

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2006

Marie Metelková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium vlivu hypolipidemik na aterogenní proces
ve stěně cév u experimentálního modelu aterosklerózy I

Školitel: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové 2006

Marie Metelková

Poděkování

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

Obsah

Seznam použitých zkratek	5
1 Úvod.....	6
2 Teoretická část.....	7
2.1 Mikroskopická anatomie cév	7
2.2 Funkce endotelu za fyziologických podmínek	9
2.3 Endoteliální dysfunkce	12
2.4 Ateroskleróza	13
2.4.1 Rizikové faktory	13
2.4.1.1 Neovlivitelné rizikové faktory.....	13
2.4.1.2 Ovlivitelné rizikové faktory	14
2.4.2 Patofyziologie	15
2.5 Adhezní molekuly, VCAM-1	19
2.6 Endoglin(CD105).....	20
2.7 Statiny v léčbě hypercholesterolemie.....	21
2.7.1 Mechanismus účinku statinů.....	21
2.7.2 Pleiotropní účinky statinů.....	22
2.7.3 Atorvastatin.....	22
3 Cíl práce.....	24
4 Experimentální část	25
4.1 Zvířata a předepsaná dieta	25
4.2 Biochemická analýza	26
4.3 Imunohistochemie	26
4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí	29
4.5 Statistická analýza	30
5 Výsledky.....	31
5.1 Biochemická analýza	31
5.2 Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu. 32	
5.3 Stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu.....	35
6 Diskuse	37
7 Závěr.....	41
8 Literatura.....	42

Seznam použitých zkratk

ADP	adenozindifosfát
AP-1	aktivátor proteinu 1
EDGF	endotelový růstový faktor (endothelium-driven growth factor)
eNOS	syntáza oxidu dusnatého
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high-density lipoproteins)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low-density lipoproteins)
MDGF	monocytový růstový faktor (monocyte-driven growth factor)
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PAF	destičkový aktivační faktor (platelet-activating factor)
PBS	phosphate saline buffer
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
TF	tkáňový faktor (tissue factor)
TNF	faktor nekrotizující tumor (tumor necrosis factor)
TXA ₂	tromboxan A ₂
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins)

1 Úvod

Ateroskleróza je nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech Evropy a USA, více než 50% všech úmrtí. Na počátku 20. století byla ateroskleróza v ČR poměrně vzácným postižením, pak ale začal její výskyt prudce stoupat až do dnešní doby, kdy patří ČR v úmrtnosti na komplikace aterosklerózy na přední místa ve světě [16].

Ve 20. století došlo k vývoji řady teorií, které byly schopny, díky rozvoji molekulární biologie a dalších metod, více objasnit děje, které probíhají v ateromatózním plátu. Na základě těchto poznatků nepohlížíme dnes na aterosklerotický plát jako na nejasnou skupinu molekul, ale jako na dynamickou lézi, kterou lze ovlivnit.

Naše poznání však není definitivní, je nám stále mnoho souvislostí ukryto, stále máme prostor pro nové objevování. Je třeba mít na vědomí, že aterosklerotický proces, který se odehrává ve stěně tepny, je složitým dějem, do kterého zasahuje celá řada faktorů. Jistě ještě neznáme všechny možnosti, jak můžeme proces aterosklerózy ovlivnit. Proto je nutné věnovat ateroskleróze a její léčbě pozornost na všech úrovních výzkumu, jak v rovině experimentální - preklinické, tak klinické. Má být naším cílem stále hlouběji poznávat jak ateroskleróze předcházet, včas ji detekovat, efektivně léčit a omezit tak její následky.

Proto také tato diplomová práce byla zaměřena na sledování změn exprese vybraných markerů endoteliální dysfunkce u myšního modelu aterosklerózy po krátkodobém podávání atorvastatinu.

2 Teoretická část

2.1 Mikroskopická anatomie cév

Cévní stěna je složena ze tří koncentrických vrstev neboli tunik. Vnitřní **tunika intima** je tvořena vrstvou endotelových buněk, které lemují lumen cévy, a vrstvou subendotelovou. **Tunika media** obsahuje převážně cirkulárně uspořádaná vlákna hladké svaloviny. Periferní vrstva **tunika adventitia** je tvořena kolagenním vazivem. Najdeme zde fibroblasty a adipocyty, mohou se zde vyskytnout i hladké svalové buňky. Převažují zde longitudinálně uspořádaná kolagenní a elastická vlákna.

Kapiláry, artérie a vény jsou svou stavbou přizpůsobeny své funkci. Stěna **kapilár** se skládá z jedné vrstvy endotelových buněk, které se stáčíjí do trubičky a jsou obklopené bazální laminou. Endotelové buňky jsou ploché polygonální epitelové buňky mezenchymového původu. Jsou vzájemně spojeny mezibuněčnými komplexy (včetně zonulae occludentes) tak, že tvoří trubici. Na různých místech se podél kapilár vyskytují pericyty, buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými částečně obklopují buňky endotelové. Vytvářejí vlastní bazální laminu, která může někdy splývat s bazální laminou buněk endotelových. Pericyty jsou mezenchymové kmenové buňky, mohou kontrahovat a diferencovat se v různé typy buněk.

Artérie mají vyvinuty všechny tři vrstvy. **Tunika intima** je tvořena vrstvou endotelových buněk a vrstvou subendotelovou. Mezi tunika intima a tunika media je membrana elastica interna, která je v artériích malého a středního kalibru viditelná, zatímco ve velkých tepnách se nedá odlišit od ostatních

elastických blanek, které se vyskytují v **tunika media** a nazývají se membranae fenestratae. V této vrstvě se nachází hladké svalové buňky, dále vlákna retikulární a základní amorfní hmota, která obsahuje proteoglykany obsahující chondrotinsulfát. Membrana elastica externa je vyvinuta jen v některých artériích. **Tunika adventitia** je tvořena longitudinálně uspořádanými kolagenními a elastickými vlákny, dále zde nalezneme fibroblasty a nepříliš četné adipocyty.

Srovnáme-li artérii a věnu, pak při stejném průměru má artérie vždy silnější stěnu. Artérie má nejsilnější tunika media, zatímco vena tunika adventitia. U **venul a malých a středních vén** je **tunika intima** tvořena endotelem, pod kterým je jen velmi málo subendotelového vaziva. **Tunika media** je tenká, sestává se jen z několika málo vrstev hladkých svalových buněk. **Tunika adventitia** je nejtlustší vrstvou tvořenou longitudinálně uspořádanými kolagenními vlákny, mohou se vyskytnout i hladké svalové buňky. Struktura **velkých vén** se mění v závislosti na lokalizaci cévy v organismu. **Tunika intima** je většinou dobře vyvinuta, subendotelová vrstva je silnější než u malých vén. Jsou zde i hladké svalové buňky. **Tunika media** je tenká. Svalovina je redukována, převládá tkáň vazivová. **Tunika adventitia** představuje nejtlustší vrstvu stěny velkých vén. Ve vénách, ležících pod úrovní srdce, obsahuje tato vrstva svazky longitudinálně uspořádaných hladkých svalových buněk. V malých a středně velkých vénách jsou vyvinuty **chlopně**. Jsou to párové kapsovitě výchlípkové tunika intima tvořené elastickou vazivovou tkání lemovanou po obou stranách endotelem [29].

2.2 Funkce endotelu za fyziologických podmínek

1. Význam endotelu spočívá mimo jiné v jeho funkci bariéry. Různé elementy regulují integritu endotelu a tím i jeho permeabilitu. Ty zahrnují mezibuněčné spoje, buněčné povrchově vázící proteiny, elektrostatický náboj endotelové membrány a složení bazální membrány. Nejdůležitější jsou mezibuněčná spojení, která tvoří fyzikální vazbu mezi dvěma kontinuálními buněčnými membránami [33].

Byly identifikovány tři hlavní typy buněčných spojení mezi endotelovými buňkami: tight junctions, gap junctions a adherens junctions. Systém endotelových spojení je vysoce dynamický a reverzibilní, takže umožní prostup krevních komponent do tkání. Endotelové spoje jsou tvořeny transmembránovými proteiny napojenými na cytoplazmatické a cytoskeletární proteiny [15].

Některé biologické faktory mohou ovlivnit endotelové spoje a tak ovlivnit permeabilitu endotelu. Rychle ji mohou zvýšit mediátory zánětu jako trombin a histamin. Mezi možné mechanismy ovlivnění permeability patří fosforylace proteinů zapojených do struktury endotelových spojů s úsekem aktin-myosin, dostředivá odtažení endotelových buněk a nárůst gap junctions [37].

