



**UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



2. interní klinika 3. LF UK a FNKV Praha

Jan Simonides

**Mutantní apoA-I v léčbě chronických
tepenných uzávěrů a prevenci aterosklerózy**

*Mutant apoA-I in Treatment of Chronic Arterial
Occlusions and in Prevention of Atherosclerosis*

Diplomová práce

Praha, říjen 2006

Autor práce: Jan Simonides

Studijní program: Všeobecné lékařství s preventivním zaměřením

Vedoucí práce: **MUDr. Pavel Kraml Ph.D.**

Pracoviště vedoucího práce: 2. interní klinika 3. LF UK a FNKV

Praha

Datum a rok obhajoby: 29. 11. 2006

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracoval samostatně a použil jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 20. listopadu 2006

Jan Simonides

Obsah

Úvod.....	6
1. Jednoduché a složené lipidy a lipoproteiny v plazmě.....	7
1.1. Klasifikace a názvosloví lipoproteinů.....	8
2. Metabolismus lipoproteinů.....	10
3. Reverzní transport cholesterolu.....	11
4. Ateroskleróza a její patogeneze.....	13
4.1. Role oxidačních procesů.....	13
4.2. Antioxidační vlastnosti HDL.....	14
4.3. Role zánětu v patogenezi.....	15
4.3.1. Adhezní proteiny a chemokiny.....	15
4.3.2. Efekt HDL na migraci monocytů do cévní stěny.....	16
4.3.3. Efekt HDL na expresi adhezivních molekul.....	16
4.4. HDL, C-reaktivní protein a ateroskleróza.....	17
4.5. Morfologie aterosklerózy.....	17
5. Možnosti ovlivnění koncentrace HDL.....	18
5.1. Fibráty.....	19
5.2. Statiny.....	19
5.3. Kyselina nikotinová.....	19
5.4. Inhibitory CETP.....	20
5.5. Peptidová mimetika apolipoproteinů.....	20
5.6. Ostatní látky.....	21
6. ApoA-I _{Milano}	22
6.1. Hladina HDL u nosičů mutace apoA-I _{Milano}	21
6.2. Stav kardiovaskulárního aparátu nosičů mutace apoA-I _{Milano}	23
7. ApoA-I _{Milano} v experimentálních zvířecích modelech.....	24
7.1. Účinek na aterosklerózu.....	25
7.1.1. Efekt jediné dávky apoA-I _{Milano}	25
7.2. Účinek na intimální proliferaci.....	27
7.2.1. Potlačení vzniku restenóz.....	28
7.3. Možnost ovlivnění ischemicko-reperfúzního poškození.....	30

7.4. Efekt na formaci trombu.....	32
8. ApoA- I_{Milano} v klinických studiích.....	33
9. Porovnání účinku apoA- I_{Milano} a apoA-I.....	39
10. Porovnání účinku apoA- I_{Milano} a statinů.....	40
10.1. Intenzivní statinová terapie.....	44
11. ApoA- I_{Milano} v prevenci a léčbě aterosklerózy.....	46
Závěr.....	49
Souhrn.....	50
Summary.....	51
Seznam použité literatury.....	52

Úvod

Téma mé diplomové práce „Mutantní apoA-I v léčbě chronických tepenných uzávěrů a prevenci aterosklerózy“ spadá do oblasti, o kterou mám dlouhodobý zájem. Vždy mě totiž zajímala spíše interní problematika a to především léčba metabolických a kardiovaskulárních onemocnění a jejich prevence.

Diplomová práce mi pomohla lépe se zorientovat v tak široké problematice jako je ateroskleróza, její patogeneze a léčba pomocí nejnovějších postupů, i když v některých případech zatím pouze experimentálních.

1. Jednoduché a složené lipidy a lipoproteiny v plazmě

Do skupiny krevních lipidů patří nejen triacylglyceroly (TG), fosfolipidy (PL), sfingolipidy a glykosfingolipidy, ale také neesterifikované mastné kyseliny (NEMK, nazývané též volné mastné kyseliny, FFA) a nověji též eikosanoidy (prostaglandiny, tromboxany a prostacykliny). S ohledem na lipofilní povahu se k nim obvykle řadí i cholesterol (CH) a jeho estery (CHE).

Skelet triacylglycerolů i fosfolipidů tvoří glycerol. *Triacylglyceroly* mají všechny alkoholové skupiny esterifikovány vyššími mastnými kyselinami. V přírodních tucích má jen malá část na všech esterových pozicích stejnou mastnou kyselinu. Většina z nich jsou smíšené acylglyceroly. *Fosfolipidy* pak mají na 3. uhlíku glycerolu místo mastné kyseliny navázaný cholin, etanolamin, serin nebo inositol. Mastné kyseliny, které jsou nejčastěji přítomny v molekule triacylglycerolu, jsou jednak nasycené (např. kyselina palmitová /16-C/, kyselina stearová /18-C/, kyselina arachová /20-C/), jednak nenasycené (např. kyselina palmitolejová /16-C/, kyselina olejová, linolová a linolenová /18-C s jednou, dvěma a třemi dvojnými vazbami/, kyselina arachidonová /20-C a čtyři dvojně vazby/).

Základem *cholesterolu* je steranový (gonanový) skelet tvořený čtyřmi kondenzovanými isocyklickými jádry s jednou nenasycenou vazbou na 5. uhlíku, -OH skupinou na 3. uhlíku, dvěma methylovými skupinami v polohách 10 a 13 a s rozvětveným uhlovodíkovým řetězcem na 17. uhlíku. Cholesterol je v tkáních a v plasmatických lipoproteinech přítomen buď v neesterifikované formě (označované též jako „volná“) nebo je vázán na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jako ester cholesterolu. Z celkového cholesterolu v plazmě jsou přítomny asi 2/3 v podobě esterifikované.

Molekuly lipidů mají hydrofobní charakter, zatímco vnitřní prostředí organismu hydrofilní. Proto nastává problém při jejich transportu ve vodném prostředí jakým je krevní plasma. Lipidy se zde mohou vyskytovat pouze navázané na nosič (jako mastné kyseliny vázané na albumin) nebo ve formě *lipoproteinů*. To jsou částice proměnlivého složení obsahující proteinovou složku (apoprotein), která jim uděluje určité vlastnosti.

Lipoproteiny zaujímají v prostoru přibližně kulovitý tvar. Mají jednovrstevný povrch složený z molekul cholesterolu a fosfolipidů, uspořádaných hydrofobní částí dovnitř partikule a hydrofilní vně do polárního prostředí plazmy. Molekuly apoproteinů jsou uloženy na tomto povrchu, nebo jsou do něho zanořeny a jenom jejich část vyčnívá navenek (viz obrázek 5.1). Jádro částice tvoří triacylglyceroly a estery cholesterolu.

1.1 Klasifikace a názvosloví lipoproteinů

Čistý tuk má menší hustotu než voda, a to vede k tomu, že roste-li v lipoproteinech poměr lipidů vůči proteinům, klesá jejich hustota. Této vlastnosti se využívá při dělení různých plasmatických lipoproteinů ultracentrifugací nebo agarózovou elektroforézou.

V klasifikaci lipoproteinů se pak z praktických důvodů stále používá názvů odvozených z ultracentrifugace v gradientu hustoty: lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins, *HDL*), lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins, *LDL*), lipoproteiny o střední hustotě (intermediate lipoproteins, *IDL*) a lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins, *VLDL*). Částice, které při této technice „plavou“ vždy na povrchu, flotují, se jmenují *chylomikrony*.

Další klasifikace lipoproteinů je podle jejich pohyblivosti při agarózové elektroforéze. Kdybychom srovnávali s elektroforézou bílkovin séra, potom nejrychleji, tj. na úrovni alfa-globulinové frakce, se pohybují alfa-lipoproteiny, které odpovídají frakci HDL. Pomalejší jsou *pre β -lipoproteiny*, odpovídající frakci VLDL a na úrovni β -globulinové frakce migrují *β -lipoproteiny*, tedy částice LDL. Částice IDL, které vznikají katabolismem VLDL, vytvářejí na elektroforeogramu obraz "široké" beta zóny. Chylomikrony vzhledem ke svému složení a velikosti v agarózovém gelu neputují a zůstávají na startu.

Chylomikrony jsou v průměru o jeden řád větší než LDL, IDL a VLDL a až o dva řády větší než HDL. Nejvyšší relativní podíl proteinů mají HDL a nejnižší chylomikrony, největší relativní podíl cholesterolu obsahují LDL, největší relativní podíl triacylglycerolů mají chylomikrony a hned po nich VLDL.

Tab. 1.1 Přehled lipoproteinů. Podle Schneiderka P.²

	chylomikrony	LDL	IDL	VLDL	HDL
Agarózová ELFO	na startu	β	šir. β	pre- β	α
Hustota (g/l)	< 940	1063	1019	1006	> 1210
Průměrná velikost (nm)	700-12 000	220	315	280-750	70-1100
Obsah cholesterolu (%)	3	59	41	17	38-43
Obsah triacylglycerolů (%)	88	7	32	56	6-7
Obsah proteinů (%)	1-2	25	18	10	40-55

Nejmladší je názvosloví samotných proteinových složek lipoproteinových částic, tedy *apoproteinů* (někdy nazývány také „apolipoproteiny“). Začaly se označovat velkými písmeny abecedy, ale jak přibývalo znalostí o odlišnosti jejich struktury (podtřídy, isoformy) a o specifitě účinku, přibyla k odlišení arabská a římská čísla a v jednom případě též malé písmeno (tabulka 1.2). Podle abecedního pořadí je hlavní apoprotein HDL (α -lipoproteinu) označen písmenem A. Hlavním apoproteinem LDL (β -lipoproteinu) je apoB, který je však rovněž ve VLDL (apoB-100) a chylomikronech (apoB-48).

Tab. 1.2 Přehled hlavních apoproteinů. Podle Schneiderka P.²

Apoprotein	Hlavní funkce
A-I	Strukturální pro HDL, ligand pro vazbu HDL, koenzym LCAT.
A-II	Strukturální pro HDL, ligand pro vazbu HDL, modulátor aktivity LPL a HTGL.
A-IV	Ligand pro vazbu HDL, aktivátor LCAT.
Apo (a)	Strukturální pro lipoprotein Lp(a), snižuje fibrinolýzu. Aterogenní.
B-48	Strukturální pro chylomikrony.
B-100	Strukturální pro VLDL, LDL a IDL, ligand pro LDL-R. Aterogenní.
C-I	Aktivátor LPL a LCAT.
C-II	Aktivátor LPL a LCAT.
C-III	Inhibitor LPL, modulátor vazby lipoproteinů bohatých na TG na LRP.
D	Neznámá.
E	Ligand pro LDL-receptor a pro LRP. Aterogenní.

HTGL – jaterní lipáza, *LCAT* - lecitin:cholesterolacyltransferáza, *LPL* – lipoproteinová lipáza, *LRP* - LDL-receptor related protein

2. Metabolismus lipoproteinů

Lipidy přijaté potravou se v trávicím traktu štěpí na volný cholesterol, mono- a diacylglyceroly a volné mastné kyseliny. Ty se pak difúzí dostávají do enterocytů tenkého střeva, kde následuje jejich reesterifikace mastnými kyselinami většími než C14. Tato cesta se někdy označuje za *exogenní* (střevo - cirkulace - játra). Produkty zmíněných reakcí (triacylglyceroly, cholesterolestery) vytvářejí hydrofobní jádro chylomikronové částice. Enterocyt syntetizuje současně apoproteiny apoA-I, A-II, A-IV a B-48, které spolu s fosfolipidy a s menším podílem volného cholesterolu pokrývají povrch chylomikronu. Chylomikrony se uvolní ze střevní buňky fuzí sekreční vakuoly s buněčnou membránou. Dostávají se do prostoru mezi střevními buňkami, odkud pokračují lymfatickými cestami do krve.

Funkčně nejdůležitějším a pro chylomikron typickým apoproteinem je apoB-48. Přesto, že každý chylomikron obsahuje na svém povrchu jen jednu molekulu apoB-48, rozhoduje tento apoprotein o sekreci chylomikronu z enterocytu do lymfatického řečiště a zůstává v chylomikronu vázán po celou dobu jeho životnosti až do okamžiku, kdy je jako chylomikronový zbytek, „remnant“, resorbován jaterním hepatocytem. Chylomikrony izolované z krve obsahují i apoC a apoE, přestože nově secernované lipoproteiny jich mají velmi málo nebo neobsahují žádné. Tyto apoproteiny, všechny syntetizované hepatocytem, získává chylomikron od HDL, stejně jako fosfolipidy a cholesterol.

Vyznamný je především zisk apoC-II, protože jako kofaktor lipoproteinové lipázy, umístěné na endotelu cév, umožňuje její interakci s triacylglyceroly jádra. Lipoproteinová lipáza pak štěpí triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol, které jsou využity pro potřeby tkáňového metabolismu. Jádro chylomikronu se tím zmenšuje, až vznikne „remnant“ bohatý na apoE a estery cholesterolu, jenž je nakonec pohlcen hepatocytem. Mechanismus zachycení chylomikronového remnantu hepatocytem spočívá ve vazbě remnantu, resp. jeho apoproteinu E, na apoE receptory hepatocytu. Tím končí exogenní metabolická cesta a začíná cesta *endogenní* (játra - cirkulace - periferní tkáň).

Ze získaných esterů cholesterolu se v hepatocytech tvoří žlučové kyseliny, obnovují se membrány a především tvoří VLDL, které jsou bohaté na

triacylglyceroly pocházející z vlastní jaterní syntézy, nebo z cirkulujících lipoproteinů. Právě nabídka triacylglycerolů rozhoduje o jejich velikosti. Další součástí VLDL jsou fosfolipidy, apoprotein B-100 a malá množství apoC-I, C-II, C-III a apoE, jež VLDL získává nejen z jater, ale rovněž od HDL (podobně jako chylomikrony). I další osud VLDL je podobný osudu chylomikronů. V periferních tkáních jsou z nich prostřednictvím lipoproteinové lipázy a apoC-I nebo apoC-II uvolňovány mastné kyseliny. Jádro VLDL se postupně zmenšuje a v závěru se částice zbavuje i apoproteinů C, takže zůstává opět zbytek relativně bohatý na apoE a na estery cholesterolu. Označuje se jako IDL (nebo VLDL remnant) a díky obsahu apoE může být zachycen jak LDL receptorem, tak receptorem pro chylomikronové remnanty. V hepatocytu je IDL za normálních okolností z poloviny kompletně hydrolyzován a z druhé poloviny se tvoří částice LDL.

V játrech vzniklý lipoprotein LDL obsahuje ve svém jádru především cholesterol (viz tabulka 1.1) a na povrchu pouze apoprotein B-100, jež je důležitý pro jeho vazbu na LDL receptor buněk periferních tkání i hepatocytů. Tyto receptory rozenávají apoprotein B-100 na částicích LDL a apoE na částicích IDL. Zdá se, že neváží VLDL ani IDL pomocí jejich apoproteinů B-100.

