

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

**Atorvastatin a jeho vliv na aterogenní proces u geneticky  
modifikovaného myšího modelu aterosklerózy I**

Konzultant: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

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

**Hradec Králové 2007**

**Mgr. Hedvika Kozáková**

## **PODĚKOVÁNÍ**

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

## **OBSAH**

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>6</b>
2.1 Funkce endotelu za fyziologických podmínek.....	6
2.2 Buněčné adhezní molekuly.....	7
2.2.1 Selektiny .....	7
2.2.2 Integriny .....	8
2.2.3 Imunoglobuliny .....	9
2.2.4 Kadheriny.....	10
2.3 Endoteliální dysfunkce.....	11
2.4 Ateroskleróza.....	12
2.4.1 Rizikové faktory.....	13
2.4.2 Patofyziologie aterosklerózy .....	15
2.5 ApoE/LDLR deficientní myš jako model aterosklerózy .....	20
2.6 MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1).....	22
2.7 Statiny v léčbě hypercholesterolemie .....	23
2.7.1 Mechanismus účinku.....	24
2.7.2 Pleiotropní účinky statinů .....	24
2.7.3 Atorvastatin .....	26
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>28</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>29</b>
4.1 Zvířata a předepsaná dieta.....	29
4.2 Biochemická analýza.....	30
4.2 ELISA analýza .....	30
4.3 Histologické barvení olejovou červení .....	30
4.3 Imunohistochemie .....	31
4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí .....	33
4.5 Statistická analýza .....	34
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>35</b>
5.1 Biochemická analýza.....	35
5.1 ELISA analýza .....	38
5.2 Histologické barvení olejovou červení .....	39
5.3 Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu .....	40
5.4 Stereologická analýza histologického barvení olejovou červení a imunohistochemického barvení VCAM-1 .....	41
<b>6. DISKUSE</b> .....	<b>43</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>46</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>47</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

apoE	apolipoprotein E
CD 105	protein endoglin
CRP	C – reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
DM II	diabetes mellitus 2. typu
EDGF	endothelium derived growth factor, růstový faktor produkovaný endotelem
EGF	epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
eNOS	endoteliální NO syntéza
HDL	high density lipoprotein, lipoproteiny o vysoké hustotě
HMG-CoA	hydroxyl-methyl-glutaryl koenzym A
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molekule, adhezní molekula
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-8	interleukin 8
LDL	low density lipoprotein, lipoproteiny o nízké hustotě
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor, růstový hormon pro makrofágy
MDGF	monocyte-derived growth factor, růstový faktor monocytů
NO	oxid dusnatý
OCT	tissue freezing medium (zmrazovací směs)
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr; pH 7,4)
PDGF	platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGI <sub>2</sub>	prostacyklin I <sub>2</sub>
TAG	triacylglyceroly
TGF β	transforming growth factor, transformující růstový faktor
TNF α	tumor necrosis factor
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule, adhezní molekula
VLDL	very low density lipoprotein, lipoproteiny o velmi nízké hustotě

# 1. ÚVOD

Ateroskleróza je onemocnění tepen („kornatění“), při němž se v jejich stěnách ukládají tukové látky ve formě tzv. ateromu a druhotně vápník. Tepna je takto poškozována, ztrácí pružnost a dochází k jejímu postupnému zužování až uzávěru s následnou ischemií příslušné části organismu. Nejnápadnější jsou tyto změny na věnčitých tepnách srdce (ischemická choroba srdeční), tepnách dolních končetin (ischemická choroba dolních končetin) a mozkových tepnách. Mimoto mohou být postiženy i další orgány.

Ateroskleróza se u nás podílí na víc jak polovině úmrtí. Je nejčastější příčinou infarktu myokardu a cévních mozkových příhod. Léčba již vyvinutých změn na tepnách je velice obtížná a odstraňuje jen nejdůležitější důsledky, proto je nutné tomuto onemocnění předcházet.