2. Endotel hraje dvojí roli v regulaci vasomotorického tonu. Produkuje a uvolňuje jak relaxační tak konstriční faktory. V normálním endotelu převažuje vliv vazodilatačních faktorů nad vazokonstričními.

Hlavní vazodilatační faktor produkovaný endotelovými buňkami je **oxid dusnatý (NO)**. V endotelu je syntetizován syntázou oxidu dusnatého (eNOS) [8]. Je produkován jako odpověď na změny průtoku krve, tenzi kyslíku a různé další stimuly. Mimoto může být produkce NO stimulována hormony jako je

acetylcholin a vasopresin [56], dále bradykininem a histaminem, destičkovými faktory, jako serotoninem a adenzindifosfátem (ADP). Bylo také prokázáno, že zánětlivé cytokiny jako TNF a LDL snižují expresi eNOS a tím i syntézu NO [19].

Dysregulace metabolismu NO je detekována u řady cévních chorob zahrnujících aterosklerózu, hypercholesterolemii, diabetes a hypertenzi [9].

Termín eikosanoidy je souhrnný název pro prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany, leukotrieny a kyselinu hydroxyeikosatetraenovou, která může vznikat z různých polynenasycených dvacetihlíkatých mastných kyselin. Nejčastější a biologicky významné eikosanoidy jsou deriváty kyseliny arachidonové (kyselina 5, 8, 11, 14-eikosatetraenová) [30].

Tromboxan A₂ (TXA₂), produkovaný primárně destičkami, působí proti účinku PGI₂. Hlavní biologické účinky TXA₂ jsou vazokonstrikce a agregace destiček, zprostředkované TX receptorem [39].

Endoteliny jsou vazokonstrikční polypeptidy produkované různými tkáněmi jako tři izoformy: ET-1, ET-2 a ET-3. Jako první byl v roce 1988 objeven ET-1, když byl izolován z kultury endotelových buněk [59]. Vazokonstrikční síla ET-1 a ET-2 je srovnatelná ale zároveň větší než ET-3. Endoteliny jsou nejsilnější známé konstriktory, přibližně stokrát silnější než angiotenzin II, navíc ET-1 a katecholaminy vzájemně potencují vazokonstrikční účinek. Primární místo vazokonstrikčního účinku ET-1 je na malých cévách [41].

3. Hemostatická a fibrinolytická funkce endotelových buněk

Jednou z hlavních funkcí endotelu je udržení netrombogenního rozhraní mezi krví a tkání.

Destičky hrají kritickou roli ve vzniku trombóz a spolu se zvýšenou hladinou krevního cholesterolu také v rozvoji aterosklerózy. Hypercholesterolémie vede k aktivaci destiček a vzrůstu interakce mezi destičkami a cévním endotelem. Tento proces je zprostředkovaný von Willebrandovým faktorem a fibulin-fibrinogen komplexem. Degranulace destiček vede k uvolnění silných vazoaktivních faktorů a růstových hormonů, které mohou přispět k poškození endotelových buněk (např. serotonin) nebo stimulovat proliferaci hladkosvalových buněk (např. destičkový růstový faktor PDGF) [18]. Navíc aktivované destičky stimulují přilnavost leukocytů k endotelu a přispívají k oxidaci LDL. Endotelové buňky mohou regulovat aktivitu destiček produkcí a uvolněním faktoru aktivující destičky (PAF). Ten je ale také produkován neutrofily, monocyty, makrofágy, bazofily, eozinofily a mastocyty. Stimulační efekt destičkové aktivace mohou inhibovat produkty endotelových buněk. Například NO i PGI₂ projevují inhibiční účinek na aktivaci destiček. V pokročilých stádiích aterosklerózy může vést zvýšená interakce mezi destičkami a endotelem k utváření trombu. Navíc destičky přispívají k masivní trombotické odezvě spojené s rupturou zralého aterosklerotického plátu [18].

Tkáňový faktor (TF) je integrální membránový protein, jehož extracelulární doména funguje jako receptor pro faktor VII/VIIa. TF se akumuluje v poškozených cévách a aterosklerotických plátech. Domníváme se, že akumulace TF je odpovědná za trombogenicitu plátů [3].

2.3 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními a hemokoagulačními mechanismy. Dochází k převaze vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů s proaterogenním účinkem. Endoteliální dysfunkce hraje důležitou roli v patogenezi cévní aterosklerózy, arteriální hypertenze, diabetu nebo srdečního selhání [45].

Působení aterogenních lipidů je provázeno sníženou aktivitou endoteliálního NO při jeho degradaci tvořenými kyslíkovými radikály, to pak vede k uplatnění růstových faktorů, průniku monocytů a LDL částic subendoteliálně a k tvorbě pěnových buněk. Přítomnost lipoproteinu inhibuje fibrinolýzu a přispívá ke vzniku trombotických komplikací.

Ke strukturálním změnám endotelu, k hypertrofii a hyperplazii hladkých svalových buněk dochází u nemocných s arteriální hypertenzí. Hlavní roli zde hraje zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron a snížená aktivita vazodilatačních působků (NO, prostacyklinu). Dochází ke zvýšení permeability endotelu a expresi adhezních molekul (E-selektinu, ICAM-1, VCAM-1), což umožní adhezi a průnik zánětlivých buněk do cévní stěny [2].

Ke zvýšení permeability endotelu pro aterogenní lipidy vede i hyperglykémie, která je spojená s glykosylací lipoproteinů a glykací bílkovin. Hyperglykémie aktivuje endotel k expresi adhezních molekul, a takto dochází k průniku monocytů přes endotel. Dále k rozvoji endoteliální dysfunkce přispívá zvýšená syntéza kontraktálních a růst stimulačních faktorů (endotelin, angiotensin II, tromboxan A2, PDGF).

K průkazu endoteliální dysfunkce se může použít řada metod mezi které patří: 1. sledování cévní reaktivity na vazoaktivní podněty, kdy sledujeme vazorelaxační schopnosti cév na farmakologické podněty. 2. laboratorní stanovení markerů endoteliální dysfunkce (jako jsou endotelin-1, NO, adhezní molekuly E a P-selektin, ICAM-1, VCAM-1, hemokoagulační faktory (PAI, t-PA, vWf) a zánětlivé mediátory – CRP) a 3. sledování metabolismu značených prekurzorů [42].

2.4 Ateroskleróza

Ateroskleróza je podle WHO definována jako variabilní kombinace změn intimy artérií spojená s ukládáním lipidů (cholesterolu), polysacharidů a krevních elementů a v dalším vývoji tvorbou fibrózní tkáně provázenou ukládáním vápenatých sloučenin, se změnami v medii artérií. Postihuje velké a střední artérie tvorbou subintimálního ztlustění (ateromu), které může vést k omezení nebo až obstrukci krevního průtoku [51].

2.4.1 Rizikové faktory

Rizikové faktory pro vznik aterosklerózy můžeme rozdělit na endogenní, tedy potenciálně neovlivnitelné, a na ty, které je možné vhodným zásahem ovlivnit.

2.4.1.1. Neovlivnitelné rizikové faktory

Mezi neovlivnitelné faktory patří *vyšší věk, mužské pohlaví a rodinná dispozice.*

2.4.1.2. Ovlivnitelné rizikové faktory

Sem řadíme *dyslipoproteinemii, hypertenzi, hyperhomocysteinemii, kouření, diabetes mellitus, obezitu, infekci, nedostatek pohybu, nedostatek estrogenů, nedostatek antioxidantů, nenasycených mastných kyselin a vlákniny, nadbytek přijímané energie, cholesterolu, nasycených mastných kyselin* [54].

Dyslipoproteinemie je nejvýznamnějším rizikovým faktorem. Významná je především zvýšená koncentrace LDL-cholesterolu a zároveň snížená koncentrace HDL-cholesterolu. Především kouření, obezita a nedostatek pohybu má vliv na snížení hladiny HDL-cholesterolu [49].

Kouření zvyšuje riziko postižení periferních tepen, ICHS, cerebrovaskulárních chorob a reokluzí po revaskulizačních výkonech. Na endotel působí toxicky především nikotin a CO. Další látky obsažené v kouři způsobují zvětšenou přilnavost trombocytů a zvýšenou propustnost endotelu. Kouření zvyšuje hladinu LDL-cholesterolu a snižuje HDL-cholesterol [35].

Diabetes mellitus působí prostřednictvím dyslipoproteinemie a glykosylace pojivové tkáně. Hyperinzulinemie poškozuje cévní endotel [24].

Hypertenze. Angiotenzin II přispívá k rozvoji aterogeneze stimulací proliferace buněk cévní hladké svaloviny a k oxidačnímu stresu.

