svaloviny cév. cGMP inhibuje adhezi a migraci monocytů a inhibuje proliferaci buněk hladkého svalu a fibroblastů, což jsou účinky, které přispívají k jeho antiaterogenní úloze (viz **Obr.2**).⁶

Obr. 2: Význam a funkce NO v oblasti cévní stěny⁶



NO tedy způsobuje vazodilataci, inhibuje adhezi a agregaci krevních destiček, neutrofilních leukocytů a monocytů, inhibuje expresi adhezních molekul.¹³

Ostatní vazodilatační látky

Kromě NO produkují endoteliální buňky celou řadu dalších vazodilatačních látek, mezi nejlépe probádané patří prostacyclin (PGI₂), endothelium-derivovaný hyperpolarizační faktor (EDHF) a bradykinin (viz **Obr. 1**).⁶

EDHF stimuluje uvolňování draselných iontů z buněk hladkého svalstva v cévní stěně a způsobuje vazodilataci.

Bradykinin má přímý vazodilatační účinek, z dlouhodobého hlediska brání vaskulární remodelaci, tlumí proliferaci buněk hladkého svalstva cévní stěny a brání adhezenci makrofágů, stimuluje též vylučování tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) endoteliemi, působí tím antitromboticky.⁶

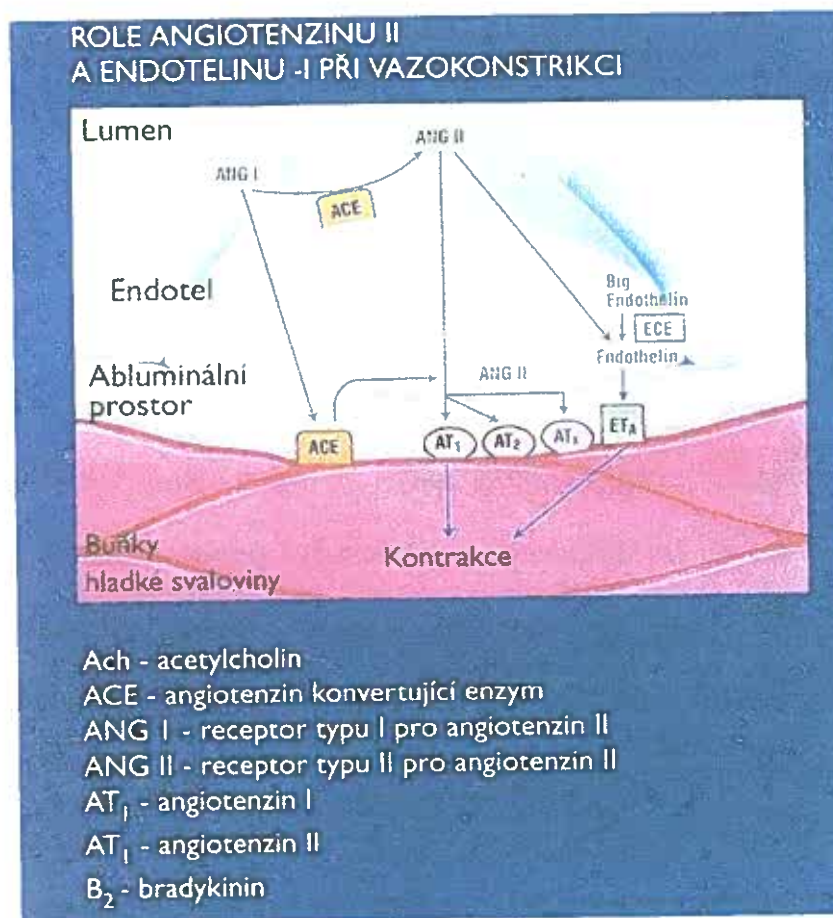
Vazokonstrikce

V zájmu zachování stability existuje ve všech biologických systémech rovnováha dvou antagonistických systémů – protiváhou vazodilatace je vazokonstrikce.

Vazokonstrikci vyvolávají například kyselina arachidonová, prostaglandin H₂, trombin, nikotin, ale také vysoké intracelulární koncentrace draslíku a vápníku. Významný vazokonstrikční účinek mají superoxidové anionty nebo metabolit kyseliny arachidonové – tromboxan A₂ a endoperoxidy. Tyto látky jsou vysoce reaktivní, vedou k oxidaci lipoproteinů a poškozují buněčné membrány. Omezení produkce NO a jeho zvýšené odbourávání v důsledku reakce se superoxidy proto urychlují progresi aterosklerózy.

V některých případech, například u hypertenze, dochází k nadprodukci vazokonstrikčních látek samotnými endoteliemi. Jedná se například o angiotenzin-II (ang-II), endotelin a některé vazokonstrikční prostanoidy. Všechny tyto látky mají přímý vazokonstrikční účinek.

Obr. 3: Role angiotenzinu-II a endotelinu-1 při vazokonstrikci⁶



Ang-II vzniká na povrchu endoteliálních buněk a jeho vazokonstrikční účinek je založen na přímém působení na buňky hladkého svalstva cévní stěny. Ang-II svým působením na buňky endotelu vede k uvolnění jednoho z nejmocnějších vazokonstriktorů – endotelinu. Produkci endotelinu vyvolává také trombin, adrenalin a vasopresin.⁶ Ang-II zvyšuje expresi adhezních molekul, podílí se na aktivaci makrofágů a T-lymfocytů a stimuluje proliferaci a hypertrofii svalových buněk.¹⁴

Endotelin se díky vlastnímu vazokonstrikčnímu účinku a stimulaci tvorby NO a PGI₂ podílí na udržování klidového cévního tonu. Endotelin je také aktivátor makrofágů, stimuluje proliferaci hladkých svalových buněk¹⁵ a zvyšuje expresi některých adhezních molekul. Zvýšené plasmatické hladiny byly pozorovány u pacientů s hypercholesterolemií¹⁶ a byla objevena i zvýšená exprese endotelinu

v aterosklerotických lézích. Vazokonstrikční účinek endotelinu je mnohonásobně větší než účinek ang-II (viz Obr. 3).¹⁷

Endoteliální buňky a hemokoagulace

Za fyziologických podmínek se endoteliální buňky podílejí na udržování rovnováhy mezi trombózou a fibrinolýzou.⁶ Dokonalá souhra hemokoagulace a fibrinolýzy je životně důležitou funkcí. Funkční endotel je nesmáčivým povrchem, což je zajištěno produkcí NO, který brání adhezi trombocytů a leukocytů.¹⁸

Endotelie brání vzniku trombózy jednak syntézou glykosaminoglykanů, které inaktivují prokoagulační faktory (faktor X a trombin), ale rovněž produkcí trombomodulinu. Trombomodulin váže trombin a konvertuje ho na aktivátor proteinu C (aktivovaný protein C inaktivuje koagulační faktory Va a VIIIa a působí tak antikoagulačně), zároveň váže inhibitor plazminogen aktivátoru (PAI) a napomáhá tím trombolýze.

Životně důležitou funkcí buněk endotelu je schopnost produkovat tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a zároveň i jeho inhibitor – inhibitor aktivátoru plazminogenu. Ang-II má schopnost tuto citlivou rovnováhu vychylovat ve prospěch trombózy.

Prostacyklin a NO mají schopnost inhibovat aktivitu trombocytů, jejich adhezivitu a agregabilitu.⁶

Endoteliální buňky a zánět

Produkcí interleukinů, adhezních molekul a cytokinů se endotel zapojuje do regulace imunitní a zánětlivé reakce. Působí tak na interakce mezi stěnou cévy a leukocyty.¹⁸

Akutní zánětlivá reakce je charakterizována zvýšenou adhezí leukocytů k endoteliálním buňkám a prudkým zvýšením mikrovaskulární permeability. Tyto procesy jsou stimulovány superoxidovými ionty, NO tyto zánětlivé procesy naopak pomáhá zpomalovat.

Na akutní zánět reagují endotelové buňky zvýšenou expresí molekul, které pomáhají zvyšovat adhezi povrchových leukocytárních receptorů. U nemocných s aterosklerózou stimuluje oxLDL produkci těchto specifických adhezních molekul (např. vascular cell adhesion molecule –1 - VCAM-1), zároveň stimuluje produkci celé řady dalších faktorů, které vedou ke zvýšené místní akumulaci zánětlivých buněk.⁶

Interakcí s leukocyty se endoteliální buňky výrazně podílejí na rozvoji zánětlivé reakce a to zejména díky zvýšené expresi adhezních molekul ze skupiny selektinů, integrinů a imunoglobulinů.¹⁹

2.3 ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE

Endoteliální dysfunkce je stav charakteristický nerovnováhou mezi vazodilatačně a vazokonstrikčně působícími faktory, mezi antikoagulačně a prokoagulačně působícími činiteli a mezi inhibitory a promotory růstu. Jde o generalizovaný defekt řady fyziologických pochodů zajišťovaných endotelem.

Poškození endotelu může být způsobeno mechanicky (fyzikálně), jako například turbulentním proudním u arteriální hypertenze, a nebo biochemickými stimuly – například hypercholesterolemií, diabetem nebo kouřením. Působením těchto podnětů je zvýšení oxidativního stresu s nadbytečnou tvorbou oxidových aniontů, které NO a prostacyklin předčasně degradují. Dochází i k útlumu NO syntázy, což dále vede ke snížení dostupnosti NO.²⁰

Endoteliální dysfunkce je charakterizována zvýšenou permeabilitou endotelu, sníženou syntézou a uvolňováním NO, zvýšenou expresí adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1, selektiny) a cytokinů. Tyto změny vedou k přechodu monocytů do cévní stěny, mění se na makrofágy a po akumulaci LDL cholesterolu na pěnové buňky. Přítomnost oxidovaných lipoproteinů je pak spouštěcím mechanismem pro zánětlivou reakci.²¹

Endoteliální dysfunkce vede k vyšší proliferaci a migraci buněk hladké svaloviny s remodelací cévní stěny a ztrátou pružnosti. Sklon k trombotickým okluzím je dán zvýšenou aktivací trombocytů a zvýšenou tvorbou tkáňového faktoru a trombinu.²⁰

2.4 ENDOGLIN

CD105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu transformačního růstového faktoru-beta (TGF- β). Bylo prokázáno, že endoglin také moduluje signalizaci TGF- β prostřednictvím interakce s TGF- β receptorem I nebo II.²²

Endoglin je převážně tvořen v cévních endoteliálních buňkách a jeho tvorba se zvyšuje při hypoxii. Dále byla jeho exprese detekována u makrofágů, hladkých svalových buněk a fibroblastů. Endoglin je považován za významný marker angiogeneze, a tudíž je jeho exprese významná jak v embryonálním vývoji, tak také při procesu hojení ran, při infarktech a během kancerogeneze.²³ Jeho zvýšená exprese je dávana do souvislosti s horší prognózou nádorového onemocnění. Mutace genu pro endoglin navíc vede k rozvoji hereditární hemorrhagické telangiektázie.²⁴

Vzhledem k tomu, že bylo popsáno, že endoglin může modulovat účinky TGF- β , který je považován za významný antiaterogenní faktor, myslíme si, že změny jeho exprese mohou hrát roli v procesu aterogeneze.²²

2.5 ATEROSKLERÓZA

Při rozvoji aterosklerózy a jejích komplikací se uplatňuje řada tzv. rizikových faktorů podporujících vlastní aterogenezi a mnohdy i trombogenezi. Oba tyto procesy se totiž uplatňují v patogenezi cévních onemocnění. Ateroskleróza vede k postupnému zužování průsvitu cévy a ke ztrátě nesmáčivého povrchu endotelové výstelky, zatímco trombus, vytvořený na tomto terénu, pak vyvolá rychlý uzávěr cévy.²⁵

2.5.1 Rizikové faktory aterosklerózy

Rizikové faktory dělíme na neovlivnitelné (endogenní) a ovlivnitelné (exogenní).