K rizikovým faktorům vzniku aterosklerózy patří především vysoká hladina krevních tuků (zejména cholesterolu), jež souvisí mimo jiné se způsobem výživy a životním stylem, dále hypertenze, kouření, obezita, diabetes mellitus, hyperhomocysteinémie, stres, nedostatek pohybu. S prevencí aterosklerózy by se mělo započít již v dětství (1).

Prevence aterosklerotického procesu v různých fázích jeho rozvoje je základní prevencí důsledků částečné nebo úplné obturace tepen, tedy různých forem ischemické choroby srdeční, ischemické choroby dolních končetin a mozkových cévních příhod (2).

Tato rigorózní práce se zaměřila na studium vlivu atorvastatinu na vybrané parametry lipidů a zánětu u geneticky modifikovaného kmene myší, který by mohl být potenciálně použitý jako standardní zvířecí model pro studium efektů daných podáváním statinů.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 Funkce endotelu za fyziologických podmínek**

Endotel je největším orgánem v lidském těle, je tvořen jednou vrstvou specializovaných buněk, které mají řadu regulačních funkcí. Endotel reguluje cévní tonus a permeabilitu, ovlivňuje strukturu cévní stěny, udržuje rovnováhu koagulačních procesů a zajišťuje interakci s buňkami v krevním oběhu (3).

Endotel udržuje *cévní tonus* produkcí látek s vazodilatačními a vazokonstrikčními vlastnostmi. Hlavním vazodilatačním působkem je oxid dusnatý (EDRF/NO), dalšími vazodilatačními faktory jsou např. prostacyklin (PGI<sub>2</sub>) a bradykinin. Nejsilnějším vazokonstrikčním faktorem je endotelin-1, dalšími důležitými látkami jsou angiotensin II, acetylcholin nebo tromboxan A<sub>2</sub>. Poškození funkce endotelu se projevuje sníženou tvorbou oxidu dusnatého, zvýšenou produkcí vazokonstrikčních faktorů a narušením vazorelaxačních schopností endotelu.

Endotel ovlivňuje *strukturu cévní stěny* produkcí látek s růst stimulujícími a růst inhibujícími účinky. Zvýšené mechanické napětí cévní stěny vede k produkci růstových faktorů jako např. PDGF (růstový faktor tvořený destičkami) a IGF-1 (inzulinu podobný růstový faktor). Také endotelin-1 a angiotensin II mají mitogenní účinek na hladné svalové buňky a endotel. Mezi látky inhibující proliferaci buněk cévní stěny patří EDRF/NO, prostacyklin nebo TGF-β (4).

Intaktní endotel je dokonale nesmáčivým povrchem, který udržuje rovnováhu mezi faktory *regulujícími trombotické a fibrinolytické procesy*. EDRF/NO a prostacyklin brání adhezi a agregaci trombocytů. Antikoagulační aktivita spočívá ve vytváření bariéry mezi cirkulujícími koagulačními faktory a tkáňovým faktorem a v produkci antikoagulačně působícího heparin sulfátu a trombomodulinu (působícím prostřednictvím aktivace proteinu C) (5). V regulaci fibrinolýzy se endotel účastní tvorbou plazminogenového aktivátoru (tPA) a inhibitorů plazminogenových aktivátorů (PAI-1,2). Endotel produkuje také řadu koagulačních faktorů (faktory V, VII, tkáňový faktor, kininogen) a protrombogenní von Willebrandův faktor.

Endotel na svém povrchu exprimuje adhezivní molekuly, které zajišťují *interakci s buňkami v krevním oběhu*. Za fyziologických okolností je na povrchu endotelu jen malé množství adhezivních molekul. Při aktivaci endotelu je zvýšena exprese adhezivních molekul na povrchu endotelu a leukocytů (E-selektinu,

imunoglobulinových adhezivních molekul, integrinů), což usnadňuje adhezi a průnik leukocytů do cévní stěny (6).