3. Reverzní transport cholesterolu

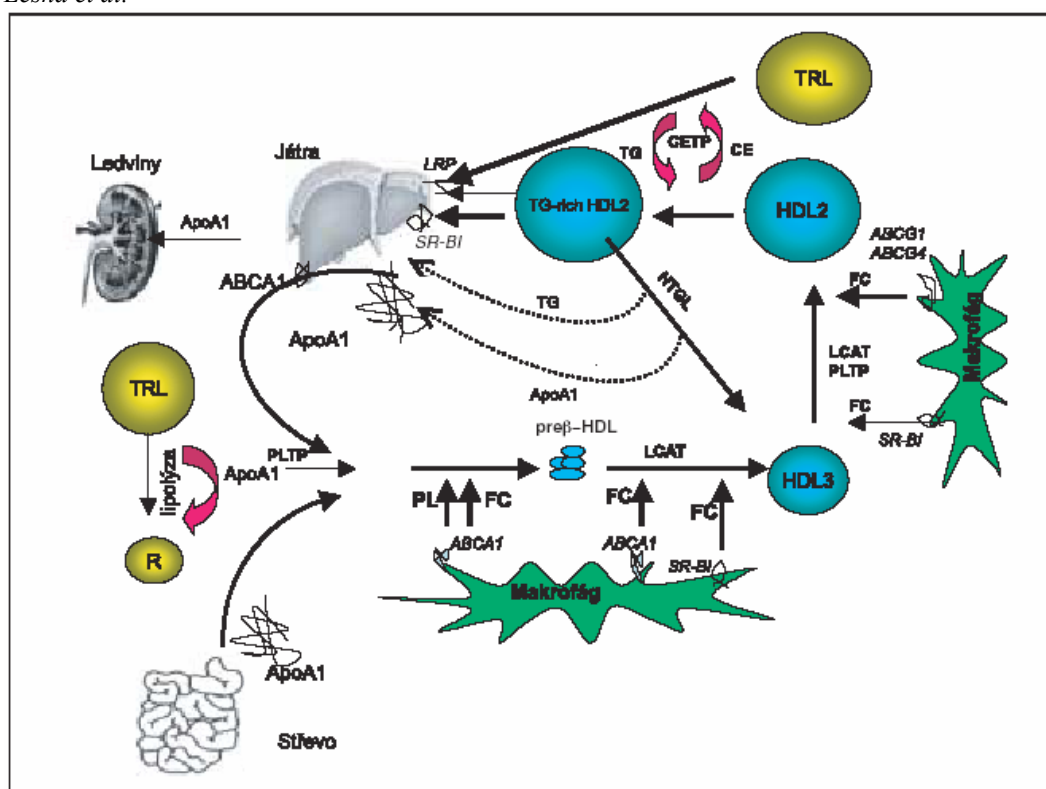
Transport cholesterolu do tkání je funkcí LDL (kapitola 2). Protiváhou tohoto procesu je pak odstraňování cholesterolu z periferních tkání, které zprostředkovává HDL. Tomuto procesu se rovněž říká reverzní transport cholesterolu (RTC). Takto odstraněný cholesterol je transportován převážně do jater, kde probíhá jeho exkrece žlučí. Ve studiu funkce apoA-I, potažmo apoA-I_{Milano}, hraje RTC důležitou roli, neboť je to právě apoA-I, které je za tuto funkci odpovědné. Evidentní je rovněž jeho význam v aterosklerotickém procesu, protože RTC probíhá i na makrofázích.

Jak bylo pojednáno výše skládají se HDL částice jednak z lipidů (fosfolipidy a cholesterol), bílkovinné složky (apoA-I) a enzymů či proteinů zprostředkovávajících výměnu lipidů mezi lipoproteiny. Sem patří: fosfolipid transfer protein (PLTP), umožňující přenos fosfolipidů; lecitin:cholesterolacyltransferáza (LCAT), katalyzující esterifikaci volného

cholesterolu (pouze esterifikovaný cholesterol může být uložen v hydrofobním jádru lipoproteinové částice) a cholesterol ester transfer protein (CETP), umožňující vzájemnou výměnu nepochárných lipidů mezi jednotlivými lipoproteiny.

HDL částice jsou syntetizovány jak v játrech, tak ve střevě. Nově vzniklá částice je zpravidla diskovitého tvaru a tvoří ji hlavně apolipoprotein A1. Tyto částice jsou po vstupu do oběhu obohaceny o další apolipoproteiny syntetizované v játrech (apoA-II, apoA-IV, apolipoproteiny skupiny C a E). Dalším zdrojem apoE vázaného na částice HDL jsou makrofágy.

Obrázek 3.1. Schematické zobrazení reverzního transportu cholesterolu. Převzato z Králová Lesná et al.³



Seznam použitých zkratk v obrázku: ApoA1 – apolipoprotein A-1, ABCA1 – adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1, ABCG1 – adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1, ABCG4 – adenosine triphosphate-binding cassette transporter G4, TRL – triglyceride rich lipoprotein, R – remnanty z TRL, PL – fosfolipidy, FC – volný cholesterol, CE – estery cholesterolu, PLTP – phospholipid transfer protein, LCAT – lecitin : cholesterolacyltransferáza, CETP – cholesterol ester transfer protein, SR-BI – scavenger receptor class B type I, TRL – triglyceride rich lipoprotein, LRP – LDL receptor related protein, HTGL – jaterní lipáza, TG – triacylglyceroly

K prvotnímu obohacení částic apoA-I fosfolipidy dochází ve velké míře již v játrech nebo ve střevě pomocí ATP-binding cassette transportéru A1 (ABCA1), který je na hepatocytech hojně přítomen. Jeho exprese je regulována tzv. jaterními

receptory X (LXR, liver X receptors, jejich ligandy jsou oxysteroly) a retinoidními receptory X (RXR, retinoid X receptors, ligandem je 9-cis retinoidní kyselina) a to v závislosti na množství cholesterolu v buňkách (čím více cholesterolu tím větší exprese ABCA1). Částice obohacené o fosfolipidy jsou pak schopny více vázat cholesterol a jsou navíc chráněny před rychlou degradací. Výsledkem interakce apoA-I s ABCA1 je vznik malých HDL (HDL₃, pre β -HDL). Na povrchu těchto částic jsou vázány CETP, PLTP, LCAT a paraoxonáza. LCAT pak umožňuje esterifikaci cholesterolu navázaného na HDL a strukturální přestavbu HDL na tzv. zralé HDL₃, jež jsou pak schopny akceptovat další cholesterol, čímž dále zvětšují svůj objem a stávají se částicemi HDL₂ (transport cholesterolu se v tomto případě odehrává pomocí ABCG1 a ABCG4). Tato částice je pak obohacena o triacylglyceroly (CETP) a následně jsou z ní v játrech pomocí scavenger receptorů třídy B, typu I (scavenger receptor class B type I /SR-BI/) odstraněny estery cholesterolu. Do oběhu je potom uvolněn lipid poor apoA-I. Receptory SR-BI umožňují obousměrný tok cholesterolu v závislosti na jeho gradientu a podílejí se jak na efluxu cholesterolu z buněk, tak na jeho vychytávání. Vzhledem k jejich výskytu na makrofázích i hladkých svalových buňkách cév hrají zřejmě roli i v patogenezi aterosklerózy.

Vlastní RTC pak zahrnuje několik kroků jako je hydrolýza intracelulárně uložených esterů cholesterolu (cholesterylesterhydroláza), transport cholesterolu přes buněčnou membránu (difúze, ABC-A1, G1, G4 a SR-BI), jeho reesterifikace pomocí LCAT a následné přenesení do hepatocytu pomocí SR-BI. HDL je prostřednictvím tohoto receptoru endocytózou transportováno do hepatocytu a po odstranění cholesterolu resekretováno. Jinou možností je vychytání celých částic LRP (LDL-receptor related protein) prostřednictvím apoE, jenž může být rovněž součástí částice HDL.

4. Ateroskleróza a její patogeneze

4.1 **Role oxidačních procesů**

Centrální úlohu v patogenezi aterosklerózy hraje LDL. Vstupuje totiž do subendotelového prostoru, kde se váže k matrix. Výsledná koncentrace

apolipoproteinů B v cévní stěně savců je proto přibližně dvojnásobná oproti jeho plasmatické hladině.

Rovněž HDL často vstupuje do subendotelového prostoru, ale k matrix se neváže. Naopak jeví tendenci k návratu do cirkulace. To vysvětluje, proč je koncentrace apoA-I v cévní stěně, normálně pouze 10-20% jeho plasmatické koncentrace. Navab et al. (2000)⁴ zjistili, že normální cirkulující LDL vždy obsahuje alespoň malé množství lipidových hydroperoxidů odvozených z lipooxygenázové dráhy. Na základě studií užívajících in vitro model arteriální stěny se usuzuje, že LDL zachycené v subendotelovém prostoru dostává další lipidové hydroperoxydy tvořené lipooxygenázovou a myeloperoxidázovou dráhou v buňkách arteriální stěny. Jestliže množství oxidovaných lipidů v LDL dosáhne kritického prahu, LDL fosfolipidy obsahující arachidonovou kyselinu na pozici *sn-2* (druhá pozice na glycerolové molekule) se oxidují a začnou vykazovat prozánětlivé vlastnosti (Navab et al., 2000).^{4,5} Patogeneze aterosklerózy zahrnuje 12/15 lipooxygenázovou, 5-lipooxygenázovou, myeloperoxidázovou, cyklooxygenázovou a NADPH oxidázovou dráhu.

4.2 Antioxidační vlastnosti HDL

ApoA-I je schopno odstraňovat z LDL lipidové hydroperoxydy, které oxidují LDL fosfolipidy. HDL CE-O(O)H (cholesterol ester hydroperoxydy) jsou pak rychle a selektivně odstraňovány jaterními buňkami. Jedna z hlavních antioxidačních a antiinflamatorních funkcí HDL je tedy zprostředkována transportním mechanismem, který váže a odstraňuje oxidované molekuly.

HDL rovněž obsahuje enzymy, jako jsou paraoxanáza 1, 3 a pravděpodobně glutathion peroxidázu, které ničí hydroperoxydy oxidující LDL fosfolipidy (Navab et al., 2000).⁴ Navíc bylo prokázáno, že fosfolipidové hydroperoxydy jsou v HDL redukovány na příslušné hydroxydy s průvodní oxidací apoA-I metioninových reziduí. Tato redukční kapacita apoA-I je nezávislá na paraoxanázách. HDL rovněž transportují enzymy jako platelet-activating factor acetyl hydrolázu a LCAT, které jsou schopné odstranit oxidované fosfolipidy.

Jedna z hypotéz předpokládá, že se HDL vyvíjí jako součást vrozeného imunitního systému (Navab et al., 2000).⁴ HDL totiž tvoří významnou část antivirové aktivity lidské plasmy. Van Lenten et al. (2001)⁶ zjistili, že HDL ztrácí

své protizánětlivé vlastnosti během akutní chřipkové infekce. HDL izolované od myši infikovaných virem chřipky A ztrácí svou schopnost chránit LDL proti oxidaci a je rovněž neúčinné v prevenci LDL indukované chemotaktické aktivity na makrofágy.

4.3 Role zánětu v patogenezi

Dnes se na aterosklerózu pohlíží, jako na chronický zánětlivý proces charakterizovaný akumulací makrofágů a T-lymfocytů v intimě artérií a zvýšenou koncentrací některých zánětlivých markerů v plazmě. Makrofágy akumulující se v aterosklerotických plátech jsou odvozeny převážně z krevních monocytů, které před migrací do subendoteliálního prostoru adherují na endoteliální buňky. V cévní stěně pak z monocytů vznikají makrofágy exprimující řadu scavengerových receptorů, z nichž některé mohou vázat a internalizovat LDL. Následně vznikající pěnové buňky jsou považovány za hlavní buňky aterosklerózy.

4.3.1 Adhezní proteiny a chemokiny

Časným krokem zánětlivého procesu je adheze monocytů na endotelové buňky, jenž byly poškozeny nebo jinak stimulovány k expresi adhezních proteinů. Tento proces začíná adhezí monocytů k endoteliálnímu connecting segmentu-1 cestou aktivace $\beta 1$ integrinů. Aktivované endotelové buňky exprimují na svém povrchu několik adhezních molekul jako VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) a selektin-E. Je prokázáno, že tyto proteiny se nacházejí v oblastech rozvíjející se aterosklerózy, a že jejich solubilní formy jsou přítomny ve zvýšené koncentraci v plasmě pacientů s coronary heart disease (CHD). Jakmile se monocyty naváží na adhezivní molekuly jsou zadrženy a k dispozici pro přesun do subendotelového prostoru prostřednictvím chemokinů jako MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1). Zjištění, že lidské HDL inhibuje tvorbu adhezních molekul a MCP-1, je tedy potenciálně velmi důležité.

Selektin-E je tvořen endotelem v reakci na působení prozánětlivých cytokinů cestou nukleárního transkripčního faktoru (nuclear factor kappa β ; NF- κ B). Zprostředkovává rolling a volnou vazbu leukocytů na luminální povrch. Ty jsou následně vázány pevněji na VCAM-1 a ICAM-1. ICAM-1 je konstitutivně

exprimován na povrchu endotelových buněk i leukocytů, zatímco VCAM-1 je produkován endotelem v odpovědi na působení zánětlivých cytokinů a reaguje s integriny na povrchu leukocytů. Zvířecí studie demonstrovaly zvýšenou expresi adhezních proteinů rovněž jako odpověď na krmení cholesterolem a zvýšenou zátěž.

4.3.2 Efekt HDL na migraci monocytů do cévní stěny

HDL inhibuje migraci monocytů do cévní stěny zprostředkovanou oxidovaným LDL. Tato vlastnost je nejspíše spojena s paraoxanázu a platelet-activating factor acetyl hydrolázou HDL a je alterována akutními zánětlivými stavy v důsledku akumulace sérového amyloidu A v HDL. Navíc HDL izolovaný od pacientů s CHD neinhibuje chemotaxi v takovém rozsahu jako HDL od osob bez CHD.

4.3.3 Efekt HDL na expresi adhezních molekul

In vitro HDL inhibuje expresi adhezních molekul na povrchu aktivovaných endotelových buněk. Nativní i reconstituted HDL (obsahující pouze apoA-I a fosfatidylcholin) inhibuje cytokiny indukovanou expresi VCAM-1, ICAM-1 a selektinu-E na koncentraci závislým způsobem (ovšem uvnitř fyziologického rozmezí hladin HDL). Inhibice exprese adhezních molekul je spojena s poklesem jejich mRNA. Tato inhibice je závislá na času a roste během 16 hodin (pre-inkubace). Je-li HDL na konci této periody odstraněn a následně je přidán TNF- α , inhibice přetrvává dále. To naznačuje, že efekt HDL není dán interferencí s TNF- α na jeho receptorech, ale nějakou modifikací buněk, takže ty pak jsou k působení cytokinů rezistentní.

HDL izolovaný z plasmy různých osob se liší ve své inhibiční aktivitě, což by mohlo být dáno jeho heterogenitou. Studie nepotvrdily, že by tato funkce byla závislá na velikosti částic, apolipoproteinech, obsahu cholesterolových esterů nebo triacylglycerolů. Zdá se, že největší vliv na tuto funkci má složení fosfolipidů.

4.4 HDL, C-reaktivní protein a ateroskleróza

Koncentrace C-reaktivního proteinu (CRP), reaktantu akutní fáze, je prediktorem kardiovaskulárních chorob. Zdá se, že CRP může sám přispívat k zánětlivému procesu. V in vitro studiích CRP zvyšoval sekreci MCP-1, snižoval aktivitu endoteliální NO syntázy a indukoval produkci VCAM-1, ICAM-1 a selektinu-E. Nedávná studie Wadham et al. (2004)⁷ prokázala, že HDL inhibuje prozánětlivé účinky CRP. Ovšem jiným způsobem než účinky cytokinů. Inhibice je v tomto případě účinná pouze za fyzické přítomnosti HDL. Navíc zatímco oxidace HDL snižuje jeho potenciál inhibovat TNF- α indukovanou expresi adhezních molekul, schopnost inhibice CRP indukované exprese adhezních molekul se zvyšuje. Zdá se tedy, že oxidované fosfolipidy efektivněji vážou a neutralizují účinky CRP než neoxidované.

4.5 Morfologie aterosklerózy

Nejzávažnější následky aterosklerózy (infarkt myokardu-IM, cévní mozková příhoda-CMP) jsou způsobeny nasedajícím trombem. Životně důležitou otázkou je, proč se ateroskleróza po několikaletém indolentním průběhu náhle komplikuje vznikem trombu. Bylo-li by možno detekovat k trombóze náchylný plát nebo zabránit jeho vzniku, ateroskleróza by se stala mnohem benignějším onemocněním.

Přibližně 76% fatálních koronárních trombů nasedá na rupturu plátu. Ta je častější u mužů (~80%), než u žen (~60%). Prasklé pláty jsou charakterizované velkým, na lipidy bohatým jádrem s tenkou vazivovou čepičkou, angiogenezí, zánětem adventicie a zevní remodelací. Proto se jim rovněž říká thin cap fibroatheroma (TCFA). Nekrotické lipidové jádro bývá velikosti 2 až 17 mm (průměrně 8 mm); fibrózní čepička (<65 μ m) obsahuje řídké hladké svalové buňky a početné makrofágy. TCFA jsou nejčastěji pozorovány u pacientů zemřelých na akutní infarkt myokardu. Nejčastěji se nacházejí v proximálních částech koronárních artérií. Méně často ve střední a nejméně v distální části. Cévy s TCFA nejsou obvykle výrazně zúžené (ve více jak 75% případů je stenóza menší než 75%), ale jsou remodelované. TCFA jsou běžné u pacientů s vysokou hladinou celkového cholesterolu (TC) a vysokým poměrem TC/HDL-C, u žen nad 50 let a pacientů se zvýšeným CRP.