- 1) K neovlivnitelným faktorům patří: věk, pohlaví a rodinná dispozice.

Věk

Věk má zásadní vliv. Časné změny aterosklerózy začínají již v dětství, ale klinicky se onemocnění projevuje až v dospělosti, u mužů dříve než u žen. Křivka výskytu pak stoupá s každou dekádou až do stáří.² Za rizikový považujeme z hlediska ischemické choroby srdeční (ICHS) věk 45 let a vyšší u muže a 55 let a vyšší u ženy. U ženy se věková hranice pro riziko aterosklerózy snižuje, je-li žena po menopauze a neužívá substituční dávky estrogenů.⁴

Pohlaví

Muži jsou postiženi obecně více než ženy. Rozdíl je nejvýraznější ve středním věku, kdy např. úmrtnost na koronární ischemickou chorobu srdce je u žen pětkrát nižší než u mužů. Vysvětlení je v protektivním vlivu ženských pohlavních hormonů,² které souvisí s vyššími koncentracemi HDL cholesterolu u žen. Pozitivní vliv estrogenů není omezen pouze na lipidový efekt. Příznivý vliv je uváděn i na endotel a další mechanismy.⁴

Rodinná dispozice

V některých rodinách je zřetelná dispozice k ateroskleróze a k ICHS. Jde většinou o geneticky podmíněnou poruchu metabolismu lipoproteinů s vysokou hladinou krevních lipidů – familiární hypercholesterolemii a dyslipoproteinemii.²

Za pozitivní rodinnou anamnézu z hlediska předčasné aterosklerózy považujeme výskyt infarktu myokardu nebo náhlé smrti u otce ve věku nižším než 55 let, u matky je věkovou hranicí 65 let.

Nemocný po infarktu myokardu je nejvíce ohrožen recidivou a dalšími komplikacemi. ICHS je tedy nejvýznamnějším rizikovým faktorem.⁴

2) Mezi ovlivnitelnými faktory jsou čtyři označeny jako hlavní rizikové faktory: hyperlipidemie, hypertenze, kouření cigaret a diabetes mellitus. Z nich samotná hyperlipidemie je faktor nejzávažnější.

Hyperlipidemie

Jde hlavně o hypercholesterolemii. Čím je vyšší hladina cholesterolu v séru, tím je větší riziko aterosklerózy. Hypercholesterolemie bývá spojena s vysokými hladinami

lipoproteinů s nízkou denzitou (LDL, VLDL) a nízkými hladinami lipoproteinů s vysokou denzitou (HDL). HDL má vůči ateroskleróze ochranný význam, odstraňuje cholesterol z intimy. Vysoká hladina sérového cholesterolu je důsledkem jednak genetických vlivů, jednak dietního režimu – nadměrné spotřeby živočišných tuků, vajec, živočišných bílkovin a jednoduchých cukrů, a naopak nízkého příjmu vysokomolekulárních cukrů a vláknin. Nejzávažnější genetickou zátěží je familiární hypercholesterolemie s autozomálně dominantní dědičností. U homozygotů se klinicky projevuje většinou infarktem myokardu již před 20. rokem života, u heterozygotů pak ve středním věku.

Hypercholesterolemie provází i některé choroby – diabetes mellitus, hypotyreózu a nemoci ledvin s nefrotickým syndromem.²

Hypertenze

Arteriální hypertenze nad 140/90 mmHg je považována za jeden z nejdůležitějších rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění.⁴

Kouření cigaret

Kouření cigaret výrazně zvyšuje výskyt ICHS i úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění. Kouření cigaret s nižším obsahem nikotinu riziko nesnižuje.⁴ Nebezpečí stoupá s léty kouření a počtem denně vykouřených cigaret. Hlavními aterogenními činiteli v cigaretovém kouří, kteří působí škodlivě na endotel, jsou oxid uhelnatý a nikotin.²

Z hlediska sekundární prevence ICHS je podstatné, že po zanechání kouření se riziko další koronární příhody snižuje po relativně krátké době několika měsíců prakticky na úroveň nekuřáka.⁴

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, inzulinová rezistence a hyperinzulinismus i porušená glukózová tolerance jsou spojeny s předčasnou manifestací aterosklerózy.⁴

Nebezpečí infarktu myokardu je u diabetiků 2-3x vyšší než u nediabetiků. Nejvýraznější je však rozdíl u aterosklerotické gangrény dolních končetin, která je u diabetiků až 100x častější.²

Diabetes představuje mimořádně významný rizikový faktor a nemocní musí být v odhadu rizika klasifikováni stejně, jako by měli ICHS.⁴

Obezita

Očekávaná délka života je vyšší při BMI v rozmezí 20-25. Obezita je faktorem pro manifestaci dalších důležitých rizikových faktorů (hypertenze, hyperlipidémie s nízkým HDL cholesterolem), jednak je samostatným nezávislým rizikovým faktorem ICHS. Rizikovější je v oblasti břicha než v oblasti hýždí.⁴

Homocystein

Homocystein je neesenciální aminokyselina, která hraje důležitou roli v metabolismu methioninu.⁴ Homocystein je toxický k endotelu, je protrombotický, zvyšuje produkci kolagenu a snižuje schopnosti NO. Plasmatické koncentrace homocysteinu jsou lehce zvýšené u mnoha pacientů, kteří nemají enzymatické defekty v metabolismu homocysteinu. Tito pacienti mají zvýšené riziko symptomatické aterosklerózy věnčitých a periferních mozkových arterií. Léčba kyselinou listovou může vrátit jejich plasmatické koncentrace k normálním hodnotám.²⁶

Další rizikové faktory

Jde hlavně o nedostatek tělesného pohybu (pohyb zvyšuje hladinu HDL), stresový způsob života a hyperurikémii.²

Vyskytuje-li se u jedince několik rizikových faktorů současně, jejich efekt se nesčítá, ale násobí.⁴

2.5.2 Patofyziologie aterosklerózy

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění. Díky vysoké plasmatické koncentraci cholesterolu (zejména cholesterolu o nízké hustotě – LDL), který je hlavním rizikovým faktorem aterosklerózy, uvažovali mnozí, že proces aterosklerózy do velké míry spočívá v akumulaci lipidů ve stěně artérie. Nicméně tento proces je mnohem složitější.

Četná pozorování u lidí i živočichů vedla k formulaci hypotézy o reakci na poškození, která původně předpokládala, že prvním krokem v ateroskleróze je poškození endotelu. Nejposlednější verze této hypotézy spíše upřednostňuje vznik a rozvoj endoteliální dysfunkce před pouhým poškozením endotelu.²⁶

Schéma aterogeneze

Leukocyt má tendenci rolovat po endotelu. Dochází k tomu prostřednictvím vzájemného kontaktu molekul selektinů na endotelové buňce a oligosacharidových molekul na leukocytech. Následuje pevná adheze leukocytu na endotel díky molekulám z řady imunoglobulinů VCAM-1 a ICAM-1. Vazebnou složku tvoří integriny, které se zvýšeně exprimují až při aktivaci endotelu. Pro proniknutí leukocytu do subendotelu mezi endotelovými buňkami je zapotřebí molekula PECAM-1 (ve velkém množství je v meziendotelových spojích). Na invazi leukocytů do cévní stěny se velkou měrou

podílejí chemokiny, chemotaktické cytokiny, které hrají roli v řízení pohybu a aktivaci leukocytů.²⁷

Určitá místa arterií, jako jsou bifurkace a oblouky způsobují charakteristické změny v toku krve. Změny v krevním průtoku se zdají být rozhodující v určení, která místa cév mohou být náchylná k tvorbě lézí. Pohyb a adheze monocytů a T-buněk na těchto místech je výsledkem up-regulace adhezních molekul jak na endotelu, tak i na leukocytech.²⁶

Endoteliální dysfunkce vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti endotelu. Zvyšuje se tak adhezivita (s přičiněním leukocytů a krevních destiček) a i propustnost (permeabilita) endotelu. Endotel má tedy spíše koagulační než antikoagulační schopnosti a vytváří vazoaktivní molekuly, cytokiny a růstové faktory. Pokud není zánětlivá odpověď účinně kompenzována a nejsou odstraněny napadající agens, může proces dále pokračovat. Takto stimuluje zánětlivá odpověď migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny, ty se prolínají s oblastí zánětu a vytváří intermediární (střední) lézi. Pokud tato reakce pokračuje trvale, může způsobit ztlustění stěny tepny, které je později kompenzováno postupnou dilatací, tudíž průsvit cévy zůstává ještě nezměněn.

Odpověď je dále způsobena a usměrňována makrofágy vzniklými z monocytů a specifickými subtypy T-lymfocytů. Aktivace těchto buněk vede k uvolnění hydrolytických enzymů, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, které způsobují další poškození a popřípadě vedou k místní nekróze. Akumulace mononukleárních buněk, migrace a proliferace buněk hladké svaloviny a vznik fibrotické tkáně vedou k dalšímu zvětšení a restrukturalizaci léze. Ta začíná být pokryta vazivovým krytem (čepičkou), který překrývá jádro (je tvořeno lipidovou a nekrotickou tkání) a vzniká tzv.