Ukázalo se, že i **chronická infekce** má souvislost s rozvojem aterogeneze. V ateromových plátech byla dokázána přítomnost herpetických virů a *Chlamydia pneumoniae* a zvýšený titr protilátek proti různým infekčním agens.

2.4.2 Patofyziologie

Na patogenezi aterosklerózy se podílí několik faktorů, mezi které patří jednak poškození cévní stěny mechanickými, chemickými nebo infekčními vlivy (vysoký krevní tlak, nikotin, viry, toxiny), tak vysoké hladiny krevních lipidů.

Ateroskleróza se vyvíjí v několika charakteristických stádiích.

První stádium je charakterizované **lipidními proužky**, vyskytuje se pravděpodobně u všech lidí a vzniká již v dětském věku. Lipidní proužky jsou tvořeny shluky pěnových buněk [58].

Aterogenní proces se vyvíjí na základě endoteliální dysfunkce. Reakcí na aterogenní faktory je zvýšené vychytávání lipidů do cévní stěny, adheze monocytů a trombocytů. Monocyty pronikají do intimy, pod vlivem růstových faktorů jako EDGF (endothelium-derived growth factor) nebo faktorů stimulujících tvorbu kolonií jako např. M-CSF dochází k jejich transformaci na makrofágy, které produkují kyslíkové radikály, které mají agresivní účinky na buňky endotelu a blokují účinnost endotelem vytvářeného NO. Tím dochází ke snížení dostupnosti a účinku NO, což vede zejména ke zvýšené adhezi trombocytů a monocytů na endotel a k inhibici jeho antiproliferativního a vazodilatačního působení na hladkou svalovinu cév. Kyslíkovými radikály jsou vcestovalé LDL oxidativně modifikovány, vážou se na subendoteliální proteoglykany a kolagen [49]. Oxidované LDL přímo aktivují endotel, působí chemotakticky na monocyty a zvyšují endoteliální expresi P-selektinu, VCAM-1 a ICAM-1. Výsledkem je aktivace cirkulujících monocytů a T lymfocytů a jejich vstup do intimy cév [25]. Oxidované LDL, které nemohou být vychytávány cestou LDL receptorů, jsou fagocytovány makrofágy a vznikají tzv. pěnové buňky a jejich nahromaděním lipidní proužky. Vstup leukocytů

do subendoteliálních prostor se nazývá „kutálení po endotelu“ a spočívá v interakci mezi lektinovými receptory leukocytů a selektiny. Vytvoření pevné vazby je zprostředkováno interakcí mezi adhezními molekulami VCAM-1 a ICAM-1 a integriny. Transmigraci leukocytů umožňuje molekula PECAM-1, která se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk a interaguje s PECAM-1 molekulou na leukocytech [13].

Druhým stádiem vývoje aterosklerózy je **fibromuskulární plát**, pro který je charakteristická migrace hladkosvalových buněk z medie do intimy a proliferace extracelulární matrix. Makrofágy, podílející se na tvorbě lipidních proužků, produkují řadu látek, které ovlivňují další formování aterosklerotické léze. Ve velké míře produkují chemokin MCP-1, který zesiluje chemotaxi a podílí se na další akumulaci makrofágů v lézi. Dále produkují společně s endotelem destičkový růstový faktor (PDGF), monocytový růstový faktor (MDGF) a zánětlivé IL-1 β a IL-8, které přispívají ke změně kontraktilního fenotypu hladkosvalových buněk na fenotyp syntetický a také podporují proliferaci a migraci hladkosvalových elementů. TNF- α produkovaný aktivovanými makrofágy společně s IL-1 β zvyšuje expresi adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 [7].

V této fázi vstupují do procesu aterogeneze hladkosvalové buňky. Normálně se nacházejí v kontraktilním stavu, podílejí se na udržení cévního tonu, na syntéze extracelulární matrix v medii a na reparaci cévní stěny při různých poraněních. Po změně na syntetický fenotyp (pomocí růstových faktorů a chemokinů makrofágů a T lymfocytů) dochází k rozrušení bazální membrány a změně exprese některých adhezivních molekul. Hladkosvalové buňky se uvolní z vazby na extracelulární matrix v medii a transmigrují

do intimy, kde se vážou prostřednictvím VCAM-1 a ICAM-1 molekul na endotelové buňky, makrofágy a leukocyty. V intimě začnou hladkosvalové buňky produkovat složky extracelulární matrix, zejména kolagen [55].

Kolagen je v aterosklerotických lézích tvořen nejen hladkosvalovými buňkami, ale i endoteliálními buňkami a fibroblasty. Syntéza kolagenu souvisí jak se změnou fenotypu, migrací a proliferací hladkosvalových buněk, tak s řadou lokálních i systémových činitelů (TGF- β , PDGF, angiotensin II, IL-1, homocystein a mechanické napětí stimulují tvorbu kolagenu) [57].

Za předpokladu, že aterogenní faktor přestane v tomto stadiu působit, endotelové buňky ještě mohou regenerovat a postupně obnovit svou funkci. Výsledkem je pouhé ztluštění intimy, která obsahuje pouze jednu nebo dvě vrstvy myocytů, které se zde normálně nevyskytují. Pokud aterogenní faktory stále působí, onemocnění se dále rozvíjí.

Ateromový plát – je to již pokročilá aterosklerotická léze, kde došlo k vytvoření nekrotického lipidového jádra, zformování fibromuskulární čepičky a ukládání vápenatých iontů.

Makrofágy dále pohlcují lipoproteinové částice a částečně dochází k jejich kumulaci ve střední části plátu. Zvýšeně akumulují volný cholesterol, zatímco v počátečních stádiích pohlcovaly estery cholesterolu. Cytotoxické účinky volného cholesterolu zřejmě vedou k odumírání makrofágů. Po zániku makrofágů se lipidy akumulují extracelulárně, uvolní se hydrolytické enzymy a zánětlivé substance a vytvoří se nekrotické lipidové jádro [23].

Také migrace hladkosvalových buněk z intimy do medie pokračuje, a to směrem k povrchu aterosklerotického plátu přes lipidové jádro. Stále syntetizují extracelulární matrix, zejména kolagen, elastin a proteoglykany. Všechny tyto

děje vedou k vytvoření tzv. fibromuskulární čepičky na povrchu aterosklerotického plátu. V nekrotických oblastech plátu navíc dochází k ukládání vápníku a mineralizaci.

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

Vznik trombu – Toto stadium je vlastně již klinickou komplikací aterosklerózy. Ke vzniku trombu může dojít buď při erozi endotelu nebo při ruptuře plátu. Na vzniku trombózy se podílí celá řada faktorů, které často patří mezi obecné rizikové faktory aterosklerózy. Jsou to hyperlipidémie, hyperhomocysteinémie, diabetes, zvýšená koagulační aktivita, snížená fibrinolytická aktivita, atd [21].

Malá eroze endotelu znamená expozici kolagenu a tkáňového faktoru destičkám, čímž vznikají mikrotromby. Vznik těchto mikrotrombů nemá žádný klinický význam. Pokud je eroze a destrukce endotelu větší, dochází ke vzniku tzv. červeného trombu, který obsahuje velké množství destiček, červených krvinek a fibrinu. Tento trombus postupně uzavírá lumen cévy a může dojít až k úplné okluzi. Kromě toho se v místě vzniku trombu rozvíjí zánětlivá reakce s akumulací makrofágů a T lymfocytů [10].

Ruptura fibromuskulární čepičky plátu má za následek styk krve s nejvíce trombogenní oblastí plátu, kterou je kašovitá hmota s velkou koncentrací tkáňového faktoru, který je produkován makrofágy, hladkosvalovými i endotelovými buňkami. Trombus se vytváří v intimě, kde dochází k jeho

inkorporaci do plátu. Pokud je ruptura plátu malá, průtok krve rychlý a vysoká fibrinolytická aktivita, trombus se může uvolnit a dochází k embolizaci nebo může být postupně degradován a žádné klinické komplikace se neobjeví.

Ruptura aterosklerotického plátu je způsobena hlavně mechanickými silami, které působí na plát, a které převáží nad mechanickými vlastnostmi plátu. Stabilitu plátu významně oslabují makrofágy a T lymfocyty produkcí zánětlivých cytokinů a proteolytických enzymů (metaloproteináz), které snižují syntézu a zvyšují degradaci extracelulární matrix. Stabilita je oslabena také kumulací lipidů, degradací kolagenu, apoptózou a sníženou migrační a proliferační aktivitou hladkosvalových buněk [32].