5. Možnosti ovlivnění koncentrace HDL

Hlavním důvodem, proč se dnes při léčbě dyslipidémie snižuje především množství cirkulujícího LDL-C, je dostupnost potentních LDL snižujících léků, jmenovitě statinů, které jsou ideálním lékem pro dlouhodobé užívání a jejichž účinnost byla ověřena ve velkých randomizovaných klinických studiích (kapitola 10 a 11). Uznává se ovšem, že i jiné oblasti lipidového metabolismu, by mohly být důležité v terapii aterosklerózy a s ní souvisejících kardiovaskulárních chorob. Intervence v HDL oblasti lipidového spektra, jsou založeny na zvyšování jeho hladin, které vycházejí z epidemiologických pozorování, vykazujících obrácený vztah mezi hladinou HDL a kardiovaskulárními chorobami.

Že je nízká koncentrace HDL rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění, bylo poprvé prokázáno již roku 1997 ve studii Millera et al.¹³ Následovaly další práce, který tento závěr potvrdily (Gordon et al., 1989; Genest et al., 1991).^{14,15} V rozsáhlém projektu PROCAM (PROspective CARDiovascular Munster Heart Study) byla incidence koronárního onemocnění čtyřikrát vyšší u mužů středního věku s koncentrací HDL-cholesterolu pod 0,9 mmol/l, než u srovnatelných mužů s koncentrací HDL-cholesterolu nad 0,9 mmol/l. Zvýšení HDL tedy snižuje riziko coronary heart disease (CHD). Podle dostupných informací 1% zvýšení HDL-C snižuje riziko CHD rovněž o 1% (4S, 1994; Frick et al., 1987).^{16,17} Epidemiologické i intervenční studie ukázaly, že HDL je prediktivní faktor nezávislý na LDL cholesterolu.

Koncentraci HDL lze pozitivně ovlivnit režimovými opatřeními jako jsou zvýšení pohybové aktivity, redukce hmotnosti a ukončení kouření. Není ovšem zcela jisté, zda je zvýšení koncentrace HDL v těchto situacích spojeno se zvýšeným RTC. Přitom právě zvýšení RTC je podle současných znalostí důležitou možností k zastavení vývoje a případně k regresi aterosklerózy.

V klinické praxi jsou nyní ke zvýšení koncentrace HDL používány zejména fibráty a kyselina nikotinová (niacin). Je ale jasné, že dosud používaná hypolipidemika (statiny) účinněji snižují LDL-cholesterol v porovnání se zvyšováním HDL-cholesterolu.

Podle klinických studií mají příznivý vliv na snížení rizika CHD u pacientů s nízkou hladinou HDL-C jak statiny tak fibráty. Statiny snižují toto

riziko u pacientů s nízkým i vysokým HDL-C, zatímco fibráty především u pacientů s nízkým HDL-C.

5.1 Fibráty

Jejich použití zvyšuje HDL-C o 10-20%. Fibráty primárně zvyšují katabolismus TRL a vzhledem k inverznímu vztahu mezi koncentracemi TRL a HDL vede jejich podávání ke zvýšení koncentrace HDL. Nicméně fibráty ovlivňují metabolismus HDL i na úrovni buněčné transkripce – ovlivněním jaderného transkripčního faktoru (peroxisome proliferator-activated receptor /PPAR- α /), který vede k zvýšení syntézy apoA-I v játrech, a tím k tvorbě nových částic HDL.

Podle Helsinki Heart Study (1998)¹⁸ s gemfibrozilem každé 1% nárůstu hladiny HDL-C znamená 3% pokles počtu koronárních příhod a to nezávisle na hladině LDL-C. Narozdíl od léčby statiny, kde účinnost léčby nezávisí na hladině HDL-C, byl při léčbě gemfibrozilem pozorován jen malý léčebný prospěch u pacientů s hladinou HDL-C > 1,0 mmol/l. Vzhledem k tomu, že fibráty neovlivňují zásadně koncentraci LDL, jsou tyto látky vhodné zejména v kombinaci se statiny k léčbě tzv. metabolického syndromu, jehož součástí jsou zvýšená koncentrace triacylglycerolů a snížená koncentrace HDL.

5.2 Statiny

Mezi statiny s lepším účinkem na HDL-C patří simvastatin a rosuvastatin. Tzv. STELLAR trial (Jones et al., 2003)¹⁹ porovnávala účinky vyšších než doporučených dávek rosuvastatinu, atorvastatinu, simvastatinu a pravastatinu po dobu více než 6 týdnů u 2431 pacientů. Ze jmenovaných měl největší efekt na zvýšení HDL rosuvastatin 10-40 mg (7,7-9,6%), pak simvastatin 10-80 mg (5,3-6,8%), pravastatin 10-40 mg (3,2-5,6%) a nejméně atorvastatin 10-80 mg (2,1-5,7%).

5.3 Kyselina nikotinová

Největší účinek na HDL-C, z dnes používaných léků, má niacin, zvyšující hladinu HDL-C v průměru o 30-35%. Niacin má prokazatelně prospěšný efekt na

kardiovaskulární choroby, který může být částečně vysvětlen působením na HDL-C. Ovlivňuje ale všechny parametry lipidového profilu.

Mechanismus, kterým nikotinová kyselina vede ke zvýšení koncentrace HDL, není dosud zcela objasněn. Zdá se, že niacin vede ke snížení vychytávání apoA-I z částic HDL hepatocyty, čímž přispívá k zachování strukturální a funkční integrity částic HDL opouštějících játra po odevzdání cholesterolu, jejich recirkulaci a zvýšení reverzního transportu cholesterolu.

Přesto, že má niacin na hladinu HDL nepopíratelně pozitivní vliv, brání jeho běžnému použití nepříznivé vedlejší účinky, ke kterým patří uvolňování prostaglandinů (s „flush-účinkem“), hyperglykémie, hyperurikémie a hepatotoxicita. Tyto nežádoucí účinky se však u některých forem niacinu s prodlouženým účinkem podařilo minimalizovat.

5.4 Inhibitory CETP

Klinický výzkum je v současné době zaměřen na několik skupin látek. Jednou z nich jsou inhibitory CETP (JTT-705 a torcetrapib), enzymu vázaného na HDL a usnadňujícího vzájemnou výměnu esterů cholesterolu z HDL a triacylglycerolů z TRL. Jsou zřejmě nejperspektivnějšími látkami, u kterých jsou zkoumány jejich možnosti použití v praxi. Jejich podání vede ke zvýšení koncentrace HDL o 40–60 % a snížení koncentrace LDL s tím, že tyto účinky jsou synergické při kombinované léčbě se statiny.

5.5 Peptidová mimetika apolipoproteinů

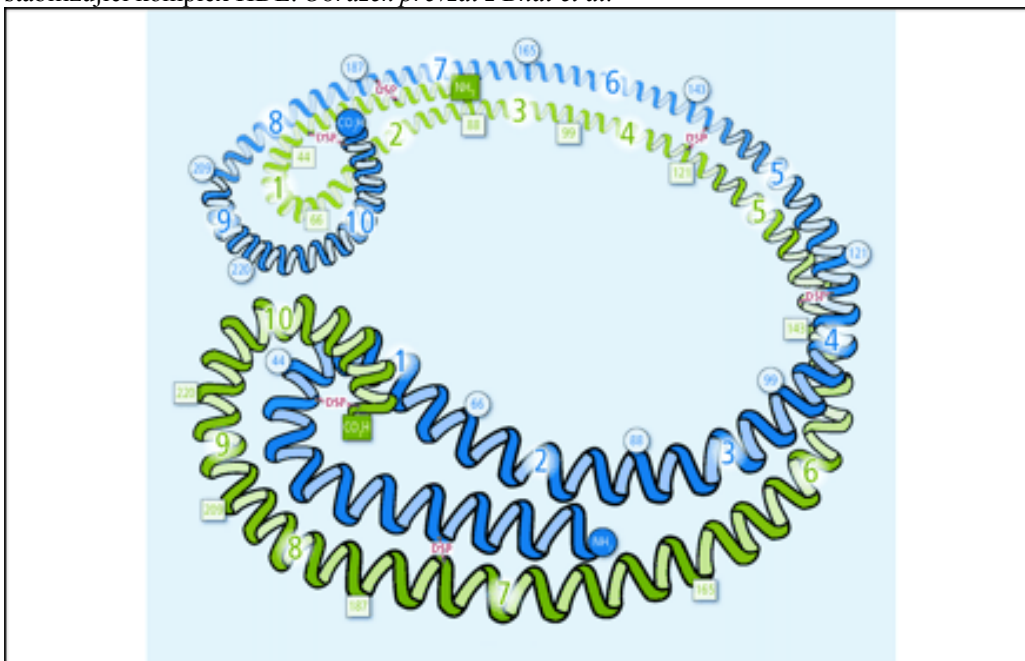
Další možností jak zvýšit hladinu apolipoproteinů je použití peptidových mimetik, jejichž vliv na aterosklerózu zkoumali Garber et al. (2006)²⁰ ApoA-I má doménu asociovanou s lipidy, která je tvořena amfipatickou helikální strukturou třídy A (obrázek 5.1). Peptidová analoga, která nemají homologní sekvenci s doménou apoA-I, ale mají strukturu motivu třídy A, se pouze neasociují s fosfolipidy, ale mají rovněž několik vlastností apoA-I.

Peptid 4F, obsahující čtyři fenylalaniny v nepolární části molekuly, má podobné pozitivní účinky jako apoA-I. V mnoha zvířecích pokusech inhiboval aterosklerózu, měl antiinflamatorní i antioxidantní vlastnosti a zlepšoval cévní funkce. Je-li syntetizován s D-aminokyselinami, může se navíc podávat i per os.

Nyní se zkoumá řada dalších peptidových mimetik, která mohou přispět k lepšímu porozumění funkce apoE.

Obrázek 5.1. Lipidy vázající konformace apoA-I.

Amfipatická a α -helikální centrální doména apoA-I obklopuje lipidovou dvojvrstvu podobně jako „pás“, zatímco globulární N-terminální doména apoA-I vytváří „smyčku“. Tato konformace pak maximalizuje interakci mezi N a C-terminálním koncem. Spojení typu protein-protein pak nejspíš stabilizuje lipidy slabě vázající globulární N-doménu apoA-I prostřednictvím interakce s vysoce hydrofobní C-terminální doménou. Toto spojení funguje jako „přezka opasku“ stabilizující komplex HDL. *Obrázek převzat z Bhat et al.²¹*



5.6 Ostatní látky

Ve vývoji jsou další agonisté nukleárních transkripčních receptorů – PPAR. Tito agonisté jsou na rozdíl od fibrátů, ovlivňujících PPAR s nízkou selektivitou, vysoce senzitivní pro jednotlivé subtypy PPAR (α , γ a β/δ). Společným znakem genů regulovaných tímto receptorem je jejich vliv na tukový metabolismus. K těmto látkám patří například i glitazony, které mají vysokou afinitu k PPAR γ , nicméně výsledky z klinických studií s nimi jsou nejednoznačné.

LXR a RXR zasahují mnoho klíčových molekul zprostředkujících výdej cholesterolu z buněk. Agonisté pro tyto receptory mají antiaterogenní účinky při pokusech na myších, nicméně pozorované nežádoucí účinky spojené s aplikací, tj. hypertriacylglycerolémie a steatóza jater, v současnosti brání jejich klinickému využití.

Další možností zvýšení plasmatické koncentrace apoA-I, která se intenzivně zkoumá, je zvýšení exprese jeho genu prostřednictvím genové terapie nebo jeho přímé dodání do cirkulace. Tohoto může být dosaženo infuzí rekombinantních komplexů apoA-I s fosfolipidy, nebo peptidů napodobujících strukturou i funkcí apoA-I (kapitola 5.5). Kromě toho vedou ke zvýšení koncentrace apoA-I i některé jiné látky jako alkohol nebo estrogeny. Jejich použití je ale v této indikaci limitováno vedlejšími účinky.

6. ApoA-I_{Milano}

ApoA-I_{Milano} je varianta lidského apoA-I lišící se záměnou cysteinu za arginin na pozici 173 tohoto 243 aminokyselin dlouhého apolipoproteinu (Sirtori a Franceschini, 1982; Weisgraber et al., 1983).^{22,23}

Tato varianta lidského proteinu byla poprvé objevena v séru člověka žijícího v geograficky izolované vesnici Limone sul Garda v severní Itálii (Gualandri et al., 1985).²⁴ Následně byli identifikováni další nosiči heterozygotní pro apoA-I_{Milano} (Gualandri et al., 1985b).²⁵

6.1 Hladina HDL u nosičů mutace apoA-I_{Milano}

Nosiči mutace apoA-I_{Milano} mají velmi nízkou plasmatickou hladinu HDL cholesterolu (*0,25-0,78 mmol/l*) a mírnou hypertriacylglycerolémii. Na otázku proč tomu tak je se snažili najít odpověď Roma et al. (1993),²⁶ jenž zkoumali in vivo metabolismus apoA-I_{Milano}. Roma a kolektiv izolovali normální i mutantní apoA-I. To bylo následně označeno radioaktivním I¹²⁵ nebo I¹³¹. Takto upravené apoA-I bylo podáno dvěma normálním kontrolním subjektům a dvěma heterozygotům pro apoA-I_{Milano}. U normálních subjektů bylo apoA-I_{Milano} katabolizováno rychleji než normální apoA-I (5,11 d pro normální apoA-I a 3,91 d pro apoA-I_{Milano}). To potvrzuje kinetickou abnormalitu apoA-I_{Milano} a jeho kratší plazmatický poločas. U nosičů mutace apoA-I_{Milano} byly jak normální, tak mutovaná forma apoA-I, katabolizovány rychleji (od 2,63 po 3,70 d). Produkce apoA-I nebyla změněna (10,3 mg/kg/den u nosičů mutace a 10,4 mg/kg/den u normálních osob).

Na základě uvedených dat se lze domnívat, že je nižší plasmatická hladina apoA-I_{Milano} u nosičů mutace způsobena jeho rychlým katabolismem a ne sníženou produkcí.

6.2 Stav kardiovaskulárního aparátu nosičů mutace apoA-I_{Milano}

Stav kardiovaskulárního systému zkoumali jako první již Franceschini et al., 1985, 1987.^{27,28} Podrobněji pak popsali stav kardiovaskulárního systému nosičů mutace apolipoproteinu A-I_{Milano}, v práci nazývané The Limone sul Garda Study, Sirtori et al. (2001).²⁹ Cílem studie bylo zjistit, zda je zvýšený lipidový a lipoproteinový profil nosičů mutace apoA-I_{Milano} spojen se strukturálními změnami karotid a srdce.

21 dospělých nosičů mutace apoA-I_{Milano} bylo porovnáno s dvojitým počtem příbuzných stejného věku a pohlaví, kteří nebyli nosiči mutace. Hladina HDL cholesterolu u nosičů mutace apoA-I_{Milano} byla v průměru méně než poloviční v porovnání s kontrolními osobami. Dále byly vybrány dvě skupiny osob s primární hypoalphalipoproteinemií (HA), rovněž tak, aby odpovídaly pohlavím a věkem nosičům mutace apoA-I_{Milano}. HA byla definována jako snížení plasmatické hladiny HDL cholesterolu pod 10. percentil. Jedna skupina byla vybrána z osob navštěvujících tamní lipidovou ambulanci (HA-LC) a druhá z databáze dárců krve (HA-BD).

Strukturální změny karotických artérií byly definovány jako ztlustění intimy-médie (IMT), hodnocené ultrazvukem (B-mode).

U osob s HA se našlo ztlustění karotid (průměr IMT, 0,86±0,25 a 0,88±0,29 mm) v porovnání s kontrolní skupinou (průměr IMT, 0,64±0,12 mm), zatímco u nosičů mutace byl zjištěn normální IMT (0,63±0,10 mm). Navíc byla nalezena signifikantně vyšší prevalence aterosklerotických plátů u pacientů a krevních dárců s HA (obojí 57%) v porovnání s apoA-I_{Milano} nosiči (33%) a kontrolními osobami (21%).