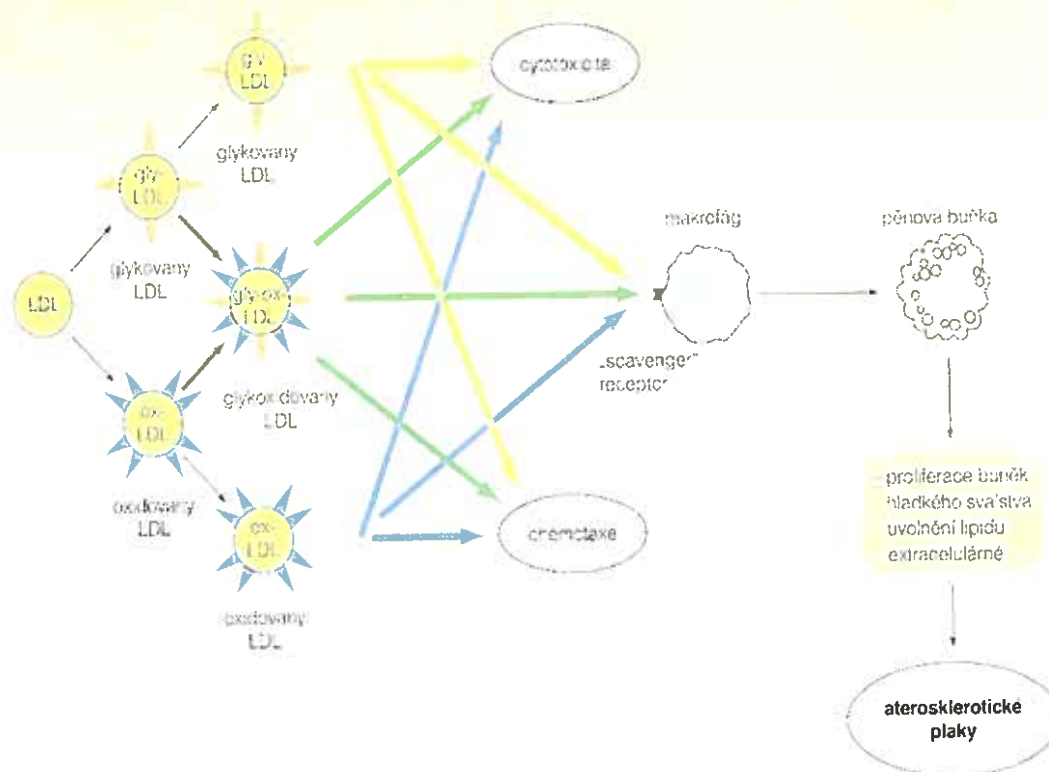
komplikovaná léze. V tomto okamžiku již céva dále nemůže kompenzovat tuto situaci dilatací, vyklenuje se do lumen cévy a omezuje krevní průtok.²⁶

Lipoproteiny

Lipoproteinové částice jsou tvořeny tukem a bílkovinou. Bílkovinná součást se nazývá apolipoprotein nebo apoprotein. Fungují jako transportní formy krevních lipidů.⁴

LDL je hlavní příčinou poškození endotelu a pod ním ležící hladké svaloviny. LDL může být modifikován oxidací, glykací u diabetes mellitus, agregací a spojením s proteoglykany nebo včleněním do imunitních komplexů. Když jsou částice LDL zachyceny v arterii, mohou projít progresivní oxidací a být pohlceny makrofágy a to díky specifickým (scavengerovým) receptorům na povrchu těchto buněk. Pohlcení vede ke vzniku lipidových peroxidů a usnadňuje nahromadění esterů cholesterolu. Jakmile je LDL modifikován a pohlcen makrofágy, mění se na pěnové buňky. Odstranění modifikovaného LDL je důležitou součástí úvodní ochranné úlohy makrofágů v zánětlivé odpovědi a minimalizuje účinek modifikovaného LDL na buňky endotelu a hladké svaloviny. Oxidovaný LDL je chemotaktický pro další monocyty a může regulovat kolonie stimulační faktor makrofágů a monocytární chemotaktický protein produkovaný buňkami endotelu. Rozšiřuje tedy zánětlivou odpověď vstupem nových monocytů do lézí (viz **Obr. 4**).²⁶

Obr. 4: Modifikace LDL v procesu aterogeneze²⁸



Zánětlivé mediátory (např. $\text{TNF}\alpha$, interleukin-1 a makrofág kolonie stimulující faktor) zvyšují vazbu LDL na endotel a hladkou svalovinu a zvyšují transkripci genu receptoru pro LDL.

Antioxidanty, jako např. vitamin E, mohou redukovat vznik volných radikálů. Zvyšují rezistenci LDL k oxidaci. V preklinických studiích bylo zjištěno, že příjem vitaminu E nepřímo úměrně souvisí s výskytem infarktu myokardu, omezuje a snižuje výskyt srdečních příhod.

Zvýšenou lipooxygenázovou aktivitu má ang-II, který může zvýšit zánět a oxidaci LDL. Hypertenze má prozánětlivé účinky a zvyšuje tvorbu peroxidu vodíku a volných radikálů (jako např. superoxidový anion a hydroxylový radikál) v plasmě. Tyto substance snižují tvorbu NO endotelem, zvyšují adhezi leukocytů a zvyšují periferní rezistenci.²⁶

Monocyty

Monocyty, prekurzory makrofágů, jsou přítomny v každé fázi aterogeneze. Makrofágy produkují cytokiny, chemokiny, molekuly regulující růst, metaloproteinázy a další hydrolytické enzymy. Vznik a množení mononukleárních buněk v lézích závisí na faktorech, jakými jsou makrofág-kolonie stimulující faktor a granulocyty-makrofág kolonie stimulující faktor. Vystavení makrofág-kolonie stimulujícímu faktoru umožňuje makrofágům přežít *in vitro* a pravděpodobně se i rozmnožovat v lézích. Naopak, některé zánětlivé cytokiny (např. interferon-gama aktivovaný makrofágy) jim umožňují průběh programované buněčné smrti (apoptózy).

Původně se uvažovalo, že jediné buňky, které rostou v průběhu expanze aterosklerotických lézí, jsou buňky hladké svaloviny. Ale množení makrofágů má stejnou důležitost. Schopnost makrofágů produkovat cytokiny (jako např. TNF- α , interleukin-1 a TGF- β), proteolytické enzymy (například metaloproteinázy) a růstové faktory (zejména růstový faktor tvořený destičkami a růstový faktor podobný insulinu-1) může být rozhodující v úloze těchto buněk při poškození a obnově při rozvoji aterosklerotických lézí.

Aktivované makrofágy zastupují třídu II histokompatibilních antigenů (HLA II), které umožňují prezentovat antigeny T-lymfocytům. T-buňky jsou aktivovány, když naváží antigen vyprodukovaný makrofágy. Aktivace T-buňky má za následek sekreci cytokinů, včetně interferonu-gama a TNF- α a β , které zesilují zánětlivou odpověď. Buňky hladké svaloviny v lézích mají také na svém povrchu molekuly třídy HLA II (pravděpodobně vytvořené interferonem-gama) a mohou tedy vytvářet antigeny T-buňkám.

V aterosklerotických lézích se ve všech stádiích nachází jak CD4, tak i CD8 T-lymfocyty.

Imunomodulační molekula, CD40 ligand, může být produkována makrofágy, T-buňkami, endotelem a hladkou svalovinou v aterosklerotických lézích in vivo. Její receptor CD40 je přítomen na stejných buňkách. Oba jsou up-regulovány v aterosklerotických lézích. U myši s deficitem apoE bylo prokázáno, že inhibice CD40 protilátkami redukuje vznik léze.²⁶

Destičky

Adheze destiček a nástěnná trombóza jsou přítomné při vzniku a vývoji aterosklerotických lézí. Destičky mohou adherovat k dysfunkčnímu endotelu, obnaženému kolagenu a makrofágům. Pokud jsou aktivovány, uvolňují cytokiny a růstové faktory, které se společně s trombinem mohou podílet na migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny a monocytů. Aktivace destiček vede k tvorbě volné kyseliny arachidonové, která může být transformována v prostaglandiny (jako je například tromboxan A₂, což je jedna z nejúčinnějších vazokonstrikčních a tromboagregačních látek), nebo v leukotrieny, které mohou zesílit zánětlivou odpověď.

Destičky jsou důležité v udržení cévní integrity a při ochraně proti spontánnímu krvácení. Aktivované destičky se mohou akumulovat na stěnách arterií a doplňovat další destičky do rostoucího trombu.²⁶

Nestabilita a ruptura plátů

Ruptura plátů a trombóza jsou významnými komplikacemi, které vedou k nestabilním koronárním syndromům.

Ruptura jako komplikace aterosklerotického plátu je hluboké prasknutí s uvolněním trombogenního materiálu do krve, kdežto u tzv. eroze mluvíme o povrchovém odstranění endotelu díky apoptóze endotelových buněk na povrchu léze.²⁹

Aterosklerotické pláty můžeme rozdělit na stabilní a nestabilní. Stabilní plát má nízký obsah tuků a nemá tendenci k ruptuře s vytvořením následné trombózy, která pak obturuje cévní lumen. Nestabilní plát je bohatý na lipidy a při okrajích často praská. Dává tak vzniknout trombóze, která se projeví akutní cévní příhodou.⁴

U pacientů s infarktem myokardu je nestabilita a ruptura plátů výsledkem eroze, ztenčení a ruptury vazivové čepičky. Děje se tak často na okrajích lézí, kudy mohou vstupovat makrofágy, kde se hromadí, aktivují a kde probíhá apoptóza. Rozpad vazivové čepičky může být také výsledkem působení metaloproteináz (jako jsou kolagenázy, elastázy a stromelyzíny). Také T-buňky mohou stimulovat produkci metaloproteináz v lézích, což způsobuje nestabilitu plátů a má za následek další imunitní odpověď. Tyto změny mohou být také doprovázeny produkcí tkáňových prokoagulačních faktorů a dalších hemostatických faktorů, které dále zesilují možnost vzniku trombózy.²⁶

Následkem ukládání plátů je zúžení cévního průsvitu, které může vést k ischemii. Dalšími následky tvorby plátů jsou ztuhnutí cévní stěny (kalcifikace), vznik trombů, které uzavírají zbylý průsvit a mohou způsobit periferní embolizaci, dále krvácení do plátů a do cévní stěny. Takto poškozená stěna může mimo jiné povolit tlaku a dokonce prasknout, takže dojde k nebezpečnému krvácení do okolní tkáně např. z aorty nebo z mozkových cév.³⁰

2.6 STATINY V LÉČBĚ HYPERLIPIDEMIÍ

První látka ze skupiny statinů byla uvedena na trh v roce 1987. Do současnosti bylo na trh uvedeno 6 statinů (lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin a cerivastatin). Užívání cerivastatinu bylo zastaveno v srpnu 2001 z důvodu výskytu několika desítek případů rhabdomyolýzy, z nichž několik skončilo fatálně.³¹

Statiny snižují incidenci infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhody v primární i sekundární prevenci u pacientů s různě závažnou hypercholesterolemií. V současné době podnítily výrazný zájem experimentální a klinické studie, které ukazují, že klinický prospěch z užívání statinů je dán nejen jejich schopností snižovat hladiny plazmatických lipidů, ale i jejich četnými extralipidovými (pleiotropními) účinky, které jsou na snížení plazmatických lipidů nezávislé.