Endotel vytváří selektivní bariéru bránící průniku škodlivých látek do cévní stěny. Za patologických situací, při poškození endotelu nebo jeho aktivaci zánětlivými působky či ischémií, se zvyšuje *propustnost endotelu* pro aterogenní lipidy a monocyty, dochází k jejich akumulaci subendoteliálně a k iniciaci pochodů vedoucích k ateroskleróze.

## **2.2 Buněčné adhezní molekuly**

Adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Nepůsobí pouze pasivně, ale účastní se také přenosu signálů mezi buňkami a podílejí se tak na interakci buněk s okolním prostředím. Účastní se řízení řady fyziologických dějů (embryogeneze, buněčný růst a diferenciace, hojení ran, obnova tkání), ale uplatňují se též při patologických procesech (podíl na interakcích mezi složkami imunitního systému) (7). Podle strukturních vlastností je můžeme rozdělit na čtyři základní skupiny: selektiny, integriny, imunoglobulinová skupina a kadheriny.

### **2.2.1 Selektiny**

Selektiny představují skupinu tří adhezivních molekul, konkrétně E-, L- a P-selektinu. Jsou to proteiny, které obsahují na svém N-konci pektinovou nebo lecitinovou doménu, která se účastní interakce s příslušnými ligandy (nejčastěji sacharidovými) a určuje specifitu vazby. Dále obsahují EGF (epidermal growth factor) podobnou doménu, CRP domény, transmembránový úsek a cytoplazmatický C-konec (8).

E-selektin je exprimován endotelem a zprostředkovává adhezi leukocytů na cévní endotel. Stimulem k jeho expresi je aktivace endotelu zánětlivými faktory, např. TNF  $\alpha$  a interleukinem-1.

L-selektin se nachází na leukocytech (B, T lymfocyty, neutrofilů, eosinofilů) a také na nezralých erythrocytech. Jeho význam spočívá v zajištění vazby leukocytů na endotel v místě zánětu, ale je zde přítomen konstitučně, to znamená, že k jeho expresi není nutná aktivace (9).

P-selektin má největší molekulu ze skupiny selektinů. Nachází se v alfa granulích destiček a Weibel-Paladeho těliscích endoteliálních buněk. Zprostředkovává interakce mezi krevními buňkami, leukocyty a endotelem. P-selektin je zodpovědný za adhezi leukocytů a krevních destiček na endotel. Účastní se první fáze interakce lymfocytů s endotelem, kdy dochází k tzv. kutálení neboli rollingu. Je exprimován po aktivaci způsobené vyplavením zánětlivých mediátorů – histaminu a trombinu, kdy dochází k degranulaci destiček a Weibel-Paladeho tělísek (10).

Exprese P- a E-selektinu je zvýšená v aterosklerotických plátech. Navíc bylo zjištěno, že P-selektin je společně s VCAM-1 exprimován endotelem ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů v intimě cév. Lze tedy říci, že E- a zejména P-selektin jsou markery časně aktivace endotelu a podílejí se na iniciační akumulaci makrofágů a T lymfocytů v intimě cév (11).

## 2.2.2 Integriny

Integriny jsou transmembránové glykoproteiny exprimované na všech tkáních v organismu. Jde o heterodimery se dvěma nekovalentně asociovanými podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ . Obsahují N-konec, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Na buňkách se vyskytují konstitučně, ale ve dvou konformačních stavech, které se liší afinitou ke svým ligandům. V klidu jsou v nízkoafinní konformaci, po aktivaci různými stimuly (např. dvojmocnými kationty  $Mg^{2+}$  či  $Mn^{2+}$ ) přecházejí do vysokoafinního stavu, který umožňuje vznik pevné vazby.