Echokardiografický nález ani maximální zátěžové EKG se signifikantně nelišilo u apoA-I_{Milano} nosičů a kontrolních osob, kromě mírného zvýšení end-diastolického rozměru levé komory u nosičů. Zajímavé bylo rovněž zjištění, že

nosiči mutace apoA-I_{Milano} měli o 17% větší cardiac output. Tyto nálezy pravděpodobně souvisejí s lepší distensibilitou srdce v porovnání s kontrolní skupinou a jsou spojeny s nesignifikantním 25% zvýšením maximální dosažené zátěže při cvičení (125±98 versus 101±55 W).

Hodnocení lipoproteinového a apolipoproteinového poměru, jejichž velikost často koreluje s rizikem kardiovaskulárních chorob, ukázalo, že poměr LDL/HDL cholesterolu a apoA-I/B u kontrolních osob byl v normálním rozmezí, a že apoA-I_{Milano} nosiči měli nejvyšší poměr LDL/HDL cholesterolu ze všech 4 skupin a poměr apoA-I/B podobný jako u osob s HA (tabulka 6.1).

Tab. 6.1 Lipoproteinový a apoproteinový poměr u sledovaných skupin

poměr	Kontrolní sk.	ApoA-I _{Milano}	HA-LC	HA-BD
LDL/HDL	3,47±1,73	8,10±4,07	5,24±1,22	5,20±1,63
apoA-I/B	1,60±0,64	0,83±0,35	0,84±0,20	1,03±0,22

Podle Grovera et al. (1998)³⁰ poměr LDL/HDL cholesterolu >4.9 znamená velké riziko KV onemocnění a podle modelu navrženého těmito autory, by tedy mělo být riziko rozvoje KV chorob u nosičů apoA-I_{Milano} 4,3 krát větší než u kontrolních osob.

Závěr této studie potvrdil nálezy dřívějších studií (Franceschini et al., 1985, 1987).^{27,28} a k jejich hodnocení použil moderních metod. Přes závažnou HA se u nosičů mutace apoA-I_{Milano} nevyvíjejí strukturální změny artérií a srdce, zatímco osoby s HA a bez mutace apoA-I_{Milano} mají větší IMT a vyšší prevalenci aterosklerotických plátů.

7. ApoA-I_{Milano} v experimentálních zvířecích modelech

Kromě četných pokusů prováděných in vitro jsou apoA-I a apoA-I_{Milano} již mnoho let používány k ovlivnění aterosklerózy v in vivo experimentech. Nezkoumá se ovšem jen jeho vliv na aterosklerotické pláty a reverzní transport cholesterolu, ale i další potencionální funkce. O těch nejzajímavějších studiích a výsledcích je referováno dále.

7.1 Účinek na aterosklerózu

Například Shah et al. (1998)³¹ zkoumali účinek rekombinantního apolipoproteinu A-I_{Milano} na aortální aterosklerózu u apolipoprotein E-deficitní myši.

Pokus byl proveden na 35 apo E-deficitních myších krmených vysokocholesterolovou dietou. Myši v kontrolní skupině byly zabity v 20. nebo 25. týdnu. Léčené myši obdržely 18 injekcí buď 40 mg/kg apoA-I_{Milano}/PC nebo pouze PC (fosfolipidový komplex) a to intravenózně, každý druhý den, v období mezi 20. a 25. týdnem. Poté byla měřena velikost aortálních plátů, množství cholesterolu v nich a obsah cholesterolu v makrofázích.

V kontrolní skupině došlo mezi 20. a 25. týdnem ke zvětšení aortální aterosklerózy o 59% ($p=0,002$) a obsahu lipidů o 45% ($p=0,02$) bez znatelné změny obsahu lipidů v makrofázích. V porovnání s 20ti týdenní kontrolní skupinou myší, pouze PC léčené myši vykazovaly 32% zvětšení aortální aterosklerózy ($p=0,01$) a výrazný nárůst obsahu lipidů v nich ($p<0,0001$) a to opět beze změny objemu makrofágů.

Naproti tomu u apoA-I_{Milano}/PC léčených myší nedošlo ve stejném období ke zvětšení aortální aterosklerózy, ale došlo ke 40% snížení obsahu lipidů v plátu ($p=0,01$). Navíc se zmenšil objem makrofágů a to o 46% ($p=0,03$), tabulka 7.1.

Tab. 7.1 Efekt apoA-I_{Milano} na aterosklerózu u myší

	aortální ateroskleróza (% aortálního povrchu)	obsah lipidů v plátu (% velikosti plátu)	obsah lipidů v makrofázích (%)
neléčené myši - 20. týden	11±1%	22±8%	10,8±2%
neléčené myši - 25. týden	17±5%; +59%	32±6%; +45%	13,2±6%; +22%
PC léčené myši	15±4%; +32%	47±3%; +114%	11±2%
apoA-I _{Milano} /PC léčené myši	10±4%	13±8%; -40%	5,8±2.9%; -46%

7.1.1 Efekt jediné dávky apoA-I_{Milano}

Cílem jiné studie Shaha et al. (2001)³² bylo zjistit, zda může jedna vysoká dávka apoA-I_{Milano} vést ke změnám ve velikosti a složení aterosklerotických plátů. Model apoE deficitních myší byl zvolen pro nápadnou podobnost lézí u těchto zvířat s pokročilou lidskou aterosklerózou.

ApoE deficicientní myši obdržely intravenózně jednu dávku fyziologického roztoku (n=16), 1080 mg/kg DPPC (dipalmitoylfosfatidylcholin) nebo 400 mg/kg komplexu rekombinantního apoA-I_{Milano} s DPPC v poměru 1:2,7.

Jednu hodinu po injekci byla u myší, které dostaly apoA-I_{Milano}, plasmatická kapacita zprostředkovávající cholesterolový eflux 2x vyšší než v ostatních skupinách. Hladiny plasmatického cholesterolu se před aplikací injekce příliš nelišily. Hodinu po injekci se však hladiny celkového, volného a esterifikovaného cholesterolu signifikantně zvýšily u myší dostávajících rHDL a zůstaly zvýšené po 48 hodin. Hladiny cholesterolu se nezvýšily ve skupině, která dostala pouze fyziologický roztok a ve skupině, jenž dostala DPPC, se mírně zvýšil celkový i volný cholesterol a vrátil se do 48 hodin na původní hodnoty. Zvýšení cholesterolu v první hodině po podání injekce bylo nárůstem jeho HDL frakce, kdežto za 48 hodin po aplikaci zvýšením LDL a VLDL frakce. Hladina apoA-I_{Milano} byla po jedné hodině průměrně téměř 12 mmol/l, ale po 2 dnech spadla na průměrných 1,375 mmol/l.

Obsah lipidů v aterosklerotických plátech aortálního sinu byl po podání apoA-I_{Milano} o 40 až 50% menší než v dalších skupinách (p<0,001).

Množství makrofágů v plátech bylo rovněž menší než v ostatních dvou skupinách a to o 29 až 36% (p<0,05).

Tato studie ukázala, že jediná dávka apoA-I_{Milano} v použitém zvířecím modelu během 48 hodin po aplikaci rychle zvyšuje plasmatickou kapacitu zprostředkovávající cholesterolový eflux, mobilizuje tkáňový cholesterol a redukuje obsah lipidů a makrofágů v aterosklerotických plátech.

V této studii nemělo podání DPPC na lipidové pláty významnější vliv, ačkoliv ten byl prokázán v jiných pokusech (Rodrigueza et al., 1998).³³ Protože je ale zvýšený RTC prostřednictvím fosfolipidových liposomů usnadňován HDL, mohl by být mírný efekt samotného DPPC vysvětlen nízkou hladinou HDL u apoE deficicientních myší.

Možnou limitací studie je, že se nezabývá osudem mobilizovaného cholesterolu a opět neporovnává účinek apoA-I_{Milano} s normálním apo A-I.

Ze kterých tkání pochází cholesterol mobilizovaný po podání HDL není ještě objasněno. Evidentní ovšem je, že alespoň část ho pochází z cévních stěn.

Alam et al. (2001)³⁴ zkoumali odkud pochází cholesterol uvolněný po aplikaci HDL normálním myším. Zjistili, že mobilizovaný cholesterol je ze srdce, kosterního svalstva, plic, sleziny a jater, ale ne z mozku.

Je pravděpodobné, že většina mobilizovaného cholesterolu je doručena do jater, protože ty hrají důležitou roli v jeho eliminaci prostřednictvím biliární exkrece. Nedávno byla popsána zvýšená mobilizace cholesterolu a exkrece sterolů do stolice hyperlipidemických pacientů po podání HDL.

Výzvou pro klinické použití je zejména to, že ačkoli statinová terapie mění skladbu plátů, tyto změny se objevují po týdnech až měsících terapie. Rychlou mobilizací cholesterolu z cévních stěn má apoA-I_{Milano} potenciál stabilizovat aterosklerotické pláty v kratší době.

7.2 Účinek na intimální proliferaci

Maurizio R. Soma et al. (1995)³⁵ zkoumali vliv apoA-I_{Milano} na neointimální proliferaci způsobenou perivaskulární manipulací arteria carotis u králíků krměných 1% cholesterolovou dietou. Manipulace byla provedena neokluzivním, biologicky inertním, měkkým Silastic límcem přiloženým na vypreparované karotidy. U každého zvířete byl následně jeden límec odstraněn (tzv. slepě operovaná artérie) a rány zašity.

Králíci dostávali intravenózně buď HDL obsahující vaječný fosfatidylcholin (EPC) a apoA-I_{Milano} dimer (EPC + rA-I_{Milano}/A-I_{Milano}) nebo pouze EPC liposomy. Zvířata byla náhodně rozdělena do následujících pěti skupin: skupina 1 byla kontrolní, skupiny 2 a 4 dostávaly EPC nebo apoA-I_{Milano} i před operací a skupiny 3 a 5 pouze po operaci.

Plasmatické hladiny cholesterolu v kontrolní skupině rostly progresivně z 1-1,5 mmol/l na 23±6,13 mmol/l v den operace až na 43,5±3,6 mmol/l v době ukončení experimentu. Hodnoty ve skupinách 2 a 3 (pouze EPC) se příliš nelišily od předchozí (22,7±4,37 mmol/l v době operace a 46,9±8 mmol/l na konci studie) ani ve skupině 4 a 5 nebyly hodnoty tolik odlišné (23,5±5,6 mmol/l a 48±12,1 mmol/l).

Kolaterální karotidy vykazovaly normální histologickou strukturu ve všech skupinách, bez ztlustění intimální i mediální tkáně. Periarteriální nasazení flexibilního límce u kontrolních zvířat vedlo k zjevnému nárůstu tloušťky intimy,

tloušťka média se však významně nezměnila (tabulka 7.2). Ztluštění intimy u EPC léčených králíků (skupiny 2 a 3) bylo o něco menší než v kontrolní skupině, což pravděpodobně potvrzuje dřívější zprávy popisující mírnou antiaterogenní aktivitu fosfolipidových infuzí u experimentálních zvířat (Rodriguez et al., 1998).³³

Léčba apoA-I_{Milano} prokazatelně zabránila tvorbě intimálních lézí po perivaskulární manipulaci pouze byla-li zahájena před operací (0,26±0,19). V tomto případě bylo ztluštění o 60% menší než v kontrolní skupině a o 50% než ve skupině EPC léčených. Intima apoA-I_{Milano} předléčených králíků obsahovala také významně méně buněčných vrstev. Naproti tomu byl-li podáván apoA-I_{Milano} až po operaci, nebylo pozorováno žádné ztenčení intimy (0,74±0,14).

Pomocí specifických protilátek bylo zjištěno, že léze indukované periarteriální manipulací se skládaly především z buněk hladké svaloviny (>90%) a obsahovaly rovněž několik makrofágů. Podávání EPC neovlivnilo proliferaci myocytů. Naproti tomu předléčení apoA-I_{Milano} vyústilo v prokazatelnou inhibici proliferace hladkého svalstva.

Tab. 7.2 Efekt apoA-I_{Milano} na intimální proliferaci

skupina	kontrolní skupina	kontrat. artérie	EPC i před op.	EPC jen po op.	apo i před op.	apo jen po op.
ztluštění intimy	0,63±0,11	0,03±0,05	0,50±0,14	0,51±0,07	0,26±0,19	0,74±0,14

7.2.1 Potlačení vzniku restenóz

Proliferace hladkých svalových buněk je jedním z hlavních mechanismů účastnících se procesu restenózy po úspěšné endarterektomii nebo angioplastice. Díky stále se zvyšujícímu počtu katetrizačních výkonů se problém restenóz po provedené angioplastice stává stále významnějším. Bylo identifikováno mnoho látek inhibujících proliferaci hladké svaloviny jako heparin, inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu, inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl–koenzym A reduktázy, inhibitor faktoru Xa a γ -interferon. Jednou z dalších možností, jak zabránit restenózám, je i použití rekombinantních apolipoproteinů tak, jak to udělali Kaul et al., 2003.³⁶ Tento kolektiv prováděl experiment na dvanácti domácích prasatech vážících 25 kg. U každého byla provedena koronarografie s

následnou infiltrací dvou ze tří koronárních artérií 0,4 ml komplexu apolipoproteinu A-I_{Milano} s fosfolipidy (ETC-216) (14 mg/ml) nebo kontrolní substance pomocí infiltračního katétru. Následně byl implantován stent s konečným poměrem stent:arterie 1,3:1.

Následná analýza prokázala signifikantně menší zúžení lumen po aplikaci ETC-216 ($21\pm 22\%$ /ve skupině léčených ETC-216/ versus $43\pm 13\%$ /ve skupině neléčených/ ztráty lumen; $p=0,01$). Histomorfometrická analýza dále ukázala, že aplikace ETC-216 redukuje plochu intimy o 22% ($6,7\pm 1,5$ versus $5,2\pm 1,4$ mm², $p=0,02$) a zvětšuje plochu lumen o celých 76% ($2,1\pm 1,4$ versus $3,7\pm 1,8$ mm², $p=0,02$).

Při vzniku restenózy hrají hlavní úlohu buňky hladkého svalstva cév (vascular smooth muscle cell, VSMC). Konstriktivní přestavba adventicie, která je důležitá u postangioplastické restenózy, se zde tolik neuplatňuje. Proto je nejpravděpodobnějším účinkem ETC-216 inhibice intimální hyperplazie. Přesný mechanismus ale není znám. Avšak ani léčba pomocí ETC-216 zcela nezabrání neointimální proliferaci. To, že podání léku před poškozením intimy vede k inhibici neoproliferace, potvrzuje, že k uvolňování VSMC dochází v časném období po poškození. Neúplný účinek ETC-216 je pak nejspíše zaviněn buď odstraněním látky před kritickou periodou spouštějící restenózu, nebo nedostatečnou dávkou. Malý dávkovací objem infiltračního katétru limituje množství podaného ETC-216. To by bylo možno řešit zvýšením koncentrace ETC-216 nebo vystavením tkáně účinku látky po delší období, např. lék uvolňujícím stentem. Pak by bylo možné očekávat ještě lepší výsledky.

Hlavním zjištěním této studie je, že jedna lokální aplikace ETC-216 vede k inhibici neointimální hyperplazie ke znatelnému snížení poškozením indukovaného zúžení lumen prasečích koronárních artérií po aplikaci stentu. Výsledek studie pak nabízí možnost použití ETC-216 v prevenci vzniku restenóz u lidí.

7.3 Možnost ovlivnění ischemicko-reperfúzního poškození

Termín „reperfúzní poškození“ je definován jako změna reverzibilního poškození buněk na ireverzibilní způsobená obnovením průtoku oxygenované krve do ischemické oblasti. Reperfúze po období ischemie je spojena s tvorbou kyslíkových radikálů, uvolněním oxidovaného glutathionu a tvorbou konjugovaných dienových formací, které jsou známkami oxidativního stresu.

Velmi nadějně jsou závěry práce Marchesiho et al. (2004),³⁷ kteří použili ke zjištění kardioprotektivního účinku ETC-216 experimentálního modelu ischemie myokardu. Ta byla způsobena mechanickou okluzí levé přední descendentní artérie (LAD). Po 30 minutách byla okluze uvolněna a nastala reperfúze.

Byly zvoleny tři rozdílné dávkovací režimy popsané v následujících třech protokolech:

První protokol: měl zjistit rozdíl akutní nebo chronické léčby ischemicko-reperfúzního poškození. 24 králíků (6 králíků na skupinu) obdrželo 100 mg/kg ETC-216 nebo ekvivalentního množství vehikula, buď jako chronickou léčbu (2 dávky podané 1 den před a během operace před začátkem ischemie), nebo jako akutní léčbu jen v době operace.