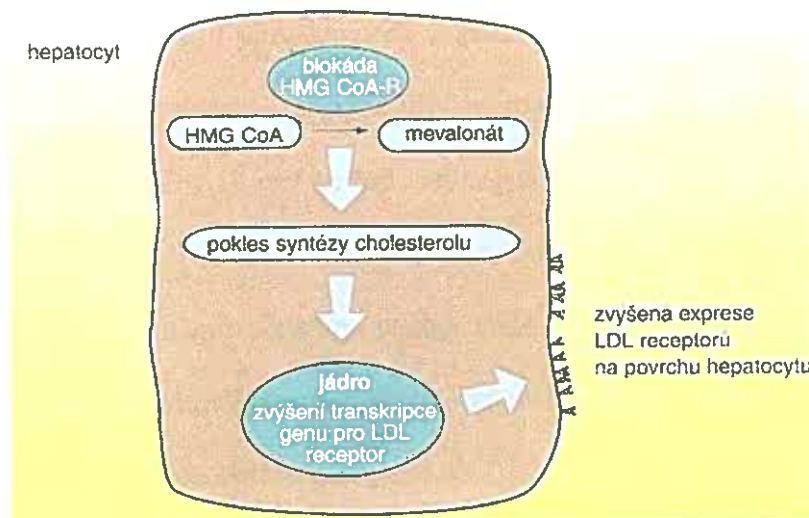
Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením (které ale souvisí se snížením syntézy cholesterolu), tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizaci ateromatózních plátů aj.³²

2.6.1 Mechanismus účinku statinů

Statiny blokují v buňkách tzv. endogenní syntézu cholesterolu na úrovni blokády jejího klíčového enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymu A reduktázy (HMG-CoA) (viz Obr. 7). Nedostatek endogenního cholesterolu v buňkách vede k expresi genů pro LDL částice, které jsou pak ve zvýšené míře vychytávány z oběhu (zejména v játrech). To má za následek pokles koncentrace LDL cholesterolu v plazmě a přímými i nepřímými mechanismy i zvýšení tzv. reverzního transportu cholesterolu z periferních tkání do jater (viz Obr. 5).³³

Obr. 5: Mechanismus účinku statinů v játrech ³⁴

Obecné schéma mechanismu účinku statinů



Zatímco hypocholesterolemický efekt statinů je poměrně dobře objasněn, není dosud jednoznačně vysvětlen mechanismus, jakým statiny snižují triglyceridy. Předpokládá se možné snížení syntézy VLDL v játrech. Dalším reálným mechanismem je zvýšení clearance a odbourávání VLDL cestou LDL receptorů. Jejich počet na povrchu hepatocytů se, jak je uvedeno výše, zvyšuje. Chylomikronové remnanty, stejně jako VLDL, obsahují totiž apolipoprotein E, který je schopen navázat lipoproteinovou částici na LDL receptor. ³⁵

2.6.2 Atorvastatin

Atorvastatin patří mezi statiny třetí generace s výbornou účinností na snižování lipidů. Je indikován k léčbě primární hypercholesterolemie, familiární hypercholesterolemie nebo smíšené hyperlipidémie, v případě, že systémová opatření nebyla dostatečně úspěšná a nevedla k dosažení cílových hodnot. V řadě klinických studií snižoval výskyt kardiovaskulárních příhod u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a u pacientů se středním až vysokým rizikem ICHS. V porovnání s ostatními

dostupnými statiny je jeho účinek srovnatelný nebo vyšší, incidence nežádoucích účinků je přitom srovnatelná s ostatními statiny.³⁶

Podávání atorvastatinu u člověka vede k poklesu plasmatických hladin LDL cholesterolu, VLDL cholesterolu, triglyceridů a apolipoproteinu B. Navíc má atorvastatin aktivní metabolity, které snižují patologicky zvýšenou oxidabilitu LDL lipoproteinů.³⁷

Atorvastatin ve srovnání s ostatními statiny vede k výraznějšímu snížení hladin celkového i LDL-cholesterolu. V terapeutických dávkách (10-80 mg denně) vede ke snížení hladiny celkového cholesterolu o 30-46% a LDL-cholesterolu o 41-61%.³⁸

2.6.3 Farmakokinetické údaje atorvastatinu

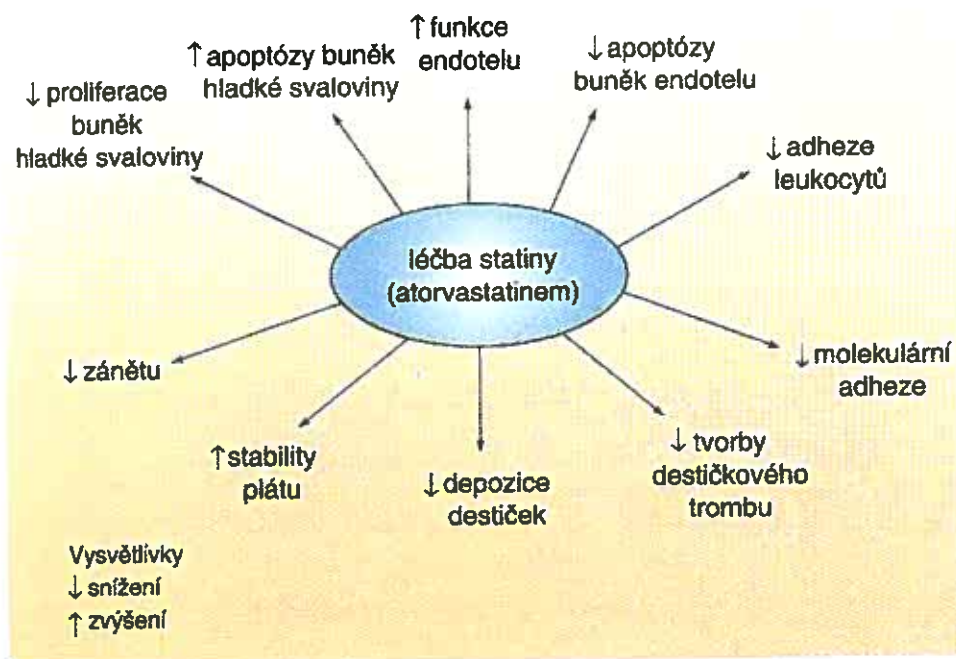
Atorvastatin se řadí mezi lipofilní statiny.³⁹ Po perorálním podání se rychle absorbuje (absolutní biologická dostupnost po perorálním podání je kolem 30%).⁴⁰ Absorpce není významně ovlivněna příjmem potravy. Většina dávky se vychytává v játrech. Dochází tak k jeho koncentraci v hlavním cílovém orgánu, kde zvyšuje počet LDL receptorů na povrchu buňky, přičemž příjem a odbourávání LDL bývá urychleno. Hypolipidemický účinek není závislý na plasmatické koncentraci, spíše souvisí s velikostí podané dávky, respektive s plasmatickou koncentrací aktivních metabolitů. Běžná terapeutická dávka se pohybuje v rozmezí 10 až 80mg, přičemž 80mg je maximální denní dávka.³⁹ Maximální plasmatické koncentrace je dosaženo během 1-2 hodin po podání. Podobně jako u většiny ostatních statinů (s výjimkou pravastatinu) se atorvastatin velmi silně váže na plasmatické bílkoviny (kolem 98%). Část podaného atorvastatinu se biotransformuje v játrech (mikrosomální oxidací prostřednictvím cytochromu P-450 a 3A4), přičemž dva z metabolitů jsou farmakologicky účinné. Atorvastatin a jeho metabolity se vylučují převážně žlučí, pouze kolem 2% podané látky

se vylučuje močí (ve formě metabolitů). Biologický poločas eliminace atorvastatinu je kolem 14 hodin a mírně se prodlužuje ve stáří (kolem 19 hodin).⁴¹ Terapeutický účinek nastupuje během 2 týdnů po zahájení léčby a maxima dosahuje po 4 týdnech terapie.⁴²

2.6.4 Extralipidové účinky statinů

Ke klinickému prospěchu z léčby statiny zřejmě přispívají jejich extralipidové účinky, které nejsou závislé na snížení koncentrace LDL cholesterolu. V současné době byly publikovány experimentální klinické práce prokazující významné účinky statinů na zánětlivou reakci, endoteliální dysfunkci, formaci trombů, stabilitu plátů, inzulínovou rezistenci a kostní formaci, což jsou mechanismy a procesy, které se uplatňují v patofyziologii aterosklerózy, ischemické cévní mozkové příhody, demence, osteoporózy nebo diabetes mellitus (viz Obr. 6).³²