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou významné tři skupiny integrinů –  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\beta_3$ . Do skupiny  $\beta_1$  patří integriny exprimované monocyty, T lymfocyty a trombocyty a vážou složky mezibuněčné hmoty, jako je kolagen a adhezní molekuly exprimované na endotelu.  $\beta_2$  jsou leukocytární integriny, které se účastní interakce mezi leukocyty a endotelem. Poslední skupinu tvoří  $\beta_3$  integriny, které se účastní interakcí trombocytů se složkami mezibuněčné hmoty a hrají tak zásadní roli při zachycování destiček v místě vaskulárního poškození. K nejznámějším zástupcům této skupiny patří integrin IIb/IIIa exprimovaný na destičkách (12).

Z výše uvedených faktů vyplývá, že integriny jsou zásadní pro vytvoření pevné a stabilní vazby leukocytů k endotelu v místě zánětlivé reakce.



### 2.2.3 Imunoglobuliny

Ig skupina adhezních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50 % všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců. Patří sem celá řada molekul, např. antigenně specifické receptory T a B lymfocytů. Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci VCAM-1, ICAM-1 a PECAM-1 (13).

#### VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) a ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1)

Z hlediska struktury jsou obě adhezní molekuly transmembránové glykoproteiny obsahující N-konec, sérii Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Obě adhezní molekuly jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami. Studie na zvířecích modelech prokázaly, že VCAM-1 je endoteliálními buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů a to v oblastech, které jsou predispoziční ke vzniku lézí. Lokalizace těchto míst bývá ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především shear stresem. Naproti tomu exprese ICAM-1 je pozorována i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí (14).

Exprese těchto adhezních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy, např. hypercholesterolémií, oxidovanými LDL, diabetem, kouřením, hyperhomocysteinémií či hemodynamickým stresem.

#### PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule)

Jedná se o glykoprotein, který má šest extracelulárních Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec (15).

PECAM-1 je exprimovaný hlavně na endoteliálních buňkách v místě intercelulárních spojů, na trombocytech a většině leukocytů. Hraje důležitou roli ve vaskulogenezi, angiogenezi a významně se podílí na transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostor.

#### 2.2.4 Kadheriny

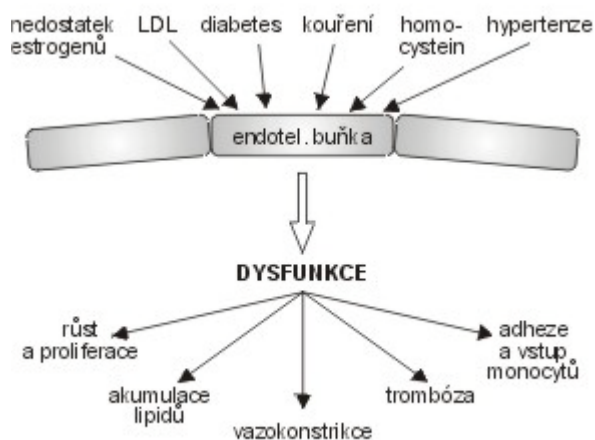
Jedná se o transmembránové glykoproteiny, které zodpovídají za hemofilní mezibuněčnou adhezi. Tato adheze je závislá na přítomnosti extracelulárního vápníku. Jsou to hlavní strukturální glykoproteiny, které tvoří adherentní mezibuněčné spoje, zvané zonula adhaerens (9).

Kadheriny se podílejí na diferenciaci, proliferaci a migraci buněk při dějích jako jsou angiogeneze, vaskulogeneze nebo reparace poškozené tkáně. Tyto funkce kadherinů jsou zprostředkovány jednak jejich adhezními vlastnostmi a jednak schopností podílet se na přenosu signálů mezi buňkami.

Dnes je popsáno velké množství kadherinů, ve vztahu k ateroskleróze mají největší význam epiteliální (E)-kadherin a vaskulární – endoteliální (VE)-kadherin. Exprese E-kadherinu byla zjištěna v aterosklerotických lézích u buněk, jež se transformovaly na pěnové buňky. Zdá se, že by se E-kadherin mohl podílet na agregaci těchto pěnových buněk a podílet se tak i na formování lipidového jádra. (16). VE-kadherin je exprimován cévním endotelem téměř u všech typů cév. Je hlavní adhezní molekulou adherentních spojů mezi endoteliálními buňkami. Řada studií prokázala, že dezintegrace či porušená funkce VE-kadherinu má za následek zvýšení endoteliální permeability a tím přispívá ke vzniku endoteliální dysfunkce (17).