Druhý protokol: 30 králíků obdrželo akutní dávky 10 mg/kg ETC-216 (n=6) nebo stejné množství vehikula (~1,7 ml; n=6); 3 mg/kg ETC-216 (n=6) nebo vehikula (~0,5 ml; n=6); či 1 mg/kg ETC-216 (n=3) nebo vehikula (~0,17 ml; n=3). Každý králík dostal 60 minutovou intravenózní infuzi začínající 15 minut před 30 minutovou LAD okluzí a přetrvávající 15 minut do 4 hodinové reperfúzní periody.

Třetí protokol: ETC-216 (10 mg/kg) nebo ekvivalentní množství vehikula bylo podáno intravenózně 12 králíkům (n=6/skupina) po dobu 60 minut a to 5 minut před koncem 30 minutové LAD okluze a přesahující 55 minut do 4 hodinové reperfúzní periody.

Velikost infarktu: V prvním protokolu nebyly nalezeny žádné podstatné rozdíly mezi léčenými akutně a chronicky! Ovšem králíci léčení ETC-216 měli signifikantně menší infarktová ložiska než ti, kteří dostávali placebo ($p < 0,05$; hodnotilo se procentuální postižení levé komory-LV).

Ve druhém protokolu u králíků léčených 10 mg/kg ETC-216 vznikla menší infarktová ložiska ($p < 0,0005$) než u těch dostávajících stejnou dávku vehikula ($19,7 \pm 1,6$ /ETC-216/ versus $34,1 \pm 2,3$ /vehikulum/). Podobné hodnoty byly nalezeny i ve skupině léčené 3 mg/kg ($p < 0,05$). Naproti tomu ve třetí skupině (dostávající pouze 1mg/kg ETC-216 nebo stejné množství vehikula) nebyl nalezen žádný rozdíl ve velikosti infarktového ložiska.

Ve třetím protokolu nebyl nalezen rozdíl, když bylo agens podáno 5 minut před koncem trvání ischemie.

Analýza provedená elektronovým mikroskopem prokázala větší strukturní poškození srdcí zvířat léčených pouze vehikulem. Zde bylo prokazatelné poškození kontraktálních struktur a výrazný buněčný edém mitochondrií s poškozenými kristami a osmotickými inkluzními tělísky. Naproti tomu v srdcích zvířat léčených ETC-216 byla struktura sarkomer relativně zachovalá a mitochondrie vypadaly intaktně s minimálními známkami otoku.

Tyto nálezy ukazují, že by ETC-216 mohlo nabídnout novou terapeutickou možnost jak zabránit ischemicko-reperfúznímu poškození. ETC-216 vykazuje prahovou dávku kardioprotektivního účinku, je-li podáno před vznikem ischemie, stejně jako během obnovy krevního zásobení.

To spolu s výše uvedenými nálezy, podle kterých by ETC-216 mohlo bránit vzniku restenóz po implantaci stentu (Soma et al., 1995; Kaul et al., 2003)^{35,36} dělá z tohoto agens velmi zajímavou možnost jak zlepšit léčbu akutních koronárních syndromů.

Přesný mechanismus kterým HDL nebo ETC-216 snižuje velikost ischemicko reperfuzního poškození není znám. Kardioprotektivní efekt těchto agens by však mohl být vysvětlen jejich antioxidačním účinkem, včetně snížení exprese tumor necrosis factor- α (TNF- α) a akumulace lipidových hydroperoxidů v srdci. V izolovaných in vitro systémech zabránily tvorbě lipooxygenázou indukované oxidaci jak monomerní apoA-I_{Milano} tak i apoA-I (Bielicki and Oda, 2002).³⁸ Tyto srovnávací studie ukázaly, že cystein obsahující apoA-I_{Milano} nebo apoA-I_{Paris} byly signifikantně lepší v prevenci tvorby konjugovaných dienu než přirozený apoA-I. Možná v tom může hrát roli disulfidický můstek nebo alternativně přítomnost volného cysteinu (Bielicki and Oda, 2002).³⁸

Poznámka: užívané preparáty ETC-216 obsahují přibližně 10% apoA-I_{Milano} v redukované formě a zbytek je dimerizován.

Ukázalo se, že ETC-216 a HDL preparáty blokují expresi oxidativních signálů, snižují imunoreaktivitu makrofágů v aterosklerotických lézích (Shah et al., 2001)³² a zabraňují zánětem indukované intimální proliferaci (Kaul et al., 2003).³⁶ Tyto vlastnosti jsou doplňkem schopnosti HDL působit regresi aterosklerotických lézí (Shah et al., 2001; Chiesa et al., 2002; Nissen et al., 2003).^{32,39,40} Dohromady tato data ukazují na antioxidační a antiinflatorní vlastnosti přirozeného i syntetického HDL.

Na tomto podkladě vytvořili Marchesi et al.³⁷ hypotézu, že by podávání komplexů apoA-I_{Milano}/POPC (ETC-216) mohlo snižovat tkáňové poškození mechanismem nezávislým na zvýšeném odstraňování lipidů z arteriální stěny (Chiesa et al., 2002)³⁹ a ověřili zda je ETC-216 kardioprotektivní v in vivo studiích experimentální regionální myokardiální ischemie u králíků. Rovněž měřili změny sérových lipidů. Jeden z důvodů hodnocení změn sérových lipoproteinů byl zhodnotit zda tyto změny korelují s kardioprotektivitou.

Minimální efektivní dávka ETC-216 (3mg/kg) byla kardioprotektivní, i když nebyly pozorovány žádné měřitelné změny sérového cholesterolu. To potvrzuje, že mechanismus působení je v tomto případě nezávislý na měřitelné mobilizaci cholesterolu do séra. Ve vyšší dávce ETC-216 byl vzestup sérového HDL-C následován jeho poklesem s následným vzestupem VLDL-C. K podobnému závěru, tedy že intravenózní podání apoA-I_{Milano} zvyšuje hepatální produkci VLDL, došli i Shah et al. (2001)³² (kapitola 7.1.1).

Přesný mechanismus působení ETC-216 vyžaduje další experimenty ke zjištění jeho možného efektu na aktivaci neutrofilů, uvolňování myeloperoxidáz, expresi buněčných adhezních molekul a oxidaci lipidů.

7.4 Efekt na formaci trombu

Jedním ze zjišťovaných účinků apoA-I_{Milano} byl i vliv na formaci arteriálního trombu, jenž hraje podstatnou roli při vzniku akutních koronárních syndromů. Li et al. (1999)⁴¹ použili ve své studii 25 krys dostávajících po dobu 8-10 dnů injekci apoA-I_{Milano} /PC nebo pouze fosfatidylcholinový komplex (PC).

Následně jim byl kolem zevního povrchu břišní aorty obtočen Whatmanův papírek nasáklý 35% FeCl₃. Krevní průtok byl zaznamenáván nepřetržitě prostřednictvím ultrazvukové sondy. Poté byl trombus i s aortou vyjmut a zvážen.

Podávání apoA-I_{Milano} zjevně tlumilo shlukování destiček u všech léčených krys (25±7% versus 50±11% u PC léčených krys p<0,01). Rozdíl v množství destiček mezi skupinami nebyl nalezen.

Aplikace FeCl₃ u PC léčených krys vedlo ke kolísání aortálního průtoku po dobu asi 15 minut, s následným rychlým poklesem krevního průtoku a eventuálně jeho úplným zastavením, znamenajícím vznik uzavírajícího trombu. Jakmile došlo k úplné zástavě průtoku, již se spontánně, během 1 hodiny pozorování, neobjevil u žádného PC léčeného zvířete. Naproti tomu léčba apoA-I_{Milano} zjevně vedla k oddálení tvorby trombu (21,2±4,1 minuty versus 38,8±11,9 minuty). Navíc byl vytvořený trombus často nestabilní, což se projevovalo přechodným návratem krevního průtoku u všech apoA-I_{Milano} léčených krys. Také hmotnost trombu byla mnohem menší než u neléčených krys (18,5±1,8 versus 23,7±2,3 mg/cm, p<0,01). Zato při morfologickém vyšetření trombu nebyly objeveny žádné rozeznatelné odchylky.

Inkubace PRP (platelet-rich plasma), získané centrifugací, s apoA-I_{Milano} vedlo ke snížení ADP-indukované agregaci destiček (množství agregovaných destiček za 5 minut: 22,8±10,7% versus 54,5±20,9%; p<0,01).

Nebyl zaznamenán žádný efekt apoA-I_{Milano} na vazoreaktivní podněty (ani ve smyslu konstriktce či relaxace).

8. ApoA-I_{Milano} v klinických studiích

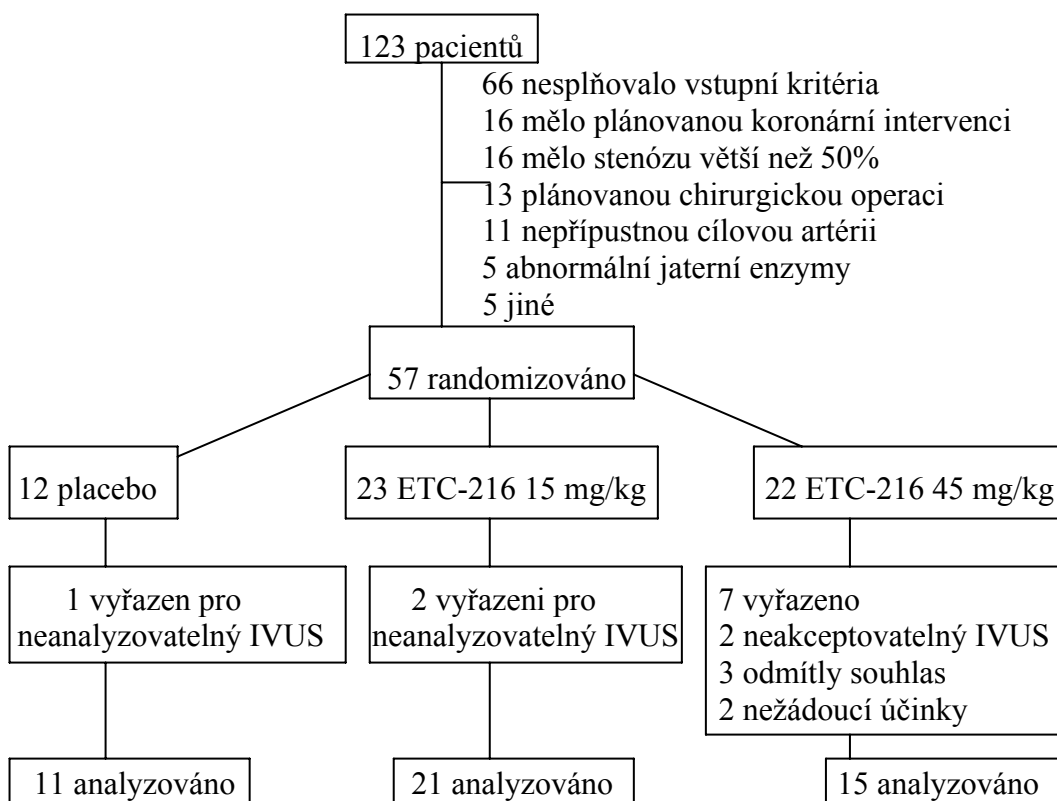
Jak bylo pojednáno v předchozí kapitole, existuje celá řada zvířecích studií o vlivu podávání apoA-I a apoA-I_{Milano} na aterosklerózu i o jeho dalších četných vlastnostech (např. antiinflatorní, antitrombotická, či antioxidační). Mnohé ze závěrů těchto studií jsou velmi zajímavé a dělají z apoA-I_{Milano} nadějně agens pro léčbu kardiovaskulárních chorob. To je samozřejmě nutné ověřit v dlouhodobých klinických studiích. Těch je bohužel zatím málo.

Stěžejní je práce Nissena et al. (2003),⁴⁰ kteří sledovali efekt podávání rekombinantního apoA-I_{Milano} pacientům s akutním koronárním syndromem. Právě pro její důležitost je jí věnováno v následujícím textu více pozornosti. Jedná se tedy o první práci hodnotící možný prospěch podávání HDL-C nebo HDL mimetik u lidí.

Studie byla designovaná jako dvojitě slepá, randomizovaná, multicentrická a placebem kontrolovaná. Porovnávala efekt ETC-216 nebo placebo na koronární aterosklerózu, měřený intravaskulárním ultrazvukem (IVUS).

Účastnilo se jí 10 komunitních a „terciary care“ nemocnic v USA. Probíhala v období mezi listopadem 2001 a březnem 2003.

Schéma 8.1. Výběr a rozdělení pacientů ve studii. *Podle Nissen et al.*⁴⁰



Výběr osob probíhal z pacientů mezi 30. a 75. rokem, kteří podstoupili diagnostickou angiografii během 14 dnů po akutním koronárním syndromu (ACS) a byli diagnostikováni jako nestabilní angina pectoris nebo non-ST infarkt myokardu. Angiografické kritérium bylo: přítomnost obstruktivní léze v hlavní epikardiální cévě velké alespoň 20% průměru lumen. Během 2 týdnů byla

provedena IVUS, kde byl požadován nález hodnotitelného cílového segmentu velkého alespoň 30 mm s ne více než 50% zúžením lumen. Cílová céva nesměla být nikdy léčena angioplastikou. IVUS vyšetření bylo hodnoceno kardiologickou laboratoří na Clevelandské klinice. Důležitým kritériem k zařazení do studie byl dobře hodnotitelný IVUS nález.

Ze 123 vybraných pacientů bylo vhodných 57. Protokol ukončilo celkem 47 pacientů a to 11 ve skupině placebo, 21 ve skupině nízkých dávek ETC-216 a 15 ve skupině vysokých dávek ETC-216. Celkem nedokončilo studii 10 pacientů, z toho dva kvůli nežádoucím účinkům, 3 odmítli souhlas a 5 mělo neanalyzovatelný IVUS nález (kardiologická laboratoř hodnotící IVUS jej shledala nevhodným).

Pacienti byli náhodně rozděleni do tří skupin a to v poměru 1:2:2 (placebo : malé dávky (15 mg/kg) : velké dávky (45 mg/kg) ETC-216). Jako placebo byl použit fyziologický roztok. Léky byly podávány v intravenózní infuzi v týdenních intervalech v celkovém množství 5 dávek. Během dvou týdnů od podání poslední dávky léku byli pacienti opakovaně vyšetřeni IVUS. Během studie bylo pacientům dovoleno pokračovat ve farmakologické terapii dyslipidémie pouze za předpokladu, že dávky léků byly stále stejné. Pacienti, u kterých byla terapie započata nebo přerušena během 6 týdnů před výběrem do studie, byli vyřazeni.

Tab. 8.1 Základní sledované IVUS charakteristiky (vstupní vyšetření). *Podle Nissen et al.*⁴⁰

	placebo	ETC-216; 15 mg/kg	ETC-216; 45 mg/kg
velikost at. plátu (% lumen)	34,8	39,7	37,9
celkový objem plátu (mm ³)	173	296	231
max. tloušťka plátu (mm)	0,65	0,82	0,74

Hlavním hodnoceným parametrem byla změna v procentu velikosti ateromového plátu (tedy zabíral-li před léčbou např. 25% lumen artérie, kolik % zabíral po léčbě). V kombinované skupině léčených ETC-216 (zahrnující léčené nízkými i vysokými dávkami) byla průměrná změna -1,06%. V placebo skupině byla průměrná změna v procentu +0,14% (tabulka 8.2).

Dále se hodnotila:

1. průměrná změna celkového objemu ateromového plátu v kombinované skupině léčených, která činila -14,1 mm³ a v placebo skupině -2,9 mm³ (tabulka 8.3).

2. změna v maximální tloušťce plátu ve skupině léčených činící $-0,042$ mm a $-0,008$ mm pro placebo (tabulka 8.4).

Pokles celkového objemu plátu tedy činil $-14,1$ mm³, tedy 4,2 %.