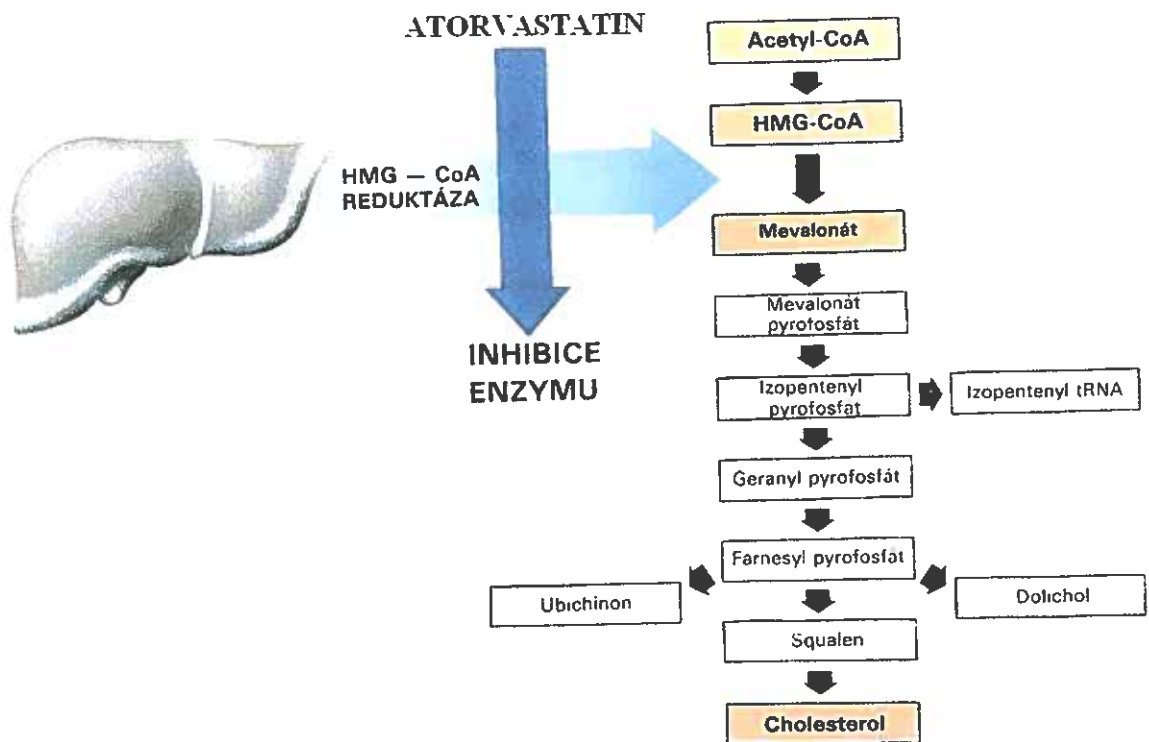
Obr. 6: Extralipidové účinky statinů⁴³



Mechanismem účinku statinů na snížení endogenní syntézy cholesterolu je blokáda přeměny HMG-CoA na mevalonát způsobená inhibicí HMG-CoA reduktázy. Tato blokáda je zřejmě zásadní i pro většinu extralipidových účinků statinů. Mevalonát je prekurzorem nejen při syntéze cholesterolu, ale i při syntéze dalších látek ovlivňujících buněčnou aktivitu a metabolismus, jako jsou hem A, dolichol, ubichinon a isoprenoidní deriváty farnesypyrofosfát (FPP) a geranylgeranylpyrofosfát (GGPP) (viz Obr. 7).³²

Obr.7: Mechanismus účinku atorvastatinu. Základní kroky v syntéze cholesterolu.

Upraveno dle⁴⁴



Zánětlivá reakce

Zánětlivý proces probíhající v cévním endotelu zvyšuje riziko kardiovaskulárních příhod a tvoří významný faktor rozvoje metabolického syndromu. V mnoha experimentálních a klinických studiích bylo zjištěno, že statiny mají protizánětlivé účinky, které se projevovaly snížením hladin CRP (C-reaktivní protein), inhibicí interakce mezi endotelovými buňkami a leukocyty a snížením počtu zánětlivých buněk v aterosklerotickém plátu. CRP je tvořen játry jako odpověď na prozánětlivé cytokiny, jako je TNF- α a interleukin-6 (IL-6) a představuje tak citlivý indikátor systémového zánětu.

CRP by sám mohl přispívat k rozvoji aterosklerózy vazbou na částečně degradované LDL částice uvnitř aterosklerotických plátů. Takto vázaný CRP aktivuje komplement, a tak urychluje tvorbu aterosklerotické léze.³²

Výsledky některých studií ukazují na to, že procentuální pokles CRP v těchto studiích neodpovídá procentuální změně koncentrace LDL cholesterolu. Pokles hladiny CRP při léčbě statiny nebyl tedy zřejmě způsoben snížením hladin cholesterolu, ale uplatnily se zde i další mechanismy.⁴⁵

Mechanismem protizánětlivého účinku je zřejmě snížení isoprenylace signálních proteinů Ras a Rho, které pak ovlivňují buněčnou produkci zánětlivých cytokinů a chemokinů.

V experimentu také statiny snižují expresi adhezních molekul, jako je ICAM-1.³²

Endoteliální dysfunkce

K primárnímu poškození endotelu dochází vlivem zánětu. Zánět vede k dalšímu vaskulárnímu poškození. Charakteristickým znakem endoteliální dysfunkce je poškozená syntéza, uvolňování a aktivita NO z endotelu.⁴⁶

Endoteliální NO významně inhibuje některé aterogenní procesy tím, že zprostředkovává vaskulární relaxaci, inhibici agregace trombocytů, inhibici proliferace hladkých svalových buněk a inhibici aktivace leukocytů. Při endoteliální dysfunkci navíc dochází k relativnímu zvýšení vazokonstrikčního účinku endotelinu-1.⁴⁷

Zvýšení celkového a LDL cholesterolu poškozuje endoteliální funkci a na endotelu závislou vazodilataci. Statiny by tedy mohly napravovat endoteliální dysfunkci u hypercholesterolemických pacientů již samotným snížením hladiny sérového cholesterolu. Nicméně se ukazuje, že ke zlepšení endoteliální dysfunkce u pacientů užívajících statiny dochází již před statisticky významným snížením sérových hladin cholesterolu.

Mechanismus, kterým statiny zlepšují stav endoteliální dysfunkce, spočívá pravděpodobně v jejich schopnosti zvyšovat expresi a aktivitu endoteliální NO syntázy.

48

Stabilita aterosklerotického plátu

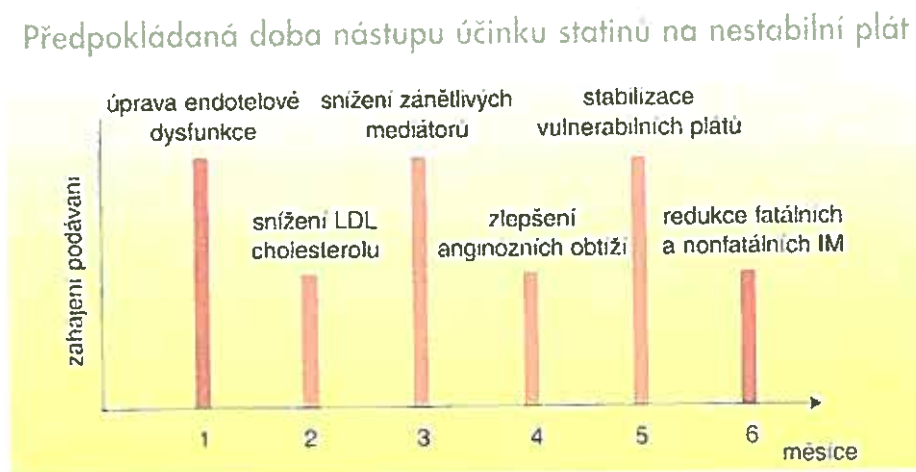
Aterosklerotické pláty s vysokým obsahem lipidů, velkým množstvím makrofágů a nízkým obsahem kolagenu mají vysoké riziko ulcerace fibrózního krytu, ruptury a krvácení dovnitř plátu.³²

V tzv. nestabilním ateromovém plátu se estery cholesterolu nacházejí zejména uvnitř tzv. pěnových buněk. Při léčbě statiny dochází díky aktivaci reverzního transportu cholesterolu do jater (zprostředkovávají zejména lipoproteiny o vysoké hustotě – HDL) k tomu, že se množství cholesterolu v plátu snižuje, ten není nadále již tolik křehký a náchylný k rupturám. Plát je zpevněn přítomností kolagenních a elastických vláken, produkovaných buňkami hladkého svalstva medie, které migrovaly do intimy v rámci reparačních změn uvnitř plátu. Dochází v něm ke snížení genové exprese a snížení aktivace metaloproteináz,³³ (zřejmě opět inhibicí syntézy mevalonátu)

enzymů degradujících mezibuněčnou matrix obsahující kolagenní vlákna. Statiny snižují tvorbu makrofágové intersticiální kolagenázy, gelatinázy a stromyelysinu.³² Tato matrix je produkována buňkami hladkého svalstva medie, které migrovaly do intimy za účelem zpevnění plátu.³³

Při stabilizaci plátu nedochází jen mechanicky k jeho zpevnění, ale zároveň dochází i k obnovení fyziologické funkce endotelu. Spočívá v normální odpovědi na dilatační podněty (zejména lokální produkce NO) a v antitrombotické aktivitě (např. zvýšení produkce tPA, snížení PAI-1 a adhezivních molekul). Na úrovni cytokinů a růstových faktorů dochází pak v plátu ke snížení počtu zánětlivých buněk, snížení aktivace makrofágů a jejich přeměny v pěnové buňky. Ve stabilizovaném plátu dochází i ke snížení exprese buněčných adhezivních molekul (VCAM-1), intercelulárních adhezivních molekul (ICAM-1) a endotelových adhezivních molekul pro leukocyty (E-selektin) (viz **Obr. 8**).³⁴

Obr. 8: Předpokládaná doba nástupu účinku statinů na nestabilní plát³⁴



Zvýšení aktivity NO syntázy trombocytů atorvastatinem vede ke snížení jejich agregability. Tento efekt přetrvává i po vysazení atorvastatinu. Dlouhodobé podávání atorvastatinu navíc zlepšuje deformabilitu erytrocytů, čímž zlepšuje reologické vlastnosti krve léčených pacientů. Atorvastatin má vliv také na koagulační mechanismy, především snižuje aktivitu faktoru VII a zvyšuje celkovou fibrinolytickou aktivitu plazmy.³⁴

2.7 APOLIPOPROTEIN E

Apolipoprotein E (apoE) je glykoprotein o 34 kD, jehož produkce převládá v hepatocytech a v menší míře v různých typech buněk, včetně makrofágů. ApoE je důležitou součástí plasmatických lipoproteinů, jakými jsou chylomikrony, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) a jejich zbytků.⁴⁹ V lidské populaci jsou přítomny tři hlavní isoformy apoE. ApoE3 je nejběžnější isoformou u lidí a pokládá se za přirozenou formu. ApoE isoformy fungují v lipoproteinovém metabolismu každá jinak. U zdravých jedinců je přítomnost apoE4 spojována se zvýšenou hladinou plasmatického cholesterolu LDL, kdežto přítomnost apoE2 se spojuje se snížením cholesterolu a LDL.
50

ApoE funguje jako ligand pro LDL receptor (LDLR). Vychytávání přes LDLR může být utlumeno u mutací v genu pro apoE, ale je poměrně necitlivé ke změnám v kvantitě apoE a k lipidovému složení částice. Mutace genu pro apoE, který způsobuje vazbu apoE na receptor pro LDL, jsou spojovány s familiární dysbetalipoproteinémií, která se vyznačuje předčasnou aterosklerózou.⁵¹

ApoE hraje rovněž rozhodující úlohu v řadě hlavních kroků metabolismu VLDL a VLDL zbytků a v rozvoji aterosklerózy. Specifická exprese apoE malým počtem hepatocytů je nezbytná pro navázání TAG (triacylglyceroly) u nově tvořených VLDL

částic. Velká exprese apoE zrychluje míru vychytávání VLDL. Lipolýza VLDL zprostředkovaná lipoproteinovou lipázou je ovlivněna jak kvantitou apoE, tak jeho kvalitou. Přebytek apoE a specifické varianty apoE způsobují pokles lipolýzy VLDL. ApoE v makrofázích je přímo zapojen do procesu aterogeneze. Navíc, velmi malé plazmatické hladiny apoE významně zvyšují schopnost plazmy přijímat buněčný cholesterol.⁵²

Myši s mutací genu pro apoE

Přestože myš, jakožto živočišný druh, je vysoce odolná vůči ateroskleróze, byly vyvinuty myši, které jsou k tomuto onemocnění citlivé.