## 2.3 Endoteliální dysfunkce

**Obrázek 1** Schématické znázornění endoteliální dysfunkce



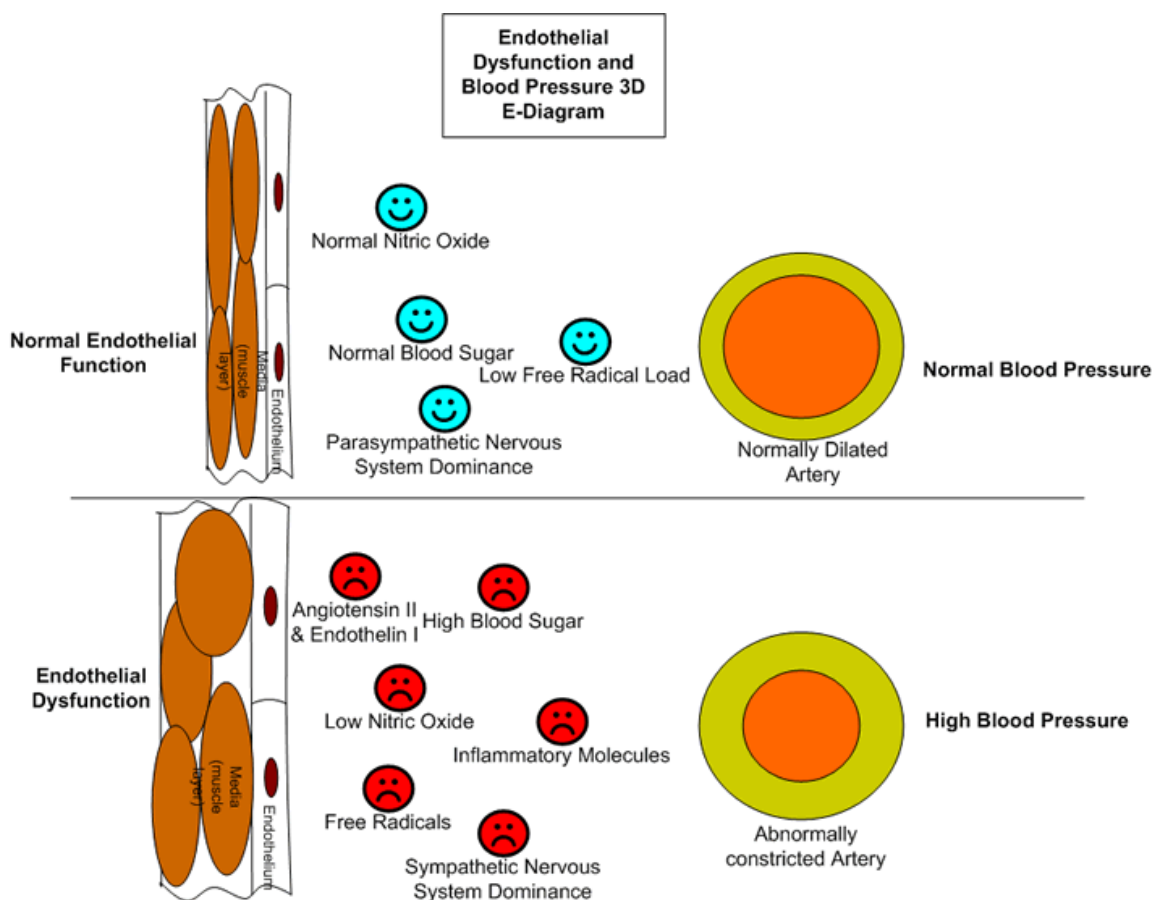
Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními a hemokoagulačními mechanismy (18). Endoteliální dysfunkce hraje důležitou roli v patogenezi cévní aterosklerózy, arteriální hypertenze, diabetu nebo srdečního selhání. Zlepšení poškozené funkce endotelu úpravou životosprávy a vhodnou léčbou může zabránit vzniku a progresi aterosklerózy a jejích komplikací.