2.5 Adhezní molekuly, VCAM-1

Mediátory zánětlivé reakce endotelové buňky

Rozvoj zánětlivé reakce na cévním endotelu je normální obranný mechanismus jako odpověď na poškození nebo aktivaci cévní stěny. Fyziologický význam takové reakce spočívá v udržování normální struktury a funkce cévní stěny a celého organismu. Ukázalo se, že myši s deficitem exprese adhezních molekul postihují rekurentní infekce. Na druhou stranu, četné iniciace zánětlivé reakce s následujícím rozvojem pozitivní zpětné vazby zánětlivého cyklu mohou vést k těžkému poškození tkáně a to je spojeno s cévní patologií, zahrnující rozvoj aterosklerotických plátů [27].

VCAM-1 stimuluje adhezi lymfocytů a monocytů na povrch cévního endotelu. VCAM-1 mohou vázat eozinofily a bazofily, nikoli však neutrofile. Tato adhezní molekula je primárně exprimována na endotelových buňkách; ale

mohou ji produkovat i buňky hladkých svalů cév nebo buňky kostní dřeně [47]. Mezi nejznámější induktory VCAM-1 exprese patří TNF, IL-1 a oxidovaný LDL. Transkripční regulace VCAM-1 vyžaduje nukleární faktor kappa B (NF- κ B) a aktivátor proteinu-1 (AP-1). Exprese VCAM-1 je také zvýšena podáváním vysokocholesterolové diety u experimentálních modelů aterosklerózy [36]. Exprese na endotelu se objevuje již po týdnu krmení, kdežto exprese v hladkých svalových buňkách se objevuje až po 6 týdnech.

2.6 Endoglin(CD105)

Endoglin je homodimerní transmembránový glykoprotein, tvořící část transforming growth beta (TGF- β) receptor komplexu.

Endoglin je primárně exprimován endoteliálními buňkami, aktivovanými makrofágy, trofoblastem a fibroblasty. Endoglin je považován za významný marker angiogeneze a tudíž je jeho exprese významná jak v embryonálním vývoji, tak také při procesu hojení ran, při infarktech a během kancerogeneze [31]. Je však exprimován i hladkosvalovými buňkami v aterosklerotických plátech [34]. Ukázalo se, že overexprese endoglinu snižuje buněčnou citlivost na TGF- β 1. Mutace genu CD 105 se projeví jako dědičná hemorrhagická teleangiektázie typu I (HHT-1).

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

2.7 Statiny v léčbě hypercholesterolemie

Podávání statinů, které jsou v současnosti považovány za neúčinnější hypolipidemika, představuje jednu z možných cest léčby hypercholesterolemie. Léčba by však měla být komplexní, zaměřená především na celkovou životosprávu. Při dlouhodobém podávání statinů bylo pozorováno snížení výskytu koronárních příhod a celkové snížení mortality. Výhodou této skupiny hypolipidemik je relativně malý výskyt nežádoucích účinků [1].

2.7.1 Mechanismus účinku statinů

Statiny jsou kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu – HMG-CoA reductázy, který katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát, což je jeden z časných kroků v syntéze cholesterolu, ale i dalších důležitých molekul nesteroidní povahy. Inhibice tohoto enzymu vede k snížení syntézy cholesterolu především v jaterních buňkách [14]. Snížení dostupnosti cholesterolu v hepatocytech vede ke zvýšení exprese receptorů pro LDL na povrchu hepatocytů a tím ke zvýšenému vychytávání LDL-částic z krevního oběhu, což vede k poklesu těchto částic v krvi. Snížení množství cholesterolu v hepatocytech způsobuje také snížení produkce VLDL-částic v játrech, to vede ke snížení plazmatické koncentrace triglyceridů, druhotně také ke snížení přeměny VLDL-částic na LDL-částice a tím opět ke snížení koncentrace LDL-cholesterolu [5].

2.7.2 Pleiotropní účinky statinů

U statinů byly prokázány ještě další, tzv. pleiotropní účinky. Mezi ně patří antiproliferační, antioxidační, protizánětlivé (snižují hladinu CRP) a imunomodulační účinky. Statiny zvyšují stabilitu ateromového plátu a jsou odpovědné za pokles trombogenního potenciálu (snižují aktivaci destiček, protrombinu, faktoru XIII, štěpení fibrogenu). Výsledky klinických studií dále prokazují pokles cévní mozkové příhody a prevalence Alzheimerovy nemoci je u pacientů léčených statiny o 60% nižší [22].

2.7.3 Atorvastatin

Atorvastatin je hypolipidemikum ze skupiny inhibitorů HMG-CoA-reduktázy. Je indikován především k léčbě izolované hypercholesterolemie a smíšené lipoproteinemie s převahou zvýšení cholesterolu. Atorvastatin je jako jediný ze statinů indikován u nemocných s homozygotní formou familiární hypercholesterolemie. Dále se využívá v kombinaci s jinými hypolipidemiky k léčbě dalších typů dyslipidemií [26].

Chemicky je atorvastatin 7-[3-fenyl-4-fenylkarbamoyl-2-fluorofenyl-5-(2-propyl)pyrrol-1-yl]-(2R,4R)-2,4-dihydroxyheptanová kyselina. Jedná se o plně syntetický lipofilní statin.

Atorvastatin je po perorálním podání rychle absorbován (asi z 30 %), podléhá výraznému „first-pass” efektu v játrech, takže jeho biologická dostupnost je přibližně 14 %. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 1-2 hodinách [11].

Atorvastatin je z 98 % vázán na plazmatické proteiny, jeho distribuční objem činí 5,8 l/kg. Je metabolizován cytochromem P-450 3A4, z velké části

na biologicky aktivní metabolity, sám je též biologicky aktivní. Avšak 70% jeho inhibiční aktivity vůči HMG-CoA-reduktáze je způsobeno jeho aktivními metabolity. Atorvastatin i jeho metabolity jsou vylučovány převážně žlučí. Biologický poločas eliminace je přibližně 14 hodin. Poločas inhibiční aktivity HMG-CoA-reduktázy je však 20-30 hodin, vzhledem k přítomnosti a delšímu eliminačnímu poločasu jeho aktivních metabolitů. Při jaterní nedostatečnosti je plazmatická koncentrace atorvastatinu výrazně zvýšena [52].

Mezi nejčastější nežádoucí účinky při léčbě statiny patří dyspepsie, nauzea, flatulence, bolesti břicha, zácpa, bolesti hlavy, vzácněji zvracení, závratě, parestezie, alopecie. Nutno však podotknout, že léčba statiny je bezpečná a její profit je podstatně vyšší než její rizika. Potenciálně nejzávažnějším nežádoucím účinkem je myopatie. Lehčí myalgie a svalové křeče se vyskytují u 1-2 % pacientů, závažnější myopatie se vyskytují zřídka. Klinicky nejzávažnější se rhabdomyolýza, která je zcela ojedinělá [50].

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo detekovat a kvantifikovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu ve stěně cévy u kmene myši C57BL/6J, kterým byla podávána aterogenní dieta. Dále byl sledován vliv krátkodobě podávaného hypolipidemika atorvastatinu na změnu v expresi těchto endoteliálních markerů. Pro vizualizaci exprese VCAM-1 a endoglinu byly využity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci jejich exprese stereologické metody.

4 Experimentální část

4.1 Zvířata a předepsaná dieta

Jako experimentální model byli použiti samci myši kmene C57BL/6J ve staří 4 týdnů. Myši byly rozděleny do 2 skupin (v obou skupinách bylo 8 jedinců). První skupinou byly C57BL/6J myši krmeny cholesterolovou dietou obsahující 1.25% cholesterolu, 15% tuků a 0.5% choleové kyseliny (cholesterolová skupina) po dobu 12 týdnů. Druhé skupině myší byl k této cholesterolové dietě přidáván atorvastatin v množství 10mg/kg. Dávka atorvastatinu byla zvolena dle dávky použité v předcházejících experimentech jiných autorů [28]. Všechna zvířata dostávala atorvastatin po dobu 8 týdnů. V průběhu experimentu se nevyskytly žádné rozdíly v týdenních průměrech spotřeby potravy nebo v hmotnosti zvířat.