V roce 1992 byla vyvinuta myš s deficitem apoE lipoproteinu (apoE^{-/-}). ApoE^{-/-} myši mají zpomalenou clearance cholesterolu a i při podávání diety s nízkým obsahem tuků u nich hladiny cholesterolu spontánně stoupají a to především chylomikrony a remnanty VLDL.⁵² U těchto myši tak nedochází jen k tvorbě tukových proužků, ale také k formování fibromuskulárních lézí v místech, která jsou svou lokalizací podobná lézím u člověka.⁵³

. Léze se tvořily v bázi aorty a v oblouku hrudní aorty, v místech větvení karotid, v interkostálních, mezenterických a renálních artériích a dále v koronárních, karotických, femorálních, subklaviálních a brachiocephálních artériích. Léze se začaly tvořit v 5 až 6 týdnu věku, kdy bylo pozorováno zachytávání monocytů k endotelu a následně došlo k jejich transendoteliální migraci. Tukové proužky se objevily v 10 týdnu, intermediární léze už obsahovaly pěnové buňky. Hladkosvalové buňky byly pozorovány v lézích v 15 týdnu. Fibrózní plaky byly zřetelné po 20 týdnu. Plaky se skládaly z nekrotického jádra s fibrózní čepičkou, která obsahovala hladkosvalové buňky obklopené fibrózními vlákny a kolagenem.⁵⁴

U starších myší se fibrózní plaky dále rozvíjely. U některých případů pokročilých lézí došlo k destrukci buněk podloží a vzniklo aneurysma, u jiných nastala kalcifikace fibrózní tkáně. Rozsáhlá fibroproliferace pak může zúžit lumen tak, že dojde k okluzi cévy. Komplikované léze charakterizované trombózou však nalezeny nebyly.³

3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo detekovat a kvantifikovat změny endoteliální exprese endoglinu ve stěně cévy u apoE-deficientního myšního modelu aterosklerózy. Dále byl sledován vliv krátkodobě podávaného hypolipidemika atorvastatinu na změnu v expresi endoglinu. Pro zobrazení exprese endoglinu byly využity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci jeho exprese stereologické metody.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samci kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}), vážící 15-20 gramů, byli laskavě poskytnuti Prof. Polednem (IKEM, Praha, Česká Republika), byli ustájeni v SEMEDu (Praha, Česká Republika).

4.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Všechny myši byly v 5 týdnech života ostaveny od matky, náhodně rozděleny do 4 skupin.

ApoE^{-/-} deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení standardní laboratorní stravou 4 týdny (apoE^{-/-} kontrolní 9 týdenní skupina), nebo 12 týdnů (apoE^{-/-} kontrolní 16 týdenní skupina). Ve dvou skupinách léčených atorvastatinem byly myši krmeny standardní laboratorní stravou do níž byl přidáván atorvastatin v dávce 10mg/kg/den další 4 týdny po odstavení (apoE^{-/-} atorvastatinová 9 týdenní skupina), nebo dalších 8 týdnů (apoE^{-/-} 16 týdenní skupina).

Každá z myší v atorvastatinové skupině byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6g 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 vyláčněna 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 v - 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 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce (7 μm) na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, které byly předem upravené v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C . Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy po 15 minutovém usušení vložily na 10 minut do destilované vody, následně se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). V další fázi byly na sklíčka nepipetovány roztoky anti avidinu a anti biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do roztoku 3% H_2O_2 (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) – goat anti-hamster IgG a goat anti-rat IgG (Vector Laboratories), které byly značeny biotinem a opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dále byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový

substrát (Vector Laboriem). K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na zvěř byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylen (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylen (1:10) také 3 minuty, 3x v xylen (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontovány do eukittu.

Byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) zředění 1/50.

Všechny protilátky byly zakoupeny ve firmě BD Pharmingen (California, USA).

Pracovní postup

1. nechat uschnout řezy	60 minut
2. fixace aceton (uschovaný v – 20 stupních)	15 minut
3. usušit	15 minut
4. PBS	10 minut
5. 10% zvířecí serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	30 minut
6. inkubace s avidin D	15 minut
7. oplach v PBS	5 minut
8. inkubace s biotinem	15 minut
9. PBS	oplach
10. primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
11. PBS 1	2x5 minut
12. 10% serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	15 minut
13. sekundární protilátka (+ mouse serum v PBS)	30 minut
14. PBS 3	5 minut
15. 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
16. PBS 4	2x5 minut
17. ABC komplex elite	30 minut
18. PBS 5	5 minut
19. DAB (podle návodu)	nutno určit čas
20. destilovaná voda	oplach
21. aceton	oplach
22. aceton-xylen (10:1)	3 minuty
23. aceton-xylen (1:10)	3 minuty
24. 3x xylen	2 minuty
25. Eukitt – montování krycího sklíčka	

4.4 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ

Plocha endoteliální exprese endoglinu a PECAM-1 byly kvantifikovány pomocí stereologických metod. Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μ m (0,385mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé imunohistochemické barvení byl vybrán náhodně, a pak se vybral každý jedenáctý 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 200 průsečíků mezi body sítě a aterosklerotickým plátem na jednu cévu. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P$$

kde parametr a charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a P je počet průsečíků mezi body testovací sítě a aterosklerotickou lézí.

Protilátka PECAM-1 byla použita jako marker přítomnosti endotelu. Takže plocha exprese endoglinu v endotelu byla vztažena k expresi PECAM-1 a vypočítána jako:

$$estP = \frac{area(x)}{area(PECAM)} * 100\%$$

kde x je plocha endoglinu v endotelu a plocha $PECAM$ je plocha PECAM-1 v endotelu.

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 4.82 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

4.5 STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (One Way Anova). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$ kde $\alpha=0.05$. Pokud se mezi skupinami vyskytl statisticky významný rozdíl, byl použit Tukey test pro mnohočetná porovnání.

5. VÝSLEDKY

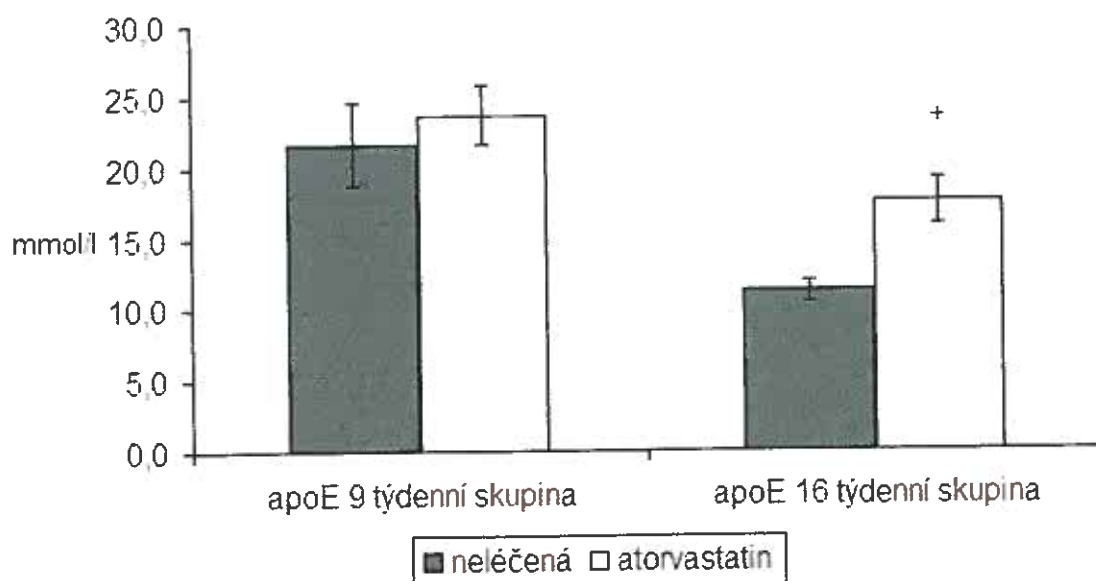
5.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu.

4 týdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladinu celkového cholesterolu u 9 týdenní skupiny ve srovnání s neléčenými zvířaty (21.62 ± 2.94 vs. 23.65 ± 2.09 mmol/l, $P = 0,558$).

Naopak, překvapivě léčba atorvastatinem po dobu 8 týdnů významně zvýšila hladinu celkového cholesterolu u 16 týdenních apoE-deficientních myší ve srovnání s neléčenými zvířaty (11.21 ± 0.75 vs. 17.51 ± 1.16 mmol/l, $P = 0.005$) (viz Obr. 9).

Obr. 9: Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. 8 týdenní podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu nárůstu celkového cholesterolu u 16 týdenní skupiny myší. ($^+ P=0.005$)