Tab. 8.2 Procento velikosti ateromového plátu (%). *Podle Nissen et al.*⁴⁰

skupina	počet	vstupní vyšetření		následné vyšetření		změna		p
		průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	
placebo	11	34,80	26,99-39,81	34,94	27,07-41,09	0,14	-1,11 až +1,43	0,97
15 mg/kg	21	39,71	34,16-44,97	38,42	32,78-42,87	-1,29	-2,24 až -0,56	0,03
45 mg/kg	15	37,92	31,92-44,10	37,19	32,81-44,02	-0,73	-1,21 až +0,43	0,45
kombinovaná	36	38,96	34,01-44,53	37,91	32,79-43,53	-1,06	-1,53 až -0,34	0,02

Tab. 8.3 Celkový objem ateromového plátu (mm³). *Podle Nissen et al.*⁴⁰

skupina	počet	vstupní vyšetření		následné vyšetření		změna		p
		průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr	interval	
placebo	11	172,6	58,6-216,5	169,8	58,4-217,8	-2,9	-8,6 až +8,2	0,97
15 mg/kg	21	295,5	173,6-370,7	280,4	161,1-351,6	-15,1	-29,6 až -4,9	0,02
45 mg/kg	15	230,6	90,9-332,9	218,0	89,4-311,1	-12,6	-20,6 až -2,9	0,007
kombinovaná	36	268,4	129,4-359,3	254,4	131,0-337,6	-14,1	-20,7 až -7,2	<0,001

Tab. 8.4 Maximální tloušťka ateromového plátu (mm). *Podle Nissen et al.*⁴⁰

skupina	počet	vstupní vyšetření		následné vyšetření		změna		p
		průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr	interval	
placebo	11	0,649	0,402-0,846	0,641	0,392-0,827	-0,008	-,035 až +,026	0,83
15 mg/kg	21	0,815	0,683-0,953	0,771	0,646-0,865	-0,044	-,079 až -,015	0,03
45 mg/kg	15	0,738	0,531-0,992	0,699	0,457-0,963	-0,039	-,056 až -,007	0,02
kombinovaná	36	0,783	0,578-0,963	0,741	0,552-0,895	-0,042	-,058 až -,020	0,001

Tab. 8.5 Porovnání výsledků v obou skupinách (placebo a ETC-216)

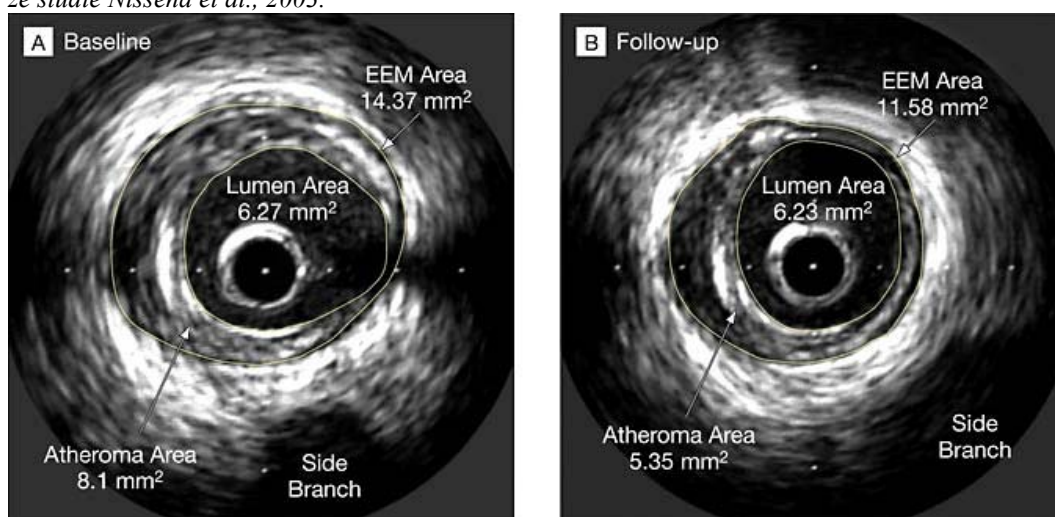
	změna plát/lumen %	změna celk. objemu	max. tloušťka
ETC-216	-1,06	-14,1 mm ³	-0,042 mm
placebo	+0,14	-2,9 mm ³	-0,008 mm

Mírné gastrointestinální poruchy, jako nevolnost se vyskytovaly ve všech třech skupinách. Jeden pacient ve skupině, která dostávala vysoké dávky, měl při jednom vyšetření více jak 3x zvýšenou aspartátaminotransferázu, doprovázenou nauzeou, zvracením a cholelithiasou a byl proto vyřazen ze studie. U jiného pacienta, ze stejné skupiny, se rozvinula kožní reakce spojená s nauzeou, zvracením a rigorem a byl rovněž vyřazen (tabulka 8.6).

Tab. 8.6 Výskyt nežádoucích účinků. Podle Nissen et al.⁴⁰

	placebo	ETC-216, 15 mg/kg	ETC-216, 15 mg/kg
	počet (%), n=12	počet (%), n=23	počet (%), n=22
nausea, zvracení, bolest břicha	7 (58%)	5 (22%)	15 (68%)
abnormální jaterní testy	0	0	1 (4,5%)
cholelitiáza	0	0	1 (4,5%)
CMP	0	1 (4,3%)	0
cefalea	2 (16,7%)	5 (21,7%)	7 (31,8%)
arthralgie	2 (16,7%)	1 (4,3%)	0
retence tekutin nebo otok	1 (8,3%)	1 (4,3%)	1 (4,5%)
hypersenzitivní reakce	0	0	1 (4,5%)

Obrázek 8.1 Při zpracování IVUS nálezů se hodnotil cílový segment koronární artérie. Počítala se plocha mezi membrána elastika externa (EEM area - external elastic membrane area) od které se odečítala plocha lumen. Výsledkem pak byla tzv. ateromová plocha. Obrázek převzat ze studie Nissena et al., 2003.⁴⁰



Přestože pokus trval poměrně krátkou dobu, podařilo se prokázat příznivý účinek podávané látky na velikost aterosklerotických plátů. Pro názornost je uveden případ regrese plátu u ETC-216 léčeného pacienta (tabulka 8.7 a obrázek 8.1).

Tab. 8.7 Příklad regrese ateromového plátu

	plocha EEM, mm ²	plocha lumen, mm ²	plocha plátu, mm ²
před léčbou	14,37	6,27	8,10
po léčbě	11,58	6,23	5,35

Nikdy dříve nebyla pozorována taková rychlost a velikost změny aterosklerotických plátů jako v této studii. Např. Brown et al. (2002)⁴² podávali kombinaci simvastatinu a niacinu a angiograficky zjistili úbytek procenta velikosti

ateromového plátu o 0,4% po 3-leté léčbě. V této studii došlo za 5 týdnů ke zmenšení o 1%. Zde se ovšem hodnotila velikost plátu pomocí IVUS metody, která zjišťuje změny plátu uvnitř cévní stěny a ne změny lumen. Redukce ve velikosti aterosklerotického plátu se mohou totiž objevit i beze změn ve velikosti lumen, jak je to dokumentováno na předchozím příkladu.

Studie navíc poskytuje nový pohled na patofyziologii aterosklerózy. Tradičně je na tento proces pohlíženo spíše jako na stabilní a progredující. Tato práce však ukazuje, že se jedná o proces dynamický, s možnou regresí plátů. Navíc se nabízí nová strategie léčby pacientů s ACD s možným podáváním HDL-C mimetik v akutní fázi s následným přechodem na udržovací léčbu s pomocí tradičních antilipidemik.

Tato studie se po svém zveřejnění stala jednou z nejcitovanějších prací a od jejího vydání se její citace objevuje snad v každé studii týkající se apoA-I, apoA-I_{Milano} nebo aterosklerózy. Je ovšem evidentní, že i tato studie má svá omezení. Otázku jestli bude součástí preventivní kardiologie týdenní aplikace injekcí HDL-C si kladli Sergio Fazio a MacRae F. Linton (2003),⁴³ kteří rovněž popsali některé nedostatky této studie.

Zaprvé Nissen et al.⁴⁰ necítili potřebu porovnat účinek apoA-I_{Milano} s normálním apoA-I. Podobně jako předchozí práce na experimentálních zvířatech, ani tyto výsledky nedávají jasný důkaz o tom, že cévní změny byly způsobeny vlastní strukturou apoA-I_{Milano} a ne obecným účinkem apoA-I. Co je možná ještě víc překvapující je, že autoři nesledovali změny HDL cholesterolu ani jiných parametrů lipidového metabolismu. To je ztracená ohromná příležitost, neboť vytvoření vztahu mezi cévními změnami a změnou hladiny plasmatického HDL cholesterolu by umožnilo lépe předpovědět budoucí terapeutické použití této medikace.

Jiný zajímavý aspekt této studie byla skutečnost, že účinek apoA-I_{Milano} při hodnocení IVUS vyšetření byl při použití obou dávek stejný. Použité dávky byly 15 nebo 45 mg/kg, a tudíž bychom předpokládali i signifikantní nárůst koncentrace celkového apoA-I v plasmě. Ale protože účinek normálního apoA-I na aterogenezi je na dávce závislý, tyto výsledky znamenají, že apoA-I_{Milano} má

dominantně negativní účinek na pool apoA-I, nebo že dokonce menší dávka apoA-I_{Milano} byla nad farmakologickým titračním rozpětím.

Konečně význam této studie je poněkud snížen malým počtem pacientů do ní zahrnutých, což vyústilo v nedostatek statistické významnosti pro porovnání skupiny léčených se skupinou placebo. Ale účinek vlastní intervence na objem aterosklerotického plátu u jednotlivých pacientů (vzhledem k základnímu vyšetření) byl nepopíratelně pozitivní a signifikantní, přestože standardní angiografické vyšetření provedené na stejných pacientech neprokázalo žádné hodnotitelné změny. To potvrzuje, že IVUS je excelentní metoda pro zkoumání stavu koronárních cév s větší citlivostí než angiografie a pravděpodobně lepší prediktivní hodnotou pro klinický výstup. Tento druhý bod zbývá ještě prověřit, protože tak malé změny objemu plátů ještě nemohou být pokládány za klinicky významně prospěšné.

9. Porovnání účinku apoA-I a apoA-I_{Milano}

Jeden z problémů, který provází výzkumy účinků apoA-I_{Milano} je, že žádná studie neporovnává přímo efekt mutantního apoproteínu s normálním apoA-I, který je sám o sobě schopen aktivovat eflux cholesterolu z buněk a tím stimulovat RTC. Existují skupiny studií testujících buď účinky apoA-I_{Milano} (Nissen et al. 2003; Shah et al., 1998 a 2001)^{40,31,31} nebo přirozeného apoA-I (Nicholls et al., 2005).⁴⁴ Obě tyto skupiny dávají pozitivní výsledky.

Nejnověji uveřejněná studie Wanga et al. (2006)⁴⁵ však testuje hypotézu, jestli je léčba aterosklerózy pomocí genové terapie efektivnější, použije-li se apoA-I_{Milano}. Autoři provedli transplantaci kostní dřeně u samic double-knockoutovaných myši postrádajících geny jak pro apo E, tak pro apoA-I. Pro transplantaci byla použita samčí kostní dřeň, na kterou byl přenesen buď samotný retrovirový vektor, retrovir obsahující normální apoA-I nebo konečně gen pro apoA-I_{Milano} a to pod kontrolou promotoru makrofág-specifického scavengerového receptoru A. Myši byly krmeny vysocecholesterolovou dietou a zabity 24 týdny po transplantaci. Následně byl stanoven rozsah aterosklerózy.

V porovnání s kontrolní skupinou (n=12), genová terapie pomocí apoA-I_{Milano} (n=15) snížila aortální aterosklerózu o 65% (p<0,001) a imunoreaktivitu makrofágů v plátu o 58% (p<0,0001), zatímco přirozený apoA-I (n=11) zredukoval aterosklerózu o 25% (p=0,1) a imunoreaktivitu makrofágů v plátu o 23% (p<0,05).

Genová terapie s apoA-I_{Milano} tedy byla v porovnání s normálním apoA-I signifikantně účinnější v redukci aterosklerózy a imunoreaktivity makrofágů. Plasmatické hladiny cirkulujícího cholesterolu, apoA-I nebo apoA-I_{Milano} i lipoproteinový profil byly v rámci skupin srovnatelné.

Závěrem lze tedy konstatovat, že exprese genu apoA-I_{Milano} makrofágy v tomto případě efektivněji redukuje velikost aterosklerózy i zánětu, a to přes srovnatelný lipidový profil. I když tato studie leccos objasňuje, přesto stále čekáme na studii, kde by badatelé podávali zároveň apoA-I i apoA-I_{Milano} a následně porovnali výsledky tohoto podávání.

10. Porovnání účinku apoA-I_{Milano} a statinů

Existuje ohromné množství důkazů o tom, že snižování koncentrace LDL-C statiny vydatně snižuje riziko případných kardiovaskulárních onemocnění (4S, 1994; Heart Protection Study, 2002).^{16,46} V Heart Protection Study bylo statinovou léčbou dosaženo o 1,05 mmol/l menší plasmatické hladiny LDL-C než ve skupině placebo, což bylo spojeno s 25% snížením kardiovaskulárních příhod. Ve studii Cannon et al. (2004)⁴⁷ porovnávající intenzivní a mírnou statinovou terapii byl rozdíl mezi skupinami 0,85 mmol/l. Tento rozdíl by měl znamenat 20% snížení počtu kardiovaskulárních příhod, což je podobná hodnota jako pozorovaných 16%.

Nedávné studie ukazují rovněž na jejich protizánětlivé vlastnosti (Nissen et al., 2005).⁴⁸ To podporuje potencionální roli statinů při stabilizaci plátů a tím i v léčbě akutních koronárních syndromů (Cannon et al., 2004).⁴⁷ Důkazy dále potvrzují, že zvyšování koncentrace HDL může být stejně prospěšné jako snižování LDL-C pokud se jedná o snižování rizika vzniku kardiovaskulárních chorob (Nissen et al., 2003).⁴⁰

Efekt krátkodobého podávání infuzí HDL nebo statinů na aterosklerózu králíků porovnávali Nicholls et al. (2005).⁴⁴

Autoři v pokusu použili nejenom králíčí HDL, ale rovněž zkombinovali (tzv. reconstituted HDL; rHDL) králíčí apoA-I nebo apoA-II s určitými fosfolipidy za vzniku následujících kombinací:

1. komplex apoA-I s 1-palmitoyl-2-linoleoyl fosfatidylcholinem (PLPC)
2. komplex apoA-I s 1,2-dipalmitoyl fosfatidylcholinem (DPPC)
3. komplex apoA-II s PLPC

Vznik ateromu byl indukován kombinací 0,2% cholesterolové diety a poškozením cévní stěny prostřednictvím balónku zavedeného do abdominální aorty. Na konci krmení zvířat speciální dietou následovala 5 denní léčebná fáze, ve které zvířata dostávala intravenózní infuzi: 1. králíčího HDL (n=8); 2. rHDL obsahujícího apoA-I a PLPC (n=6); 3. rHDL obsahujícího apoA-I a DPPC (n=5); 4. rHDL obsahujícího apoA-II a PLPC (n=5); 5. orálně atorvastatin 5mg/kg a den a 6. žádnou léčbu (n=15). Infuze nativního a rHDL byly podány 1. a 3. den léčebné fáze. Atorvastatin byl podáván denně.

Neléčená zvířata měla průměrnou velikost ateromu $2,13 \pm 0,15 \text{ mm}^2$, zatímco po infuzi HDL byla jeho velikost o 36% menší ($1,37 \pm 0,22 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$). Podávání atorvastatinu nemělo na velikost ateromu vliv ($2,10 \pm 0,36 \text{ mm}^2$), viz také graf 1.

Další hodnocený parametr byl poměr hladkých svalových buněk (SMC) k makrofágům, který měl vypovídat o protizánětlivé aktivitě použitého agens. U neléčených zvířat byl $4,7 \pm 0,9$. U HDL léčených naproti tomu 2,6x větší ($12,3 \pm 5,9$; $p < 0,05$) a u zvířat dostávajících atorvastatin dokonce 4x ($18,4 \pm 7,7$; $p < 0,01$), viz také graf 2.