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

4.2 Biochemická analýza

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

4.3 Imunohistochemie

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm dlouhých segmentech aortálního sinu a aortálního oblouku. Vzorky se ponořily do OCT směsi (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy v chladničce při -80°C . Poté byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce ($7\ \mu\text{m}$) na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C . Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy po 15 minutovém usušení vložily na 10 minut do PBS (phosphate saline buffer). PBS je roztok fosfátových solí, který během barvení sloužil jako pufr o pH 7,4, a vytvářel ideální prostředí pro barvení. Řezy se na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo), aby se zablokovala nespecifická vazebná místa. Poté se nechaly inkubovat s avidinem D (15 minut), opláchly se v PBS, nechaly se inkubovat s biotinem (15 minut) a opět se opláchly v PBS. 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. V experimentu byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) ředěná v BSA 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) ředěná v BSA 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) zředění 1/50.

Všechny protilátky byly zakoupeny ve firmě BD Pharmingen (California, USA) Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do 10% goat séra v PBS. Dále se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) –rat anti-goat u VCAM-1 a endoglinu, která byla značena biotinem (Vector Laboriem, USA) a opět se řezy vložily do roztoku PBS (5 minut). Pak se řezy vložily na 15 minut do 3% roztoku peroxidu vodíku PBS. Opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Připravili jsme ABC komplex elite (Vector Laboriem, USA) z roztoku A a roztoku B, do kterého jsme vložili řezy na 30 minut. Řezy se nechaly opláchnout v PBS. K vizualizaci navázaných protilátek, se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontována do eukittu.

Pracovní postup

- | | | |
|----|-------------------------------------|----------|
| 1. | nechat uschnout řezy | 60 minut |
| 2. | fixace aceton (uschovaný v – 20°C) | 15 minut |
| 3. | usušit | 15 minut |

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

4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí

Plochy endoteliální exprese PECAM-1, VCAM-1 a endoglinu byly kvantifikovány pomocí stereologických metod [44]. Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μ m (0,385mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé imunohistochemické barvení byl vybrán náhodně, a pak se vybral každý jedenáctý řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 200 průsečíků mezi body sítě a aterosklerotickým plátem na jednu cévu [43]. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P$$

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

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

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

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

Fotodokumentace a digitalizace z mikroskopu byla provedena mikroskopem Nikon Eclipse E2000, digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. USA) a za pomoci softwaru LUCIA verze 4.82 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

4.5 Statistická analýza

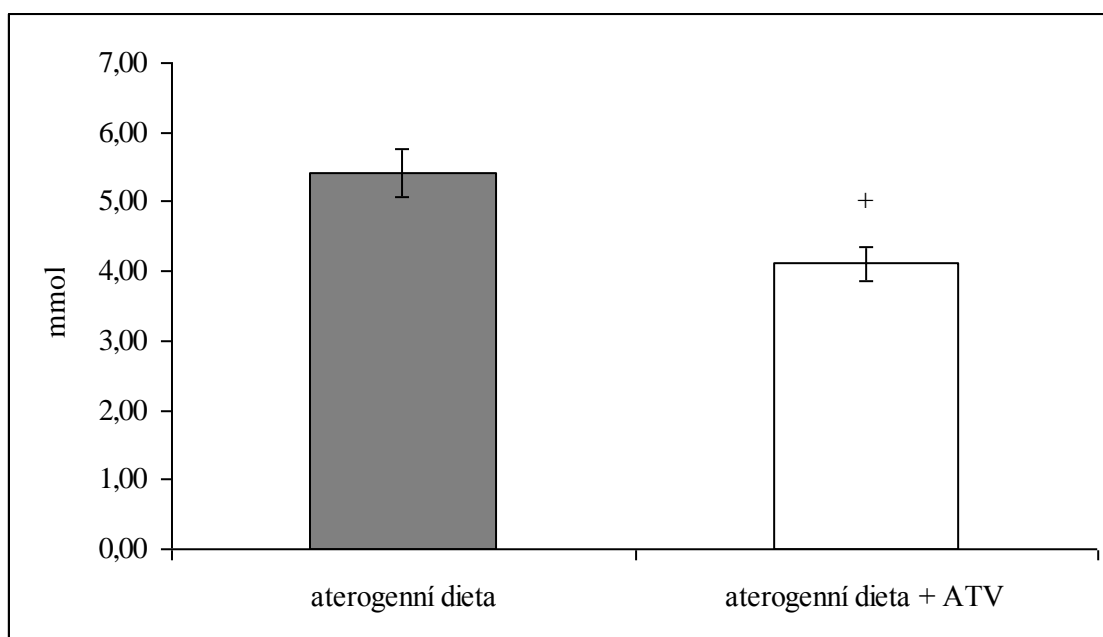
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (One Way Anova). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p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

5 Výsledky

5.1 *Biochemická analýza*

Podávání atorvastatinu u C57BL/6J myší krměných aterogenní dietou významně snížilo hladinu cholesterolu v porovnání s C57BL/6J skupinou myší, kterým byla podávána pouze aterogenní dieta (4.11 ± 0.24 vs. 5.41 ± 0.35 mmol/l, $P = 0.005$).

Graf č. 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou experimentálních skupin. Podávání atorvastatinu výrazně snížilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání se skupinou, které byla podávána pouze aterogenní dieta (* $P = 0.005$).



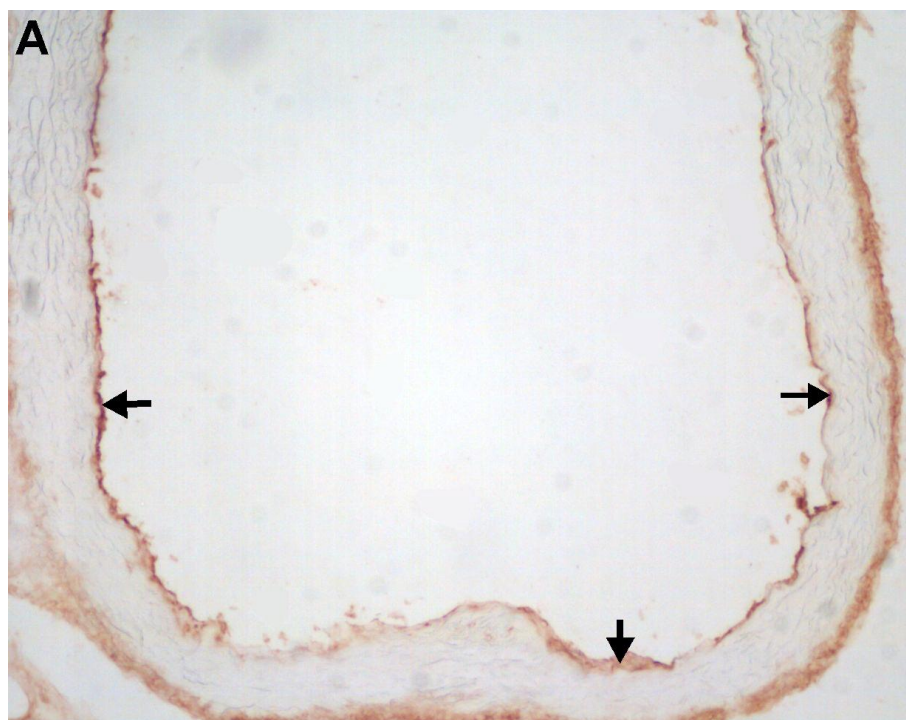
5.2 *Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu.*

V oblasti aortálního sinu a oblouku nebyly u žádné z myší přítomny aterosklerotické léze nebo jiné morfologické abnormality. Exprese PECAM-1 byla zjištěna v endotelových buňkách ve všech skupinách myší. Tato protilátka byla použita jako standard pro detekci intaktního endotelu.