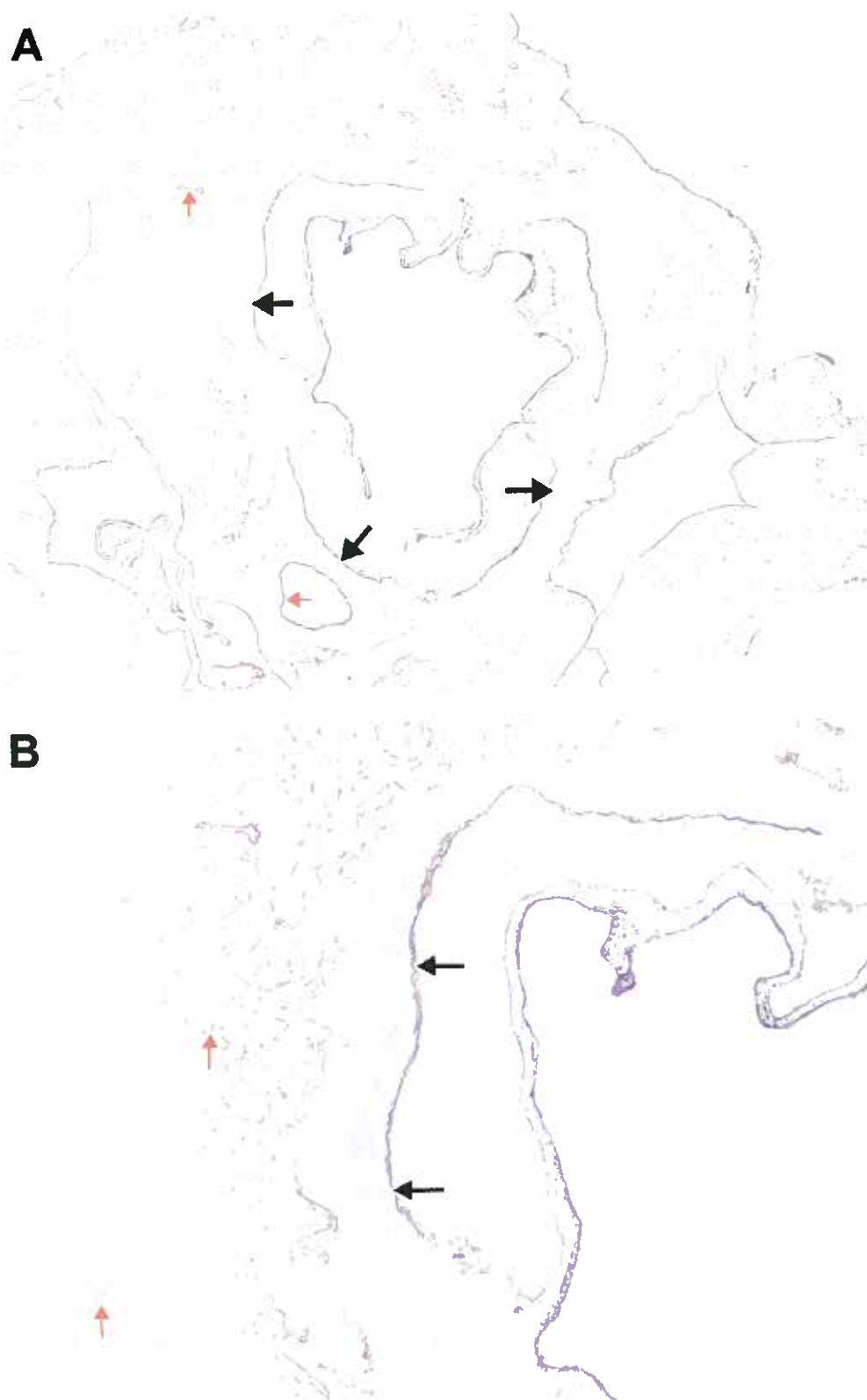


5.2 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ ENDOGLINU U APOE-DEFICIENTNÍCH MYŠÍ

U žádné myši v experimentu nebyly patrné žádné aterosklerotické léze nebo další morfologické abnormality. Expresé PECAM-1 byla pozorována u všech myší a pouze na endoteliálních buňkách a proto byla použita ke standardní detekci neporušeného endotelu.

Expresé endoglinu v experimentu byla detekována v endotelu aorty u všech zvířat. Dále byla pozorována v myokardu a to v kapilárách a v endotelu menších cév (viz **Obr. 10 A,B**). Expresé endoglinu byla podobná z hlediska lokalizace u všech myší v experimentu. Lišila se pouze z hlediska intenzity barvení.

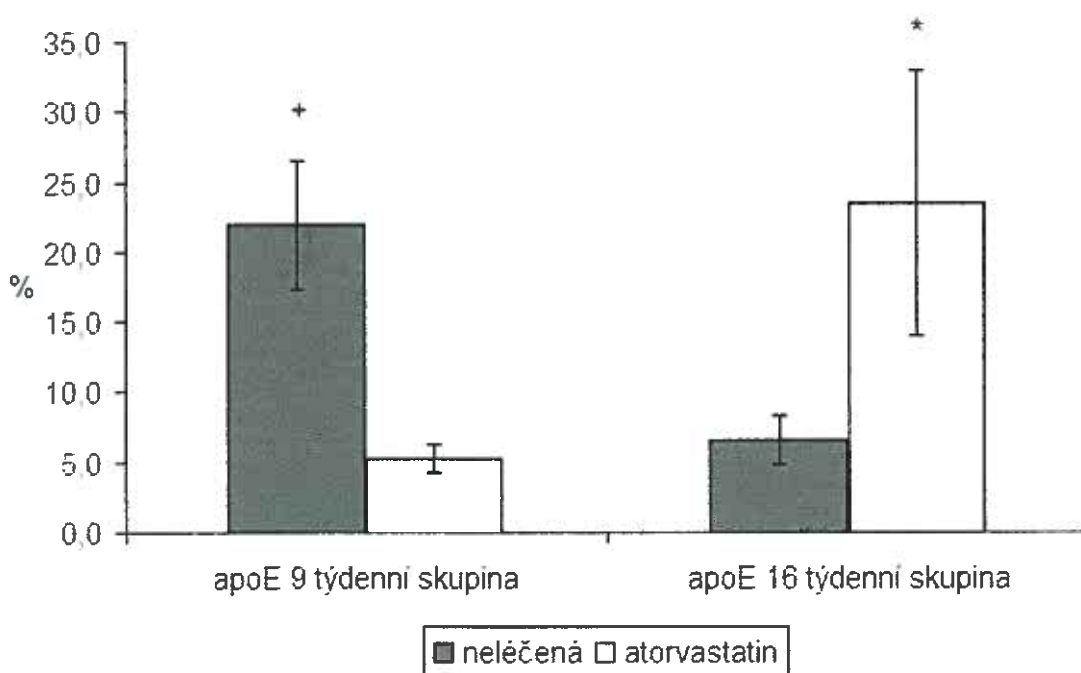
Obr.10: Imunohistochemická detekce endoteliální exprese. Exprese endoglinu byla detekována v cévním endotelu v oblasti aortálního sinu (černé šipky), a také v kapilárách a menších cévách myokardu (červené šipky) .



5.3 STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE ENDOGLINU U APOE-DEFICIENTNÍCH MYŠÍ

Stereologická analýza imunohistochemického barvení endoglinu prokázala signifikantní snížení jeho exprese po 4 týdnech podávání atorvastatinu ve srovnání s 9 týdenní neléčenou skupinou (22.0 ± 4.5 vs. 5.3 ± 1.2 %, $P^+ = 0.013$) (viz **Obr. 11**). Podávání atorvastatinu po dobu 8 týdnů mělo naopak za následek signifikantní zvýšení exprese endoglinu ve srovnání s neléčenými 16 týdenními myšmi (6.6 ± 1.5 vs. 23.5 ± 9.5 %, $*P=0.021$).

Obr. 11: Procento aktivovaných endoteliálních buněk pro endoglin v aortálním sinu a oblouku. Expresse endoglinu se signifikantně snížila po 4 týdnech podávání atorvastatinu ($^+P=0,013$). Naopak 8 týdenní podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu nárůstu exprese endoglinu ($*P=0.021$)



6.DISKUSE

Tato rigorózní práce byla zaměřena na studium exprese endoglinu v cévním endotelu u apoE-deficientního kmene myši po podávání atorvastatinu. Cílem bylo zjistit, jestli různě dlouhé podávání atorvastatinu ovlivňuje endoteliální expresi endoglinu a případně zda je toto ovlivnění spjato s hladinami celkového cholesterolu.

CD105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu TGF- β .⁵⁵ Exprese endoglinu převládá na endoteliálních buňkách, makrofázích, fibroblastech a hladkých svalových buňkách medie.⁵⁶ Kromě toho bylo demonstrováno, že exprese endoglinu je zvýšena během angiogeneze a při vývoji nádorového onemocnění. Mimoto byla exprese endoglinu zvýšena v hladkosvalových buňkách a endoteliálních buňkách v pokročilých aterosklerotických lézích v prasečích karotidách.⁵⁷

Vzhledem k tomu, že bylo popsáno, že endoglin může modulovat účinky TGF- β , který je považován za významný antiaterogenní faktor, je pravděpodobné, že by mohl takto ovlivňovat i proces aterogenze.

Statiny kompetitivně inhibují HMG-CoA reduktázu, enzym, který katalyzuje biosyntézu cholesterolu. Kromě toho současné experimentální a klinické důkazy naznačují, že další účinky nezávislé na cholesterolu (pleiotropní) zahrnují zlepšení a obnovu endoteliálních funkcí, zvýšení stability aterosklerotického plátu, snížení oxidativního stresu a zánětu a útlum trombogenních reakcí ve stěně cév.⁵⁸

ApoE-deficientní myš je v současnosti velmi používaný zvířecí model pro studium aterosklerózy, přičemž tento model vykazuje určité podobnosti s hyperlipoproteinemií typu III. u člověka. Mimoto bylo prokázáno, že podávání statinů u tohoto modelu nevede k očekávanému hypolipidemickému účinku a tudíž je možné tento model považovat za vhodný ke studiu pleiotropních účinků statinů.⁵⁹

V této rigorózní práci jsme prokázali, že 4 týdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny cholesterolu u apoE-deficientních myší. Navzdory tomuto faktu však výsledky stereologické analýzy imunohistochemického barvení povrdily, že exprese endoglinu byla signifikantně nižší u myší léčených atorvastatinem.

Na druhou stranu bylo prokázáno, že 8 týdenní léčba atorvastatinem měla za následek paradoxní vzestup plasmatického cholesterolu u apoE-deficientních myší. Tento neočekávaný jev byl vysvětlován tak, že statiny u tohoto modelu snižují clearance lipoproteinů, což má za následek, že delší podávání statinů má u těchto myší hypercholesterolemické účinky. Tento hypercholesterolemický efekt atorvastatinu měl za následek také statisticky významný nárůst exprese endoglinu v aortálním sinu a aortálním oblouku.

Někteří autoři potvrdili, že pleiotropní účinky atorvastatinu jsou zprostředkované inhibicí transkripčního faktoru NF-kappaB, který se významně podílí na regulaci exprese genů pro VCAM-1, P-selektin nebo MCP-1, které hrají důležitou roli v patogenezi aterosklerózy.⁶⁰ Rius et. al. dokázali, že NF-kappa-B by mohl regulovat transkripci endoglinu.⁶¹ Dá se tedy předpokládat, že snížení endoteliální exprese endoglinu u myší léčených 4 týdny atorvastatinem je zprostředkováno právě inhibicí NF-kappaB.

Nárůst exprese endoglinu u myší, kterým byl podáván atorvastatin 8 týdnů, byl zřejmě vázán na nárůst celkového cholesterolu u těchto myší. Lze tedy předpokládat, že exprese endoglinu je regulována mimo jiné i hladinou cholesterolu.