Endotel neustále odpovídá na řadu lokálních a systémových podnětů. Aktivace endotelu těmito podněty vede k různým typům odpovědi – ke změně permeability, vazospastickým reakcím, porušení hemostatických mechanismů, uvolnění růstových faktorů. Aktivace endotelu může být na rozdíl od endoteliální dysfunkce přechodnou krátkodobou epizodou, která provází např. virovou infekci, nebo krátkodobou expozici aktivačním faktorům.

Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, kouření, hyperhomocysteinémie nebo nedostatek estrogenů svým chronickým působením poškozují endoteliální funkce vedou ke vzniku *endoteliální dysfunkce*. Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi faktory vazorelaxačními a vazokonstrikčními, prokoagulačními a antikoagulačními, růst stimulačními a růst inhibujícími. Výsledkem je proaterogenní účinek s převahou vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů (19).

V současné době je známo, že velká většina kardiovaskulárních onemocnění je spojena s poruchou funkce endotelu. Endoteliální dysfunkce se účastní v patofyziologii aterosklerózy, hypertenze, diabetu, ICHS, srdečního selhání, cévních mozkových příhod, při Raynaudově syndromu nebo plicní hypertenzi.

**Obrázek 2** Schématické znázornění endoteliální dysfunkce v závislosti na krevním tlaku a dalších vybraných parametrech (hladina krevního cukru, hladina NO, hladina volných radikálů)



## 2.4 Ateroskleróza

Ateroskleróza je pomalu postupující onemocnění tepen, při němž je ztlustěna intima fibrózními uloženinami, které postupně zužují lumen a současně jsou místem vzniku krvácení a tvorby trombů. Etiopatogeneze aterosklerózy je multifaktoriální proces. Vzniká jako specifická reakce na nesespecifické poškození cévní stěny. Neznáme sice jednoznačnou příčinu jejího vzniku, známe ale řadu faktorů, které se na jejím vzniku podílejí a nazýváme je rizikovými faktory (20).

### **2.4.1 Rizikové faktory**

Kardiovaskulární onemocnění jsou příčinou více než poloviny všech úmrtí v západních průmyslových státech. Jedním z nejdůležitějších úspěchů lékařství bylo odhalení rizikových faktorů, které můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné řadíme hyperlipidemii, hypertenzi, kouření, diabetes mellitus a hyperhomocysteinémii, mezi neovlivnitelné potom vyšší věk, mužské pohlaví a genetickou zátěž.

#### Kouření

Kouření zvyšuje riziko úmrtí následkem koronární aterosklerózy na 1,4 až 2,4 násobek, u silných kuřáků dokonce na 3,5 násobek. Příčiny jsou zejména stimulace sympatiku nikotinem, vytěsnění kyslíku z hemoglobinu oxidem uhelnatým, zvětšená přilnavost trombocytů a zvýšená propustnost endotelu způsobená látkami obsaženými v kouři (21).

#### Hyperlipidémie

Nejzávažnější je zvýšená hladina plazmatické koncentrace LDL cholesterolu, která výrazně urychluje vznik aterosklerózy. Snížení jeho koncentrace o 1 % vede k poklesu rizika koronárních příhod asi o 2 %. Není zatím jasné, jaké jsou optimální koncentrace LDL cholesterolu v krvi. Současná doporučená koncentrace < 3,0 mmol/l se vztahuje k primární i sekundární prevenci ICHS (22).