Infuze HDL dále zvýšila expresi trombomodulinu o 112% ($10,4 \pm 3\%$ versus $4,9 \pm 0,7\%$ plochy plátu u léčených, respektive neléčených zvířat; $p < 0,03$). Účinek léčby atorvastatinem na trombomodulin se statisticky nelišil od kontroly. Léčba atorvastatinem ani HDL neovlivnila expresi PAI-1, tkáňového faktoru ani von Willebrandova faktoru (vše zjišťováno pomocí monoklonálních protilátek), viz také graf 3. Expresie MMP-9 (matrix metaloproteináza 9) se snížila o 42% u HDL léčených zvířat ($21,6 \pm 7,4\%$ versus $37,3 \pm 2,6\%$ plochy plátu u HDL

léčených, respektive neléčených králíků; $p < 0,05$) a o 45% při podávání atorvastatinu ($20,4 \pm 6,2\%$; $p < 0,05$), viz také graf 4.

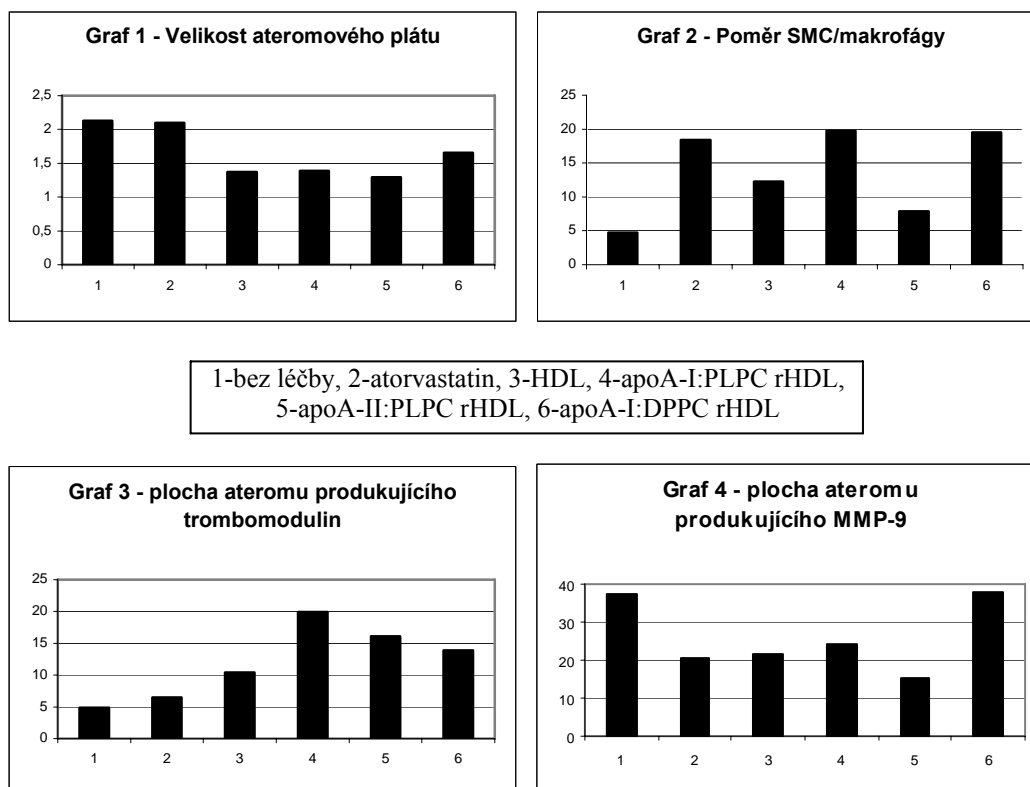
Účinek rHDL

Infuze rHDL obsahujícího apoA-I:PLPC redukovala velikost léze o 35% ($1,38 \pm 0,15 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$) a apoA-II:PLPC o 39% ($1,29 \pm 0,28 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$). Oblast léze nebyla signifikantně zmenšena po infuzi apoA-I:DPPC rHDL ($1,66 \pm 0,28 \text{ mm}^2$).

Poměr SMC/makrofágy byl po apoA-I:PLPC rHDL 4,2x větší ($19,7 \pm 7,9$; $p < 0,01$), pro apoA-I:DPPC r DL 4,1x větší ($19,5 \pm 10,5$; $p < 0,03$). Poměr se signifikantně nezměnil po infuzi apoA-II:PLPC ($7,9 \pm 4,9$).

Expresse trombomodulinu se zvýšila u apoA-I:PLPC rHDL 4,1x ($19,9 \pm 6,8\%$; $p < 0,01$), 2,8x u apoA-I:DPPC rHDL ($13,9 \pm 2,1\%$; $p < 0,01$) a 3,3x u apoA-II:PLPC rHDL ($16,1 \pm 4,6\%$; $p < 0,01$).

Obsah MMP-9 v lézi se snížil o 35% po apoA-I:PLPC rHDL ($24,2 \pm 4,8\%$ $p < 0,05$), o 60% po apoA-II:PLPC rHDL ($15,1 \pm 4,2\%$; $p < 0,01$). Nezměnil se však po infuzi apoA-I:DPPC rHDL ($37,8 \pm 5,5\%$).



Hlavním přínosem této studie je, že jako první přímo porovnává účinky HDL a statinů na velikost, morfologii a složení aterosklerotických plátů. Bylo prokázáno, že infuze HDL jsou stejně účinné jako podávání statinů při tvorbě stabilních plátů a dokonce efektivnější ve zmenšení velikosti lézí v experimentálním modelu aterosklerózy. Statiny zde neměly na velikost léze vliv (viz. graf 1). Infuze HDL měla rovněž příznivý vliv na expresi matrix metaloproteinázy 9 (MMP-9) a trombomodulinu.

Pozoruhodné je, že účinků bylo dosaženo malým množstvím HDL. Králíci obdrželi 2 infuze HDL, přičemž každá obsahovala 25 mg apoA-I (nebo apoA-II). Uvažujeme-li 3kg králíka s plasmatickým objemem asi 120 ml a koncentrací apoA-I 600 mg/l (1,5 mmol/l), pak by jeho množství apoA-I bylo přibližně 70mg. To by bylo zvýšeno infuzí o 25 mg (~30%). Za použití katabolického poměru 0,8 poolu/den by vypočtená koncentrace apoA-I v době usmrcení, 48 hodin po poslední infuzi, byla skoro na původních hodnotách před léčbou!

Tato studie ovšem předchází zjištění rozšiřuje nejen o porovnání s atorvastatinem, ale také tím, že si klade otázku, zda mohou být účinky HDL ovlivněny složením fosfolipidů nebo apolipoproteinů. Možná je ke škodě, že autoři do svého protokolu nezahrnuli rovněž apoA-I_{Milano}. Účinek rHDL byl porovnatelný s účinkem nativního HDL jak v redukci lézí, tak v účinku na vznik stabilnějších plátů. Efektivita rHDL však byl ovlivněna složením částic. Záměna apoA-II za apoA-I ovlivnila některé, ale ne všechny, účinky infuze rHDL. Např. neměla vliv na velikost výsledné léze nebo na příznivý vliv na expresi trombomodulinu a MMP, i když nejspíš zhoršila stabilizační vlastnosti částic na plát měřené poměrem hladkých svalových buněk k makrofágům (viz graf 2). Je pravděpodobné, že zmenšení velikosti léze apoA-II obsahujícími rHDL je způsobeno jejich sekundární schopností zprostředkovat cholesterolový eflux. Nedostatečná schopnost apoA-II obsahujících rHDL zlepšit rovněž buněčnou morfologii lézí, může být odrazem jejich snížené protizánětlivé funkce.

Změna fosfolipidů z PLPC na DPPC mohla zhoršit schopnost rHDL zmenšit velikost léze, neboť redukce ve velikosti léze po infuzi DPPC rHDL nedosáhla statistické významnosti (viz graf 1), ačkoli to nemusí odrážet nic jiného, než malý počet zvířat ve skupině. Na druhou stranu účinek složení

fosfolipidů na schopnost rHDL zprostředkovat cholesterolový eflux je známý. Částice obsahující fosfolipidy s nenasycenými mastnými kyselinami jsou lepšími akceptory buněčného cholesterolu, než ty s nasycenými. To je v soulasu s tím, že dietou indukované změny ve složení mastných kyselin HDL₃ porušují jeho schopnost zprostředkovat cholesterolový eflux. Tento efekt je způsoben obráceným vztahem mezi fluiditou a saturací fosfolipidových acylových řetězců HDL.

Účinek rHDL obsahujícího PLPC nebo DPPC na morfologii arteriálních buněk byl zkoumán na králičím modelu, kde bylo k indukci cévního zánětu použito nasazení neokluzivního periarteriálního límce (Nichols et al., 2005).⁴⁹ V této studii byl zánět inhibován v podobném rozsahu nezávisle na PLPC a DPPC. Je tedy možné, že složení fosfolipidů působí pouze na některé vlastnosti částic rHDL. Pokud se navíc fosfolipidové složení HDL částic mění v závislosti na skladbě lipidů v potravě, je tento fenomén potenciálně klinicky důležitý a vhodný dalšího výzkumu.

10.1 Intenzivní statinová terapie

Intenzivní statinová terapie a její vliv na případnou regresi aterosklerózy byla zkoumána v tzv. ASTEROID studii Nissenem et al. (2006)⁵⁰ Předchozí klinické studie využívající intravaskulárního ultrazvuku (IVUS) prokázaly zpomalení nebo zastavení progresu aterosklerózy během statinové terapie, ale nepodaly přesvědčivý důkaz o možné regresi aterosklerózy použitím procenta ateromového objemu (PAV-percent atheroma volume), nejpřísnejšího IVUS kritéria měření progresu nebo regrese choroby. Proto bylo cílem této studie zjistit, zda intenzivní statinová terapie může vést k regresi koronární aterosklerózy.

Mezi listopadem 2002 a říjnem 2003 bylo vyšetřeno 507 pacientů pomocí IVUS. Po 24 měsících mělo hodnotitelné sériové IVUS vyšetření 349 pacientů. Všichni pacienti dostali intenzivní statinovou terapii rovastatinem v dávce 40 mg/den.

Pro hodnocení primární účinnosti byly stanoveny dva parametry: změna v procentu ateromového objemu a změna nominálního ateromového objemu v 10 milimetrovém subsegmentu s nejhorší závažností choroby. Dále byl hodnocen normalizovaný celkový ateromový objem celé artérie.

Průměrná naměřená výchozí hladina LDL-C klesla ze 3,26 mmol/l na 1,52 mmol/l. Průměrně se tedy hladina LDL-C snížila o 53,2% ($p < 0,001$). Průměrná hladina HDL-C při prvním měření byla 1,078 mmol/l a následně vzrostla o 14,7% na 1,225 mmol/l ($p < 0,001$).

Průměrná změna PAV byla $-0,98\%$ se střední hodnotou $-0,79\%$ (97,5% CI; $-1,21\%$ až $-0,53\%$) ($p < 0,001$; vzhledem ke vstupnímu vyšetření). Průměrná změna objemu ateromu v nejvíce postiženém 10 milimetrovém segmentu byla $-6,1 \text{ mm}^3$ se střední hodnotou $-5,6 \text{ mm}^3$ (97,5% CI; $-6,8$ až $-4,0 \text{ mm}^3$) ($p < 0,001$). Střední změna v celkovém ateromovém objemu byla 6,8% s průměrnou redukcí $-14,7 \text{ mm}^3$ a střední hodnotou $-12,5 \text{ mm}^3$ (95% CI; $-15,1$ až $-10,5 \text{ mm}^3$) ($p < 0,001$).

Pomocí vysoce intenzivní statinové terapie roxustatinem bylo dosaženo průměrné hodnoty LDL-C 1,52 mmol/l a zvýšení HDL-C o 14,7%, což vyústilo ve statisticky významnou regresi ve všech 3 předem stanovených kritériích. Úprava hladin LDL-C pod hodnoty doporučované v současných guidelineech spojená se vzestupem HDL-C, může navodit regresi aterosklerotických ložisek v koronárních cévách pacientů. Je zřejmé, že budou potřeba další studie, které vyhodnotí klinický efekt takovéto terapie.

Zajímavé je srovnání této studie se studií Nissena et al. (2003),⁴⁰ protože obě používají k hodnocení velikosti aterosklerózy stejných parametrů měřených IVUS (tabulka 10.1). V této studii vedla aplikace apoA-I_{Milano} v 5 infuzích během 5 týdnů (1x týdně) k podobnému efektu jako podávání statinů po dobu 2 let.

Tab. 10.1 Srovnání efektu apoA-I_{Milano} a statinů

	doba podávání	PAV (%)	TAV (mm ³)
apo A-I _{Milano}	5 týdnů (celk. 5 dávek)	-1,06	-14,1
statiny	24 měsíců, denně	-0,98	-14,7

Nezanedbatelnou roli samozřejmě hraje i cena takovéto léčby. Dá se předpokládat, že statinová terapie, i když intenzivnější než normální, bude několikanásobně levnější než aplikace apoA-I_{Milano}.

Hlavní rozdíl mezi výsledky, kterých bylo dosaženo v těchto studiích není tedy ve velikosti regrese aterosklerózy, ale v rychlosti, kterou jí bylo dosaženo.

Proto se podávání apoA-I_{Milano} zdá perspektivní spíše v léčbě akutních stavů, kdy je potřeba rychle stabilizovat aterosklerotický plát. Tyto závěry podporují rovněž výsledky studie Shah et al., 2001³² (kapitola 7.1.1), ve které se po jediné dávce apoA-I_{Milano} (400mg/kg) myším snížil obsah lipidů v aterosklerotických plátech o 40 až 50% a množství makrofágů o 29 až 36%.

Statiny jsou zase vhodnější pro dlouhodobé podávání, neboť jsou levnější a podávají se per os. Jak ale bylo uvedeno výše, již dnes existují peptidová mimetika zachovávající si funkce apoA-I, jež je možno podávat perorálně (kapitola 5.5).

Krátkodobé podávání statinů tedy nemá na velikost aterosklerotických plátů vliv, ale zachovává si vliv na skladbu plátů (Nicholls et al., 2005).⁴⁴ Signifikantně snižuje množství makrofágů v plátech a to dokonce více než přirozené HDL ale stejně jako apoA-I PLPC rHDL. Bohužel v tomto případě autoři zapomněli na apoA-I_{Milano}. Dle studie Wang et al. (2006)⁴⁵ (kapitola 9) ale mělo apoA-I_{Milano} 2,6x větší efekt na zmenšení aterosklerózy a 2,5x větší efekt na snížení množství makrofágů v plátech než normální apoA-I. Lze proto pro apoA-I_{Milano} předpokládat přinejmenším tak velký vliv na složení plátů jako mají statiny.

11. ApoA-I_{Milano} v prevenci a léčbě aterosklerózy

Léčba a prevence aterosklerózy je v zájmu odborníků již dlouhou dobu. Vyplyvá to z toho, že ateroskleróza a její přímé důsledky, jako je ischemická choroba srdeční, představují dnes hlavní příčinu mortality. Mezi další choroby vznikající na aterosklerotickém podkladě patří cévní mozková příhoda aterosklerotického typu, vaskulární demence, ischemická choroba dolních končetin, břišní aneuryzma, atd. Tyto stavy rovněž zvyšují jak mortalitu tak morbiditu populace. Celkově vzato představuje ateroskleróza jednu z hlavních příčin mortality a morbiditu populace a na její léčbu nebo léčbu stavů s ní spojených jsou vynakládány každoročně nemalé finanční prostředky.

Z tohoto pohledu je důležitá prevence rozvoje aterosklerózy a její léčba. Pro prevenci jakéhokoli onemocnění je nejprve nutné vybrat osoby, které mají zvýšené riziko rozvoje choroby. V případě aterosklerózy se jedná o kouření, zvýšený krevní tlak, hyperlipoproteinémii, obezitu a sedavý způsob života,

nepřiměřené pití alkoholu a diabetes mellitus. Z větší části se tedy jedná o příčiny, které spolu navzájem souvisejí (kombinace obezity, hypertriacylglycerolémie, inzulinové rezistence a hypertenze se shrnuje pod názvem Reavenův syndrom nebo též metabolický syndrom X) a jež se dají ovlivnit systémovými opatřeními. Důležité jsou rovněž anamnestické informace o výskytu choroby v rodině, neboť svou roli hrají i genetické faktory.