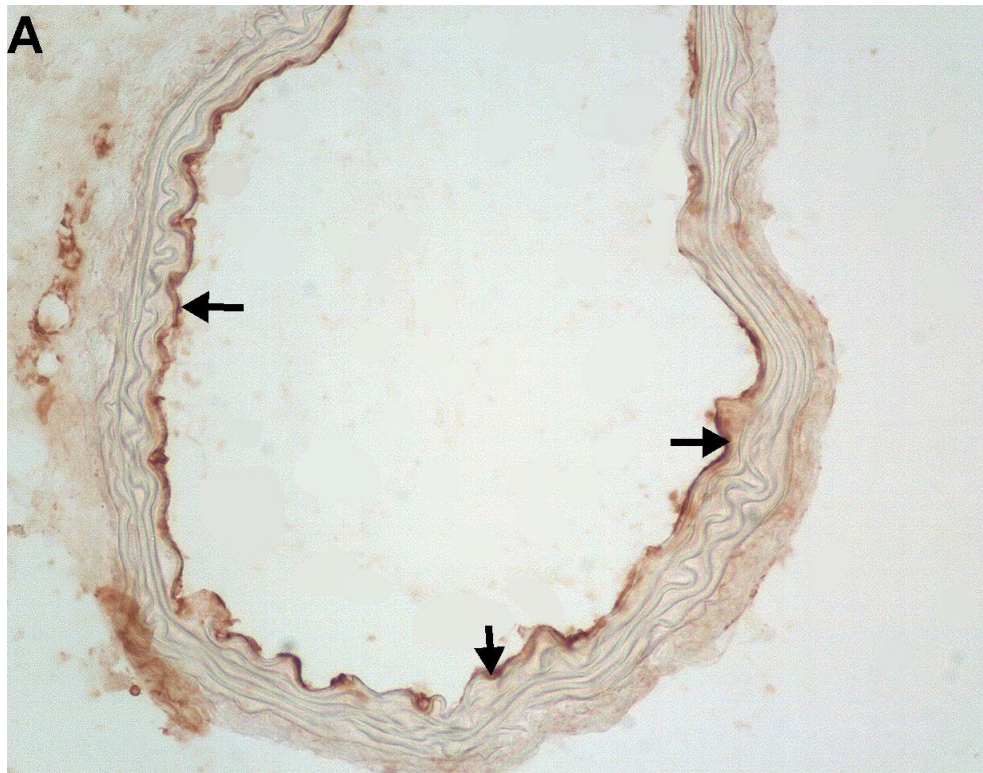
Exprese VCAM-1 byla pozorována převážně v endotelu aorty u obou skupin zvířat. (viz Obr. 1) Pouze velmi slabá exprese byla nalezena v kapilárách okolního myokardu. Podávání atorvastatinu nevedlo k výrazné změně intenzity barvení VCAM-1.

Exprese endoglinu v experimentu byla detekována v endotelu aorty u všech zvířat. Dále byla pozorována v myokardu, a to v kapilárách a v endotelu menších cév. Exprese endoglinu byla podobná z hlediska lokalizace u všech myší v experimentu. Lišila se pouze z hlediska intenzity barvení (viz Obr. 2).

Obr. 1: Expres VCAM-1 v endotelu aortálního sinu cholesterolové skupiny zvířat (A) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B). Expres je pozorována pouze v endoteliálních buňkách (viz. šipky). Intenzita ani typ barvení VCAM-1 nebyly po podávání atorvastatinu výrazně změněny. Zvětšení 100x.



Obr. 2: Exprese endoglinu v endotelu aortálního sinu cholesterolové skupiny zvířat (A) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B). Endoteliální exprese endoglinu byla po podávání atorvastatinu snížena (B). Zvětšení 100x.

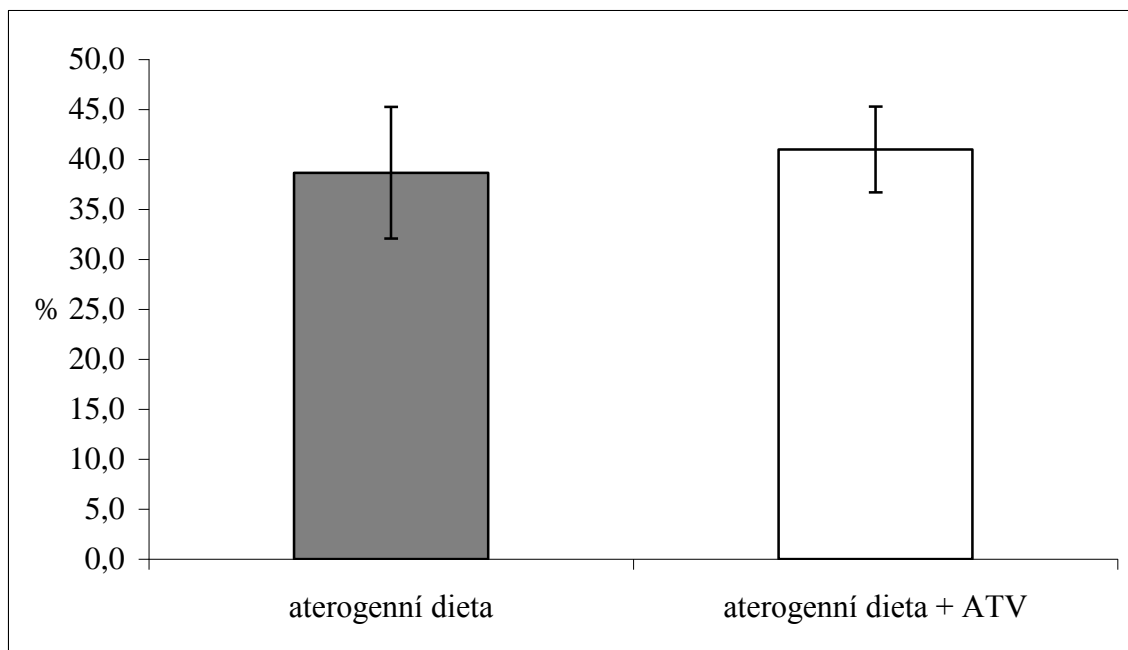


5.3 Stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu

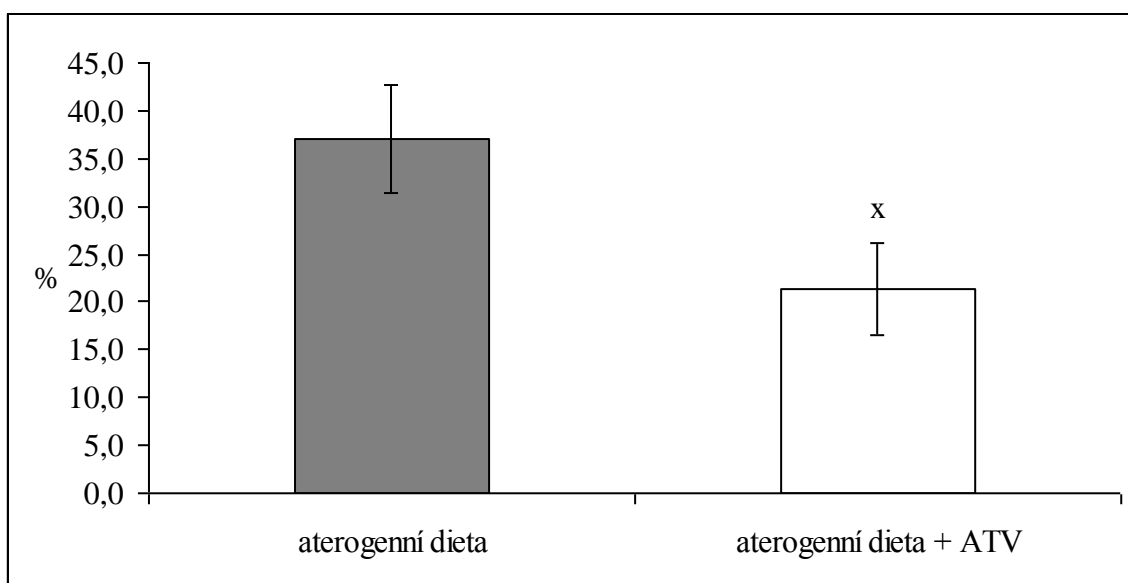
Kvantitativní stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu byla vztažena k expresi PECAM-1 na endotelu, který vyjadřuje 100% přítomnost endoteliálních buněk. Výsledky tedy vyjadřují procento aktivovaných buněk barvených VCAM-1 nebo endoglinem. Podávání atorvastatinu neovlivnilo expresi VCAM-1 u myší krmených cholesterolovou dietou (38.7 ± 6.6 vs. $41.0 \pm 4.3\%$, $P = 0.788$) v porovnání s neléčenými myšmi. (Obr. 1).

Naopak se ukázalo, že endoteliální exprese endoglinu byla signifikantně snížena u skupiny myší C57BL/6J krmených cholesterolovou dietou, které byl podáván atorvastatin (37.1 ± 5.6 vs. $21.3 \pm 4.8 \%$, $P=0.049$) ve srovnání s neléčenou skupinou. (Obr. 2)

Graf č. 2: Stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 v aortálním sinu. Exprese VCAM-1 nebyla po podávání atorvastatinu snížena ve srovnání s nelečenou skupinou (P = 0,788)



Graf č. 3: Stereologická analýza endoteliální exprese endoglinu v aortálním sinu. Kvantitativní analýza prokázala signifikantní snížení exprese endoglinu po podávání atorvastatinu ve srovnání s nelečenou skupinou (^x P=0.049)



6 Diskuse

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze [49]. V souvislosti se zánětem se intenzivně studuje úloha adhezivních molekul, složek imunitního systému, ale i dalších faktorů modifikujících zánětlivou reakci, které tak obecně participují na rozvoji a vzniku klinických komplikací aterosklerózy [20]. Za základní a první krok v patogenezi aterosklerózy je dnes považována endoteliální dysfunkce charakterizovaná aktivací endotelu s následnou expresí zánětlivých, proliferačních, vazokonstrikčních markerů.