Naopak zvýšená koncentrace HDL cholesterolu eliminuje riziko zvýšeného LDL cholesterolu. Zvýšení HDL cholesterolu o 1 % snižuje riziko koronárních příhod o 2 – 3 %. Žádoucí koncentrace HDL cholesterolu je > 1,0 mmol/l. Zvýšení HDL cholesterolu nad 1,6 mmol/l je tzv. negativním rizikovým faktorem, eliminuje vliv jiného rizikového faktoru.

Zvýšená koncentrace triglyceridů je samostatným nezávislým rizikovým faktorem ICHS u žen i u mužů, vyšší riziko přináší ženám. Doporučená koncentrace triglyceridů je < 2,0 mmol/l (23).

#### Diabetes mellitus

Působí rozvoj aterosklerózy hlavně narušením metabolismu lipidů. Nejvhodnějším léčebným postupem je dosažení co nejfyziologičtějších hodnot glykémie u pacientů (24).

### Genetická predispozice a pohlaví

Genetická predispozice ovlivňuje hlavně rizikové faktory jako je hypertenze, diabetes mellitus či trombogenní faktory. Mezi nejvíce rizikové genetické predispozice patří familiární hypercholesterolemie (zvýšená hladina VLDL a LDL cholesterolu). U mužů přicházejí aterosklerotické změny o 10 let dříve než u žen. Ženské pohlavní hormony působí protektivně, po snížení jejich hladiny v menopauze dochází ke zrychlení rozvoje aterosklerózy (25).

### Tělesná inaktivita a věk

Pravidelný tělesný pohyb je nedílnou součástí prevence aterosklerózy. Výskyt aterosklerózy narůstá se zvyšujícím se věkem. Za rizikové skupiny z hlediska kardiovaskulárních onemocnění je považován věk nad 45 let u mužů a nad 55 let u žen (20).

### Nevhodná strava a obezita

Nevhodná je především energeticky nadbytečná strava s přemírou tuků, zvláště nasycených, cholesterolu a cukrů. Naproti tomu protektivně působí strava obsahující vyšší podíl nenasycených tuků (rybí olej) a zeleniny (26).

### Alkohol

Negativně působí pravidelný příjem vyšších dávek alkoholu. Malé dávky naopak působí protektivně (zvláště pokud současně obsahují vyšší koncentraci flavonoidů, jako je tomu u červeného vína) (26).

### Železo

Zvýšené zásoby železa, vyjádřené jako plazmatická koncentrace feritinu, jsou rizikovým faktorem aterosklerózy. Předpokládá se jeho peroxidační působení na LDL cholesterol.

### Zvýšená koncentrace plazmatického histaminu

Je prokázáno, že výrazně zvýšená koncentrace histaminu (zvyšuje se např. při deficitu vitamínu C a vlivem stresu) poškozuje funkci arteriálního endotelu.