Primární prevence by tedy měla zahrnovat především informování populace o příslušných rizicích a snahu o změnu životního stylu. Nezbytnou součástí by mělo být odvykání kouření, střídání pití alkoholu, zvýšení pohybové aktivity (aerobní zátěž alespoň 2-3x týdně po dobu 30 minut), zdravé stravování a snahu o co nejefektivnější vypořádání se stresem. Součástí prevence by měly být rovněž preventivní prohlídky s pravidelným měřením krevního tlaku, vážením a alespoň jednou za 5 let se stanovením hladiny cholesterolu. V případě nálezu patologických hodnot je potřeba toto měření opakovat častěji a přistoupit ke zmíněným systémovým opatřením.

Pokud ani toto nevede k dostatečnému zlepšení, nastupuje farmakologická léčba. Sem patří kompenzace diabetu, úprava krevního tlaku a plazmatických hladin cholesterolu.

To, že je farmakologická terapie účinná prokázala třeba Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S),¹⁶ která po lipidové terapii zdokumentovala střední změnu v hladině celkového cholesterolu, LDL-C a HDL-C o -25%, -35% a +8%. Během následného v průměru 5,4 let trvajících sledování to znamenalo 35% snížení smrti na koronární příhody. K podobným závěrům došla i Cholesterol and Recurrent Events trial (CARE)⁵¹ sledující stejné parametry u pacientů s mírnou hyperlipidémií. Změny v hladině cholesterolu byly -20%, -28%, +5% a snížení rizika smrti na koronární příhody 24%. Obě dvě studie rovněž zaznamenaly snížení výskytu cévních mozkových příhod a to o 30 a 31%.

Přístup k rizikovým faktorům by měl být odlišný, jedná-li se o primární nebo sekundární prevenci. K tomuto závěru došli Grover et al. (1998),³⁰ jenž porovnávali potenciální množství zachráněných roků života (YOLS-years of life saved) spojené s úpravou rizikových faktorů v rámci primární a sekundární prevence kardiovaskulárních chorob. Mezi vysoce rizikové byli zařazeni pacienti

s 3 rizikovými faktory (hyperlipidémie, kouření cigaret a hypertenze). Pacienti s nízkým rizikem byli ti s izolovanou hypertenzí nebo hyperlipidemií.

Mezi muži a ženami s hyperlipidemií bez kardiovaskulárních chorob (primární prevence) měli podstatně větší prospěch z lipidové terapie ti s velkým rizikem ($4,74 \pm 0,78$ YOLS vs $2,50 \pm 0,25$ YOLS). Mezi těmi s kardiovaskulárními chorobami (sekundární prevence) však nebyl takový rozdíl v prospěšnosti lipidové terapie mezi skupinou s velkým a nízkým rizikem patrný ($4,65 \pm 0,65$ YOLS vs $3,84 \pm 0,58$ YOLS).

Rovněž výsledky pro hypertenzní terapii prokázaly větší prospěch této terapie v rámci primární prevence u osob s velkým rizikem ($1,34 \pm 0,29$ YOLS vs $0,85 \pm 0,13$ YOLS), ale podobný prospěch pro obě skupiny v rámci sekundární prevence ($1,34 \pm 0,29$ YOLS vs $0,85 \pm 0,13$ YOLS).

Že ateroskleróza není nezvratnou záležitostí, a že pomocí účinné terapie lze dosáhnout nejenom zpomalení či zastavení její progresy, ale dokonce její regrese, potvrzuje několik klinických studií jak s apoA-I_{Milano} (Nissen et al., 2003)⁴⁰ tak se zavedenou léčbou statiny (Nissen et al., 2006).⁵⁰ V léčbě aterosklerózy má pro apoA-I_{Milano} největší význam právě srovnání efektu se statinovou léčbou, neboť ta je momentálně hlavní terapií a její používání se opírá o velké množství klinických studií, jež potvrdily její účinnost (kapitola 10).

Výzkumy s apoA-I_{Milano} se nezaměřují pouze na jeho vliv na reverzní transport cholesterolu a aterosklerózu. Zajímavé jsou rovněž zvířecí studie o vlivu apoA-I_{Milano} na reperfúzní poškození a inhibici neointimální proliferace (Soma et al., 1995; Shah et al., 2001; Marchesi et al., 2004).^{35,32,37} Pokud by se potvrdil tento efekt i u člověka znamenalo by to další důvod pro použití apoA-I_{Milano} v léčbě akutních koronárních syndromů. Připočteme-li k tomu všemu potenciální antitrombotický efekt (Li et al., 1999)⁴¹ stalo by se apoA-I_{Milano}, pro svůj vliv na rychlou stabilizaci aterosklerotického plátu, prevenci ischemicko-reperfúzního poškození, inhibici neointimální proliferace a tím i prevenci restenózy téměř ideálním terapeutickým agens.

Závěr

Celkově vzato je apoA-I_{Milano} perspektivním léčebným agens, jehož použití je intenzivně zkoumáno a to především ve studiích na zvířatech. Objevují se ale už i první klinické studie. Je zřejmé, že bude potřeba ještě hodně dlouhodobých prospektivních studií, které potvrdí klinickou prospěšnost takovéto léčby, např. sníženým výskytem kardiovaskulárních příhod. ApoA-I_{Milano} by se tak mohl stát běžnou součástí neinvazivní léčby aterosklerózy.

Souhrn

ApoA-I_{Milano} je varianta lidského apoA-I lišící se záměnou cysteinu za arginin na pozici 173 tohoto 243 aminokyselin dlouhého apolipoproteinu (Sirtori a Franceschini, 1982; Weisgraber et al., 1983).^{22,23}

Tato varianta lidského proteinu byla poprvé objevena v séru člověka žijícího v geograficky izolované vesnici Limone sul Garda v severní Itálii (Gualandri et al., 1985).²⁴ Následně byli identifikováni další nosiči heterozygotní pro apoA-I_{Milano} (Gualandri et al., 1985b).²⁵

Nosiči mutace apoA-I_{Milano} mají velmi nízkou plasmatickou hladinu HDL cholesterolu (*0,25-0,78 mmol/l*) a mírnou hypertriacylglycerolémii. Nižší plasmatická hladina apoA-I_{Milano} je způsobena jeho rychlým katabolismem a ne sníženou produkcí. Přes závažnou hypoalfalipoproteinemii se u nosičů mutace apoA-I_{Milano} nevyvíjejí strukturální změny artérií a srdce.

Pozitivní efekt na kardiovaskulární aparát je dán zvýšením odstraňování cholesterolu z periferních tkání (reverzního transportu cholesterolu). Kromě toho má apoA-I_{Milano} řadu dalších pozitivních vlastností (antiinflatorní, antitrombotickou, antioxidační...).

Zvýšený reverzní transport cholesterolu (RTC) se ve zvířecích experimentech projevil zmenšením aterosklerotických plátů, snížením obsahu lipidů v nich a zmenšením objemu makrofágů (Shah et al., 1998 a 2001).^{31,32}

Na RTC nezávislé vlastnosti dále vedly ke snížení počtu makrofágů v plátech (Shah et al. 2001),³² k inhibici neointimální proliferace (Soma et al., 1995)³⁵ a tím i potlačení vzniku restenóz po implantaci stentu (Kaul et al., 2003),³⁶ snížení ischemicko-reperfuzního poškození (Marchesi et al., 2004)³⁷ nebo inhibici vzniku trombu (Li et al., 1999).⁴¹

V prozatím osamocené klinické studii Nissena et al. (2003)⁴⁰ bylo pozorováno průměrné zmenšení procenta velikosti ateromového plátu o 1,06% (z 38,96% na 37,91%). Celkový objem plátu se zmenšil o 14,1 mm³, tedy o 4,2%. Tohoto snížení bylo dosaženo během 5 týdnů podávání apoA-I_{Milano}. Podobných výsledků lze dosáhnout také podáváním velkých dávek statinů ovšem po dobu 2 let (Nissen et al., 2006).⁵⁰

Summary

ApoA-I_{Milano} is a variant of human apoA-I which differs by substitution, arginine to cysteine, on position 173 of this 243 amino acids-long apolipoprotein (Sirtori and Franceschini, 1982; Weisgraber et al., 1983).^{22,23}

This variant of human protein was found for the first time in serum of a subjects living in geographically isolated village Limone sul Garda in northern Italy (Gualandri et al., 1985).²⁴ Than were identified further heterozygots for apoA-I_{Milano} (Gualandri et al., 1985b).²⁵

Carriers of apoA-I_{Milano} mutation have very low plasmatic level of HDL cholesterol (*0,25-0,78 mmol/L*) and moderate hypertriglyceridemia. Lower plasmatic level of apoA-I_{Milano} is caused by its rapid catabolism and no by reduced production. Despite of severe hypoaliproteinemia, carriers of apoA-I_{Milano} mutation don't develop structural changes of arteries and heart.

Positive effect on cardiovascular system is mediated by increased remove of cholesterol from peripheral tissues (reverse cholesterol transport). Out of this has apoA-I_{Milano} a lot of further properties (antiinflammatory, antitrombotic, antioxidant etc.).

Increased reverse cholesterol transport (RCT) was demonstrated in animal experiments by reduction of atherosclerotic plaques, lipid content and volume of macrophages (Shah et al., 1998 a 2001).^{31,32}

RCT-independent properties lead to reduction of macrophages in atherosclerotic plaques (Shah et al. 2001),³² inhibition of neointimal proliferation (Soma et al., 1995)³⁵ and in the same manner impede restenosis development (Kaul et al., 2003).³⁶ Also reduce ischemia-reperfusion injury (Marchesi et al., 2004)³⁷ or inhibit arterial thrombus formation (Li et al., 1999).⁴¹

There is only one clinical trial designed by Nissen et al. (2003).⁴⁰ This trial demonstrated the change in mean percent atheroma volume -1.06% (from 38.96% to 37.91%). The mean change in total atheroma volume was -14.1 mm³ (4.2%). ApoA-I_{Milano} was administrated during 5 weeks (one dose weekly). Similar results were also described using intensive statin therapy but after 2 years of administration (Nissen et al., 2006).⁵⁰

Seznam použité literatury

1. Murray RK. et al. Harperova biochemie. Praha : Nakladatelství a vydavatelství H&H, 2001. 872 s. ISBN 80-7319-003-6
2. Schneiderka P. Poruchy metabolismu lipidů. Praha: Ústav klinické biochemie VFN a 1.LF UK. Dostupnost z [www: <http>//www.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text7.htm](http://www.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text7.htm)
3. Králová Lesná I, Kovář J, Poledne R. Reverzní transport cholesterolu. *Cor Vasa*. 2006;48:114–120.
4. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res*. 2000;41:1481–1494.
5. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized LDL: Steps 2 & 3. *J Lipid Res*. 2000;41:1495–1508.
6. Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, et al. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. *Circulation*. 2001;103:2283–2288.
7. Wadham C, Albanese N, Roberts J, et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein inflammatory activity. *Circulation*. 2004;109:2116–2122.
8. Barter P. Cardioprotective effects of high-density lipoproteins: the evidence strengthens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1305-1306.
9. Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:C7-12.
10. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol*. 2002;15:439-446.
11. Paffen E, Demaat MP. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc Res*. 2006;71:30-39.
12. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, et al. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circulation Research*. 2004;95:764.
13. Miller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Tromso heart-study. High-density lipoprotein and coronary heartdisease: a prospective case-control study. *Lancet*. 1977;1:965–968.

14. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein—the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989;321:1311–1316.
15. Genest J, Mc Namara J, Salem DN, Schaefer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1991;67:1185–1189.
16. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344:1383–1389.
17. Frick MH, Elo O, Haapa K, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1987;317:1237–1245.
18. Manninen V, Elo MO, Frick MH, et al. Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *JAMA.* 1988;260:641–651.
19. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR trial). *Am. J. Cardiol.* 2003;92:152–160.
20. Garber DW, Handattu SP, Datta G, et al. Atherosclerosis and vascular disease: effects of peptide mimetics of apolipoproteins. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006;7:235-240.
21. Bhat S, Mary G. Sorci-Thomas, Eric T. Alexander et al. Intermolecular Contact between Globular N-terminal Fold and C-terminal Domain of ApoA-I Stabilizes Its Lipid-bound Conformation. *J. Biol. Chem.* 2005;280:33015-33025
22. Sirtori CR and Franceschini G Apolipoprotein AIMilano. (The first molecular variant of human apolipoproteins). *Ric Clin Lab.* 1982;12:83–86.
23. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Bersot TP, et al. Apolipoprotein A-IMilano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *J Biol Chem.* 1983;258:2508–2513.
24. Gualandri V, Franceschini G, Sirtori CR, et al. A-I_{Milano} apoprotein identification of the complete kindred and evidence of a dominant genetic transmission. *Am J Hum Genet.* 1985;37:1083–1097.

25. Gualandri V, Orsini GB, Cerrone A, et al. Familial associations of lipids and lipoproteins in a highly consanguineous population: the Limone sul Garda study. *Metabolism*. 1985;34:212–221.
26. Roma P, Gregg RE, Meng MS, Ronan R, et al. () In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apoA-IMilano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *J Clin Investig*. 1993;91:1445–1452.
27. Franceschini G, Sirtori CR, Bosisio E, et al. Relationship of the phenotypic expression of the A-IMilano apoprotein with plasma lipid and lipoprotein patterns. *Atherosclerosis*. 1985;58:159–174.
28. Franceschini G, Calabresi L, Tosi C, et al. Apolipoprotein A-IMilano. Correlation between high density lipoprotein subclass distribution and triglyceridemia. *Arteriosclerosis*. 1987;7:426–435.
29. Sirtori CR, Calabresi L, Franceschini G, et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda Study. *Circulation*. 2001;103:1949-1954.
30. Grover SA, Paquet S, Levinton C, et al. Estimating the benefits of modifying risk factors of cardiovascular disease. *Arch Intern Med*. 1998;158:655–662.
31. Shah PK, Nilsson J, Kaul S, et al. Effects of Recombinant Apolipoprotein A-I_{Milano} on Aortic Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Circulation*. 1998;97:780-785.
32. Shah PK, Yano J, Reyes O, et al. High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation*. 2001;103:3047–3050.
33. Rodriguezza WV, Klimuk SK, Pritchard PH, et al. Cholesterol mobilization and regression of atheroma in cholesterol-fed rabbits induced by large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1368:306–320.
34. Alam K, Meidell RS, Spady DK. Effects of upregulating individual steps in the reverse cholesterol transport pathway on reverse cholesterol transport in normolipidemic mice. *J Biol Chem*. 2001;276:15641–15649.
35. Soma RM, Donetti E, Parolini C, et al. Recombinant Apolipoprotein A-IMilano Dimer Inhibits Carotid Intimal Thickening Induced by

- Perivascular Manipulation in Rabbits. *Circulation Research*. 1995;76:405-411.
36. Kaul S, Rukshin V, Santos R, et al. Intramural delivery of recombinant apolipoprotein A-I/Milano/phospholipid complex (ETC-216) inhibits in-stent stenosis in porcine coronary arteries. *Circulation*. 2003;107:2551–2554.
 37. Marchesi M, Booth EA, Davis T, et al. Apolipoprotein A-I/Milano and 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine complex (ETC-216) protects the in vivo rabbit heart from regional ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311:1023-31.
 38. Bielicki JK and Oda MN Apolipoprotein A-I (Milano) and apolipoprotein A-I (Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*. 2002;41:2089–2096.
 39. Chiesa G, Monteggia E, Marchesi M, et al. Recombinant apolipoprotein A-I (Milano) infusion into rabbit carotid artery rapidly removes lipid from fatty streaks. *Circ Res*. 2002;90:974–980.
 40. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc*. 2003;290:2292–2300.
 41. Lee PC, Gibbons GH, Dzau VJ. Cellular and molecular mechanisms of coronary artery restenosis. *Coron Artery Dis*. 1993;4:254-259.
 42. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med*. 2001;345:1583-1592.
 43. Fazio S, Linton MF. Apolipoprotein AI as therapy for atherosclerosis: does the future of preventive cardiology include weekly injections of the HDL protein? *Mol Interv*. 2003;3:436-440.
 44. Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, et al. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2416-2421.
 45. Wang L, Sharifi BG, Pan T, et al. Bone marrow transplantation shows superior atheroprotective effects of gene therapy with apolipoprotein A-I milano compared with wild-type apolipoprotein a-I in hyperlipidemic mice. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1459-1468.

46. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:7–22.
47. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350:1495-1504.
48. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:29–38.
49. Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, et al. Reconstituted high density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2005;111: 1543-1550.
50. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA*. 2006;295:1556-1565.
51. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med*. 1996;335:1001-1009.