Tato diplomová práce byla proto zaměřena na možnosti ovlivnění endoteliální exprese dvou různých markerů VCAM-1 a endoglinu u C57BL/6J myší krměných aterogenní dietou podáváním atorvastatinu.

Adhezní molekuly VCAM-1 a další jako např. ICAM-1, selektiny jsou markery endoteliální dysfunkce, a to jak v časných, tak i pokročilejších stádiích aterogeneze. Jejich exprese se zvyšuje při hypercholesterolemii a jsou zásadní pro vstup makrofágů a lymfocytů do cévní intimy, čímž se výrazně podílejí na progresi aterosklerotických změn.

CD 105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu TGF- β [12]. Exprese endoglinu převládá na endoteliálních buňkách, makrofázích, fibroblastech a hladkých svalových buňkách medie [38]. Kromě toho bylo demonstrováno, že exprese endoglinu je zvýšena během angiogeneze a při vývoji nádorového onemocnění. Mimoto byla exprese endoglinu zvýšena v hladkosvalových buňkách a endoteliálních buňkách v pokročilých aterosklerotických lézích v prasečích karotidách [4].

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

Myši jsou za normálních podmínek vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Hladinu cholesterolu mají kolem 2 mmol/l a cholesterol je lokalizován hlavně v antiaterogenních HDL lipoproteinech a tudíž se u nich neformují aterosklerotické léze. Nicméně, pokud se myšim podává dieta s vysokým obsahem cholesterolu a kyselinou cholovou, jejich hladina cholesterolu se dvojnásobně až trojnásobně zvýší [6]. K indukci hypercholesterolemie a rozvoji aterogenních změn je nejnáchylnější kmen myší C57BL/6J.

Z výše uvedených důvodů jsme v této diplomové práci použili vysoce aterogenní dietu s obsahem 1.25% cholesterolu, 15% tuků a 0.5% cholové kyseliny k tomu abychom přispěli k rozvoji hypercholesterolemie u C57BL/6J myší.

Někteří autoři ukázali, že podávání takovéto diety vede k formování aterosklerotických lézí v oblasti aortálního sinu a aortálního oblouku [46]. Nicméně nám se nepodařilo zjistit žádné aterosklerotické léze ani další morfologické abnormality ve stěně cévy u těchto myší. Toto mohlo být

způsobeno tím, že doba podávání cholesterolové diety nebyla dostatečně dlouhá k indukci rozvoje plátů (12 týdnů) na rozdíl od studií, které používaly 14-18ti týdenní dobu krmení [48], což však v našem případě nevadilo, neboť jsme se chtěli zaměřit především na studium chování endotelu ještě před formováním morfologicky detekovatelných aterosklerotických lézí.

Statiny jsou inhibitory HMG-CoA reduktázy, enzymu, který se podílí na syntéze cholesterolu (na přeměně HMG-CoA na mevalonát). Dochází ke zvýšené expresi LDL receptorů, které odstraňují LDL cholesterol a prekurzory LDL cholesterolu z cirkulace [17]. Řada klinických a experimentálních prací z poslední doby však také jednoznačně poukazuje na to, že statiny zlepšují funkci endotelu, zvyšují stabilitu krevních destiček, snižují oxidační stres a působí také protizánětlivě [53]. Tyto účinky se nazývají jako pleiotropní nebo také nelipidové.

V této práci jsme sledovali vliv atorvastatinu na hladiny celkového cholesterolu a na expresi VCAM-1 a endoglinu v endotelu aorty v oblasti aortálního sinu a aortálního oblouku.

Podávání atorvastatinu významně snížilo celkovou hladinu cholesterolu u myší, které byly krmeny aterogenní dietou. Avšak navzdory hypolipidemickému účinku atorvastatinu se nám nepodařilo zjistit žádné změny v endoteliální expresi VCAM-1. Vysvětlení tohoto faktu může být spojeno s podáváním kyseliny cholové v dietě. Bylo totiž prokázáno, že podávání kyseliny cholové v dietě vede k indukci oxidačního stresu s aktivací NF- κ B transkripčního faktoru. Kyselina cholová v dietě tedy může působit prozánětlivě na cévní endotel a může se podílet na iniciaci aterogenního procesu [40]. Dá se tedy říci, že navzdory významnému hypolipidemickému účinku atorvastatinu

zde zřejmě nedošlo k poklesu exprese VCAM-1 právě díky prozánětlivým účinkům kyseliny cholové na cévní endotel.

Výše popsaný hypolipidemický efekt atorvastatinu byl však doprovázen signifikantním snížením endoteliální exprese endoglinu. Vzhledem k dalším pracím na katedře biologických a lékařských věd, které sledují problematiku exprese endoglinu, tento fakt přispěl k poznání, že zřejmě existuje vztah mezi hladinou cholesterolu a expresí endoglinu, a lze tedy tvrdit, že hypolipidemický účinek atorvastatinu má za následek i snížení exprese endoglinu.

Jak již bylo naznačeno dříve, endoglin je schopen modulovat účinky významného cytokinu TGF- β . Bylo například prokázáno, že endoglin antagonizuje inhibiční účinky TGF- β na endotelové buňky, což pak má za následek rozvoj angiogeneze [40]. Vzhledem k tomu, že TGF- β působí protizánětlivě, inhibuje činnost makrofágů a T lymfocytů a snižuje expresi adhezních molekul [40], lze předpokládat, že zvýšená exprese endoglinu by mohla tyto účinky inhibovat a přispívat tak k rozvoji aterogenních změn. Tudíž snížení exprese endoglinu po podávání statinů by mohlo představovat další z možných mechanismů, jak statiny mohou pozitivně ovlivňovat aterogenní proces.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium exprese vybraných markerů endoteliální dysfunkce VCAM-1 a endoglinu v cévní stěně u kmene C57BL/6J myši po podávání aterogenní diety s obsahem cholesterolu a kyseliny cholové. Exprese těchto markerů byla sledována v oblasti aortálního sinu a aortálního oblouku. Pomocí imunohistochemických a stereologických metod byly hodnoceny změny exprese VCAM-1 a endoglinu po 8 týdenním podávání atorvastatinu.

Biochemická analýza krevních vzorků ukázala, že podávání atorvastatinu způsobilo pokles hladiny celkového cholesterolu v plazmě C57BL/6J myši krmených aterogenní dietou ve srovnání s neléčenou skupinou.

Stereologická analýza imunohistochemického barvení ukázala, že podávání atorvastatinu (10mg/kg denně) signifikantně snížilo endoteliální expresi endoglinu.

Naproti tomu endoteliální exprese VCAM-1 nebyla po statinové terapii změněna.

Tato diplomová práce prokázala možný pozitivní vliv atorvastatinu na expresi endoglinu, který co by modulátor funkce antiaterogenního faktoru TGF- β může hrát významnou roli v procesu aterogeneze.

8 Literatura

- [1] Ahmed, M., and P. Griffiths, Statins and secondary prevention of coronary heart disease. *British Journal of Community Nursing*, 9: 160-165, 2004.
- [2] Anderson, T. J., Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev*, 8: 71-86, 2003.
- [3] Asada, Y., K. Marutsuka, K. Hatakeyama, Y. Sato, S. Hara, A. Kisanuki, and A. Sumiyoshi, The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 4: 135-139, 1998.
- [4] Behr-Roussel, D., A. Rupin, S. Simonet, E. Bonhomme, S. Coumilleau, A. Cordi, B. Serkiz, J. N. Fabiani, and T. J. Verbeuren, Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, 102: 1033-1038, 2000.
- [5] Bellosta, S., N. Ferri, L. Arnaboldi, F. Bernini, R. Paoletti, and A. Corsini, Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care*, 23 Suppl 2: B72-78, 2000.
- [6] Breslow, J. L., Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272: 685-688, 1996.
- [7] Bruunsgaard, H., P. Skinhoj, A. N. Pedersen, M. Schroll, and B. K. Pedersen, Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*, 121: 255-260, 2000.