Jak již bylo naznačeno dříve, endoglin je schopen modulovat účinky významného cytokinu TGF- β . Bylo například prokázáno, že endoglin antagonizuje inhibiční účinky TGF- β na endotelové buňky, což pak má za následek rozvoj angiogeneze.⁶² Vzhledem k tomu, že TGF- β působí protizánětlivě, inhibuje činnost

makrofágů a T lymfocytů a snižuje expresi adhezních molekul, ⁶³ lze předpokládat, že zvýšená exprese endoglinu by mohla tyto účinky inhibovat a přispívat tak k rozvoji aterogenních změn. Tudíž snížení exprese endoglinu po podávání statinů by mohlo představovat další z možných mechanismů, jak statiny mohou ovlivňovat aterogenní proces.

7.ZÁVĚR

Tato rigorózní práce prokázala, že atorvastatin nesnižuje hladinu cholesterolu u apoE-deficientního myšího modelu aterosklerózy.

4 týdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou.

8 týdenní podávání atorvastatinu vedlo dokonce ke zvýšení hladin cholesterolu v porovnání s neléčenou kontrolní skupinou.

Expresí endoglinu byla detekována u všech skupin zvířat v endotelu aortálního sinu a aortálního oblouku a v kapilárách a malých cévách myokardu.

4 týdenní podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu snížení endoteliální exprese endoglinu ve srovnání s kontrolní skupinou.

8 týdenní podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu zvýšení endoteliální exprese endoglinu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Výsledky této práce ukazují, že statiny jsou schopny snižovat endoteliální expresi endoglinu bez hypolipidemického účinku. Navíc lze přepokládat, že expresí endoglinu bude indukována také při hypercholesterolemii.

Možné ovlivnění endoteliální exprese endoglinu by mohlo mít za následek také pozitivní ovlivnění funkce TGF- β , což by mohlo představovat další mechanismus, jakým by statiny ovlivňovaly proces aterogeneze.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

-
- ¹ Aschermann M a kol. (2003) Ateroskleróza – diagnostika a terapie. Postgraduální medicína 3:289
- ² Povýšil C a kol. (1995) Speciální patologie (Patologie oběhového, krevního, dýchacího ústrojí). Karolinum, 7-10
- ³ Breslow J L (1996) Mouse models of atherosclerosis. Science, Vol. 272:685-689
- ⁴ Češka R (1999) Cholesterol a ateroskleróza. Léčba hyperlipidemií. Maxdorf, 9-62
- ⁵ Junqueira CL, Carneiro J, Kelley OR (1997) Základy histologie. Nakladatelství H&H, 204-214
- ⁶ Pállay G (2002) Cévní endoteliální buňky – klíčový orgán vzniku a rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Trendy ve farmakoterapii 1: 21-24
- ⁷ Lum H, and Malik AB (1996) Mechanisms of increased endothelial permeability. Can J Physiol Pharmacol 74: 787-800
- ⁸ Dejana E, Corada M, and Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. Faseb J 9: 910-918
- ⁹ Lampugnani MG, and Dejana D (1997) Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. Curr Opin Cell Biol 9: 674-682

¹⁰ Nachtigal P, Gojova A, Semecky V (2001) The role of epithelial and vascular-endothelial cadherin in the differentiation and maintenance of tissue integrity. *Acta Medica (Hradec Králové)* 44:83-87

¹¹ Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, and Hayoz D (1998) Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 32:351-355

¹² Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, and Badimon L (1998) Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 252: 378-384

¹³ Lincová D, Farghali H, et al (2002) *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, Karolinum, 301-308

¹⁴ Stol M, Meffert S, Stroth U, and Unger T (1995) Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. *J hypertens* 13: 1529-1539

¹⁵ Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, and Winkles JA (1994) Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 269:10112-10118

¹⁶ Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Heucke L, Schmoeckel M, Suhler K, and Richter WO (1993) Increased endothelin plasma concentrations in patients with coronary artery disease or hyperlipoproteinemia without coronary events. *Res Exp Med (Berl)* 193: 225-358

-
- ¹⁷ Jaspard E, Costerousse O, Wei L, Corvol P, and Alhenc-Galas F (1992) The angiotensin I-converting enzyme (kininase II): molecular and regulatory aspects. *Agents Actions Suppl* 38 (Pt 1): 349-358
- ¹⁸ Vinogradsky B, Bell SP, Woodcock-Mitchell J, Ohtani A, Fujii S (1997) A new butadiene derivative, T-686, inhibits plasminogen activator inhibitor type-1 production in vitro by cultured human vascular endothelial cells and development of atherosclerotic lesions in vivo in rabbits. *Thromb Res* 85:305-14
- ¹⁹ Lukacs NW, Strieter RM, Exner V, Evanoff HL, Burdick MD, and Kunkel, SL (1995) Production of chemokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86:2767-2773
- ²⁰ Karetová D, Hlubocká Z, Bultas J (2003) Možnosti léčby endoteliální dysfunkce. *Trendy ve farmakoterapii* 3: 14-18
- ²¹ Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, et al. (1993) Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Cirkulation* 88: 358-363
- ²² Duff S E, Chenggang L, Garland J M, Kumar S (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 17:984-992
- ²³ Freemont A J, Jeziorska M, Holand J A, Rooney P, Kumar S (2002) Mast cells in the pathogenesis of chronic back pain: a hypothesis. *J Pathol* 197:281-285
- ²⁴ Bourdeau A, Dumont D J, Letarte M (1999) A murine of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104:1343-1351

-
- ²⁵ Racek J, et al. (1999) *Klinická biochemie*. Galén, Karolinum, 163
- ²⁶ Ross R (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
- ²⁷ Song L, Leung C, and Schindler C (2001) Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 108:251-259
- ²⁸ Janebová M, Zima T, Tesař V (1999) AGEs- advanced glycation (glycosylation) end-products. *Remedia* 2:94-103
- ²⁹ Trikot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Lesech G, and Tedgui A (2000) Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 101: 2450-2453
- ³⁰ Silbernagl S, Lang F (2001) *Atlas patofyziologie člověka*. Grada, 238
- ³¹ US Food and drug Administration. Bayer voluntarily withdraws Baycol. FDA, Office of public affairs August 8, (2001) www.fda.gov/bbs/topics/answers/2001/ans01095.html.
- ³² Górecká K, Tilšer I, Nachtigall P, Kopecký M, Vlček J (2004) Extralipidové účinky statinů – nový pohled na farmakodynamiku inhibitorů HMG-CoA reductázy. *Remedia* 14:355-363
- ³³ Hansson GK (2001) Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 21:1876
- ³⁴ Kraml P (2002) Statiny – nasadit již v období akutní koronární příhody? *Remedia* 2:122-125

-
- ³⁵ Češka R, Hradec J (2001) Otevřený dopis předsedů České kardiologické společnosti a České společnosti pro aterosklerózu. *Cor Vasa*
- ³⁶ Malthora HS, Goa K(2001) Atorvastatin. An updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia. *Drugs* 61:1835-81
- ³⁷ Bakker-Arkema RG, Davidson MH, Goldstein RJ, et al. (1996) Efficacy and safety of a new HMG-CoA inhibitor atorvastatin, in patients with hypertriglyceridaemia. *JAMA* 275:128-33
- ³⁸ Dart A, Jerums G, Nicholson G, et al. (1997) A multicenter, double blind, one-year study comparing safety and efficacy of atorvastatin versus simvastatin in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 80:39-44
- ³⁹ Stern RH, Yang BB, Hounslow NJ, et al. (2000) Pharmacodynamics nad pharmacokinetic - pharmacodynamic of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. *J Clin Pharmacol* 40:616-23
- ⁴⁰ Gibson DM, Bron NJ, Richens A, et al. (1996) Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans. *J Clin Pharmacol* 36: 242-246
- ⁴¹ Stern RH, Yang BB, Horton M, et al. (1997) Renal dysfunction does not alter the pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction of atorvastatin. *J Clin Pharmacol* 37:816-819
- ⁴² Nawroci JW, Weiss SR, Davidson MH, et al. (1995) Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 15:678-682

⁴³ Češka R, Urbánek K (2004) Atorvastatinum. *Remedia* 2: 110

⁴⁴ Vlček J, Zadák Z (1991) Lovastatinum. *Remedia* 1-2:17-21

⁴⁵ Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, et al.(1998) Inflammation, pravstatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels.*Circulation* 98:839-44

⁴⁶ Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM (1996) Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348:1079-1082

⁴⁷ Liao JK (2002) Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol* 86: 5-18

⁴⁸ Bellosa S, Bernini F, Ferri N, et al. (1998) Direct vascular effects of HMF-CoA reduktase inhibitors. *Atherosclerosis* 137:101-109

⁴⁹ van Dijk KW, Hofker MH, Havekes LM (1999) Dissection of the complex role of apolipoprotein E in lipoprotein metabolism and atherosclerosis using mouse models. *Curr Atheroscler Rep* Sep1(2):101-7

⁵⁰ Smit M, de Knijff P, Rosseneu M, et al. (1988) Apolipoprotein E polymorphism in The Netherlands and its effect on plasma lipid and apolipoprotein levels. *Hum Genet* 80: 287-292

⁵¹ Rall SC, Mahley RW (1992) The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med* 231: 653-659

-
- ⁵² Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-471
- ⁵³ Fazio S, Lee YL, Ji ZS, Rall, SC (1993) Type III hyperlipoproteinemic phenotype in transgenic mice expressing dysfunctional apolipoprotein E. *J Clin Invest* 92: 1497-1503
- ⁵⁴ Li G, Sanders JM, Phan ET, Ley K, Sarembock IJ (2005) Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express p-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein e-deficient mice. *Am J Pathol* 167: 1511-1518
- ⁵⁵ Raab U, Lastres P, Arevalo M A, Lopez-Novoa J M, Cabanas C, de la Rosa, Bernabeu C (1999) Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Lett* 459: 249-254
- ⁵⁶ Obreo J, Diez-Marques L, Lamas S, Duwell A, Eleno N, Bernabeu C, Pandiella A, Lopez-Novoa J M, Rodriguez-Barbero A (2004) Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem*. 14: 301-310
- ⁵⁷ Behr-Roussel D, Rupin A, Simonet S, Bonhomme E, Coumailleau S, Cordi A, Serkiz B, Fabiani J N, Verbeuren T J (2000) Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 102: 1033-1038
- ⁵⁸ Ikeda, U, Shimada K (2001) Pleiotropic effects of statins on the vascular tissue. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 1: 51-58

-
- ⁵⁹ Sparrow C P, Burton C A, Hernandez M, Jundy S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang P R, Zhang D, Peterson L, Detmers P A, Chao Y S, Wright S D (2001) Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 115-121
- ⁶⁰ Corsini A, Raiteri M, Soma M R, Bernini F, Fumagalli R, Paoletti R (1995) Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Am J Cardiol.* 76: 21A-28A
- ⁶¹ Letamendia A, Lastres P, Botella L M, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem.* 273: 33011-33019
- ⁶² Li C, Hampson I N, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar, S (2000) CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J* 14: 55-64
- ⁶³ Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89: 930-934