- [8] Cannon, R. O., 3rd, Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*, 44: 1809-1819, 1998.
- [9] Cardillo, C., and J. A. Panza, Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension. *Vasc Med*, 3: 138-144, 1998.
- [10] Caspar-Bauguil, S., H. Benoist, J. Alcouffe, S. Aiche, N. Auge, A. Negre-Salvayre, R. Salvayre, and M. Thomsen, Oxidized LDL, T lymphocytes, and graft atherosclerosis. *Transplant Proc*, 29: 2328-2329, 1997.
- [11] Cilla, D. D., Jr., D. M. Gibson, L. R. Whitfield, and A. J. Sedman, Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of atorvastatin after administration to normocholesterolemic subjects in the morning and evening. *J Clin Pharmacol*, 36: 604-609, 1996.
- [12] Conley, B. A., J. D. Smith, M. Guerrero-Esteo, C. Bernabeu, and C. P. Vary, Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 153: 323-335, 2000.
- [13] Davies, M. J., J. L. Gordon, A. J. Gearing, R. Pigott, N. Woolf, D. Katz, and A. Kyriakopoulos, The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*, 171: 223-229, 1993.
- [14] Davignon, J., and L. Mabile, [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 62: 101-112, 2001.

- [15] Dejana, E., R. Spagnuolo, and G. Bazzoni, Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost*, 86: 308-315, 2001.
- [16] Dvorakova, A., and R. Poledne, The incidence of infectious diseases and changes in the mortality of atherosclerosis-related complications in the Czech population over the past two decades. *Eur J Epidemiol*, 19: 707-710, 2004.
- [17] Endres, M., and U. Laufs, Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke*, 35: 2708-2711, 2004.
- [18] Farstad, M., The role of blood platelets in coronary atherosclerosis and thrombosis. *Scand J Clin Lab Invest*, 58: 1-10, 1998.
- [19] Forstermann, U., A. Mugge, S. M. Bode, and J. C. Frolich, Response of human coronary arteries to aggregating platelets: importance of endothelium-derived relaxing factor and prostanoids. *Circ Res*, 63: 306-312, 1988.
- [20] Geisler, T., and D. L. Bhatt, The role of inflammation in atherothrombosis: current and future strategies of medical treatment. *Med Sci Monit*, 10: RA308-316, 2004.
- [21] Gosk-Bierska, I., and R. Adamiec, [Inhibitors of platelet receptor GP IIb-IIIa--new possibilities of treatment for atherosclerosis complications]. *Pol Arch Med Wewn*, 99: 497-506, 1998.
- [22] Gotto Jr, A. M., Jr., and J. A. Farmer, Pleiotropic effects of statins: do they matter? *Curr Opin Lipidol*, 12: 391-394, 2001.
- [23] Guyton, J. R., and K. F. Klemp, Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16: 4-11, 1996.

- [24] Hagl, C., J. D. Galla, D. Spielvogel, C. Bodian, S. L. Lansman, R. Squitieri, M. A. Ergin, and R. B. Griep, Diabetes and evidence of atherosclerosis are major risk factors for adverse outcome after elective thoracic aortic surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126: 1005-1012, 2003.
- [25] Hanyu, M., N. Kume, T. Ikeda, M. Minami, T. Kita, and M. Komeda, VCAM-1 expression precedes macrophage infiltration into subendothelium of vein grafts interposed into carotid arteries in hypercholesterolemic rabbits--a potential role in vein graft atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 158: 313-319, 2001.
- [26] Hernandez-Perera, O., D. Perez-Sala, J. Navarro-Antolin, R. Sanchez-Pascuala, G. Hernandez, C. Diaz, and S. Lamas, Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 101: 2711-2719, 1998.
- [27] Hill, G. E., and C. W. Whitten, The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis, and the propagation of disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 11: 316-321, 1997.
- [28] Choudhury, R. P., A. L. Carrelli, J. D. Stern, I. Chereshev, R. Soccio, V. I. Elmalem, J. T. Fallon, E. A. Fisher, and E. D. Reis, Effects of simvastatin on plasma lipoproteins and response to arterial injury in wild-type and apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res*, 41: 75-83, 2004.
- [29] Jarcho, S., J.J. Woodward (1870) on the histology and photomicrography of minute blood vessels. *Am J Cardiol*, 30: 542-546, 1972.
- [30] Johnston, D. V., and L. A. Marshall, Dietary fat, prostaglandins and the immune response. *Prog Food Nutr Sci*, 8: 3-25, 1984.

- [31] Jonker, L., and H. M. Arthur, Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev*, 110: 193-196, 2002.
- [32] Keaney, J. F., Jr., Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*, 21: 99-166, 2000.
- [33] Lampugnani, M. G., and E. Dejana, Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 674-682, 1997.
- [34] Lastres, P., T. Bellon, C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, A. Acevedo, A. Gougos, M. Letarte, and C. Bernabeu, Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*, 22: 393-397, 1992.
- [35] Leone, A., Relationship between cigarette smoking and other coronary risk factors in atherosclerosis: risk of cardiovascular disease and preventive measures. *Curr Pharm Des*, 9: 2417-2423, 2003.
- [36] Ley, K., and Y. Huo, VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 107: 1209-1210, 2001.
- [37] Lum, H., and A. B. Malik, Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol*, 267: L223-241, 1994.
- [38] Ma, X., M. Labinaz, J. Goldstein, H. Miller, W. J. Keon, M. Letarte, and E. O'Brien, Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2546-2552, 2000.

- [39] Maclouf, J., G. Folco, and C. Patrono, Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost*, 79: 691-705, 1998.
- [40] Marsch-Ziegler, U., and G. Palme, The influence of cholic acid and cholesterol on cell proliferation in the gallbladder mucosa of the mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 39: 217-228, 1982.
- [41] Masaki, T., Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35: 235-255, 1995.
- [42] Mysliwiec, M., J. Borawski, B. Naumnik, and A. Rydzewska-Rosolowska, Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia--possibilities of intervention. *Rocz Akad Med Bialymst*, 49: 151-156, 2004.
- [43] Nachtigal, P., V. Semecky, A. Gojova, M. Kopecky, V. Benes, and R. Juzkova, The application of stereological methods for the quantitative analysis of the atherosclerotic lesions in rabbits. *Image Analysis and Stereology*, 21: 165-174, 2002.
- [44] Nachtigal, P., V. Semecky, M. Kopecky, A. Gojova, D. Solichova, P. Zdansky, and Z. Zadak, Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract*, 200: 219-229, 2004.
- [45] Najemnik, C., H. Sinzinger, and H. Kritz, Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca*, 26: 148-153, 1999.
- [46] Nakashima, Y., A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow, and R. Ross, ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14: 133-140, 1994.

- [47] Nakashima, Y., E. W. Raines, A. S. Plump, J. L. Breslow, and R. Ross, Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 842-851, 1998.
- [48] Reddick, R. L., S. H. Zhang, and N. Maeda, Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14: 141-147, 1994.
- [49] Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.
- [50] Schwartz, G. G., A. G. Olsson, M. D. Ezekowitz, P. Ganz, M. F. Oliver, D. Waters, A. Zeiher, B. R. Chaitman, S. Leslie, and T. Stern, Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *Jama*, 285: 1711-1718, 2001.
- [51] Soltero-Perez, I., Toward a new definition of atherosclerosis including hypertension: a proposal. *J Hum Hypertens*, 16 Suppl 1: S23-25, 2002.
- [52] Stern, R. H., J. A. Smithers, and S. C. Olson, Atorvastatin does not produce a clinically significant effect on the pharmacokinetics of terfenadine. *J Clin Pharmacol*, 38: 753-757, 1998.
- [53] Sukhova, G. K., J. K. Williams, and P. Libby, Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 1452-1458, 2002.
- [54] Taylor, A. J., N. S. Arora, J. Bindeman, S. Bhattari, I. M. Feuerstein, and G. O'Malley P, Conventional, emerging, heredity, lifestyle, and psychosocial

coronary risk factors: relationships to subclinical atherosclerosis. *Prev Cardiol*, 9: 25-32, 2006.

[55] Tull, S. P., S. I. Anderson, S. C. Hughan, S. P. Watson, G. B. Nash, and G. E. Rainger, Cellular pathology of atherosclerosis: smooth muscle cells promote adhesion of platelets to cocultured endothelial cells. *Circ Res*, 98: 98-104, 2006.

[56] Vanhoutte, P. M., [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 90 Spec No 6: 9-19, 1997.

[57] Velleman, S. G., R. J. McCormick, D. Ely, B. B. Jarrold, R. A. Patterson, C. B. Scott, H. Daneshvar, and W. L. Bacon, Collagen characteristics and organization during the progression of cholesterol-induced atherosclerosis in Japanese quail. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226: 328-333, 2001.

[58] Xu, Q. B., G. Oberhuber, M. Gruschwitz, and G. Wick, Immunology of atherosclerosis: cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin Immunol Immunopathol*, 56: 344-359, 1990.

[59] Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, and T. Masaki, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 411-415, 1988.