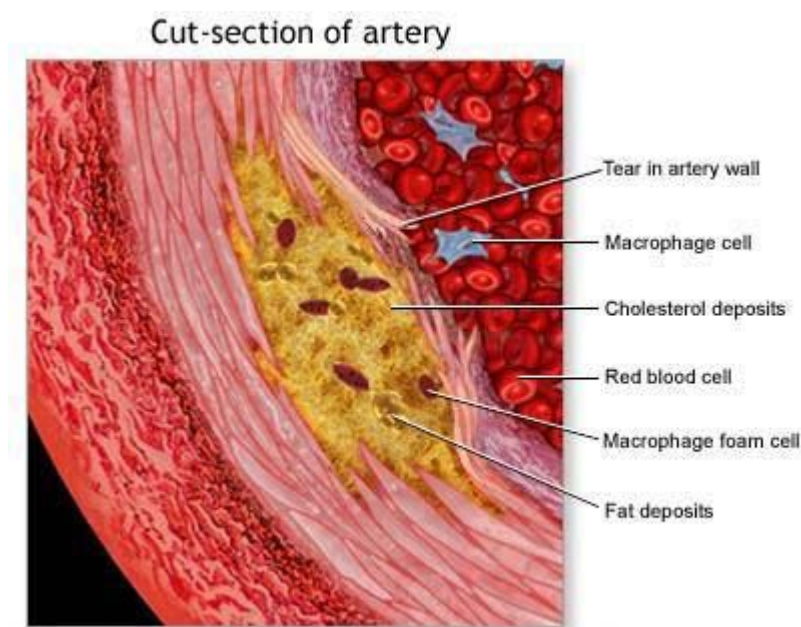
### Infekční agens

Uvažuje se o některých bakteriálních a virových patogenech (Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, Herpes simplex virus, Cytomegalovirus). Jedním z příčin je schopnost bakteriálních kmenů produkovat faktory shlukující trombocyty,

dále stimulovat produkci zánětlivých mediátorů, které se významně podílejí na rozvoji aterosklerózy (27).

V poslední době se objevila řada dat ukazujících na význam subklinické dysfunkce štítné žlázy. Subklinická hypotyreóza se manifestuje necharakteristickými příznaky – únavností, nevykonností, depresivním laděním, apod. Tento stav je spojen se zvýšenými hladinami sérového cholesterolu. Bylo prokázáno, že nemocní se subklinickou hypotyreózou mají prokazatelně rozsáhlejší aterosklerózu aorty a častější výskyt akutního infarktu myokardu (28).

**Obrázek 3** Řez artérií; patrná jsou zejména depozita cholesterolu, tuku a pěnových buněk, dále potom porušená bariéra arteriální stěny a shluky makrofágů



#### 2.4.2 Patofyziologie aterosklerózy

Proces vzniku aterosklerózy probíhá v několika charakteristických fázích, které v případě dlouhodobého trvání aterogenních faktorů vedou ke vzniku klinických komplikací, nejčastěji ischemii srdce, mozku a dolních končetin.

**Lipidní proužky** – lipidní proužky jsou shluky pěnových buněk. Tento typ lézí je první fází aterosklerózy a nachází již u dětí a mladých lidí (21).

Aterogenní proces se odvíjí od endoteliální dysfunkce, popsané výše. Spolupůsobením aterogenních faktorů dochází ke zvýšené kumulaci LDL v intimě cév. Zde se oxidačními procesy mění a vážou se na subendoteliální proteoglykany a kolagen (29). 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 prostup do intimy cév (30).

První fáze prostupu 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 adhezivními molekulami VCAM-1, 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 (31).

V této fázi dominují v intimě monocyty. Jsou pod vlivem působení růstových faktorů jako EDGF (endothelium-derived growth factor) nebo faktorů stimulujících tvorbu kolonií jako např. M-CSF, díky kterým dochází k transformaci monocytů na makrofágy. Makrofágy vycytávají prostřednictvím svých receptorů oxidované lipoproteiny, které nemohou být katabolizovány cestou LDL receptorů. Estery cholesterolu se tedy kumulují intracelulárně. Vznikají tzv. pěnové buňky a jejich nahromaděním lipidní proužky (32).

**Fibromuskulární plát** – pro jeho vytvoření je charakteristická zejména 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 $\beta$  a IL-8, které přispívají ke změně kontraktilního fenotypu hladkosvalových buněk na fenotyp syntetický a také podporují proliferaci a migraci hladkosvalových elementů. TNF- $\alpha$  produkovaný aktivovanými makrofágy společně s IL-1 $\beta$  zvyšuje expresi adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 (33).

V této fázi vstupují do procesu aterogeneze hladkosvalové buňky. Normálně se nacházejí v kontraktilním stavu, podílejí na udržení cévního tonu, na syntéze extracelulární matrix v medii a na reparaci cévní stěny při různých poraněních (34). 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 (16).



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- $\beta$ , PDGF, angiotensin II, IL-1, homocystein a mechanické napětí stimulují tvorbu kolagenu).

Za předpokladu, že aterogenní faktor přestane v tomto stádiu 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 (29).

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, však nezávisí na stupni cévní obstrukce, ale vznikají především jako následek trombózy (35).

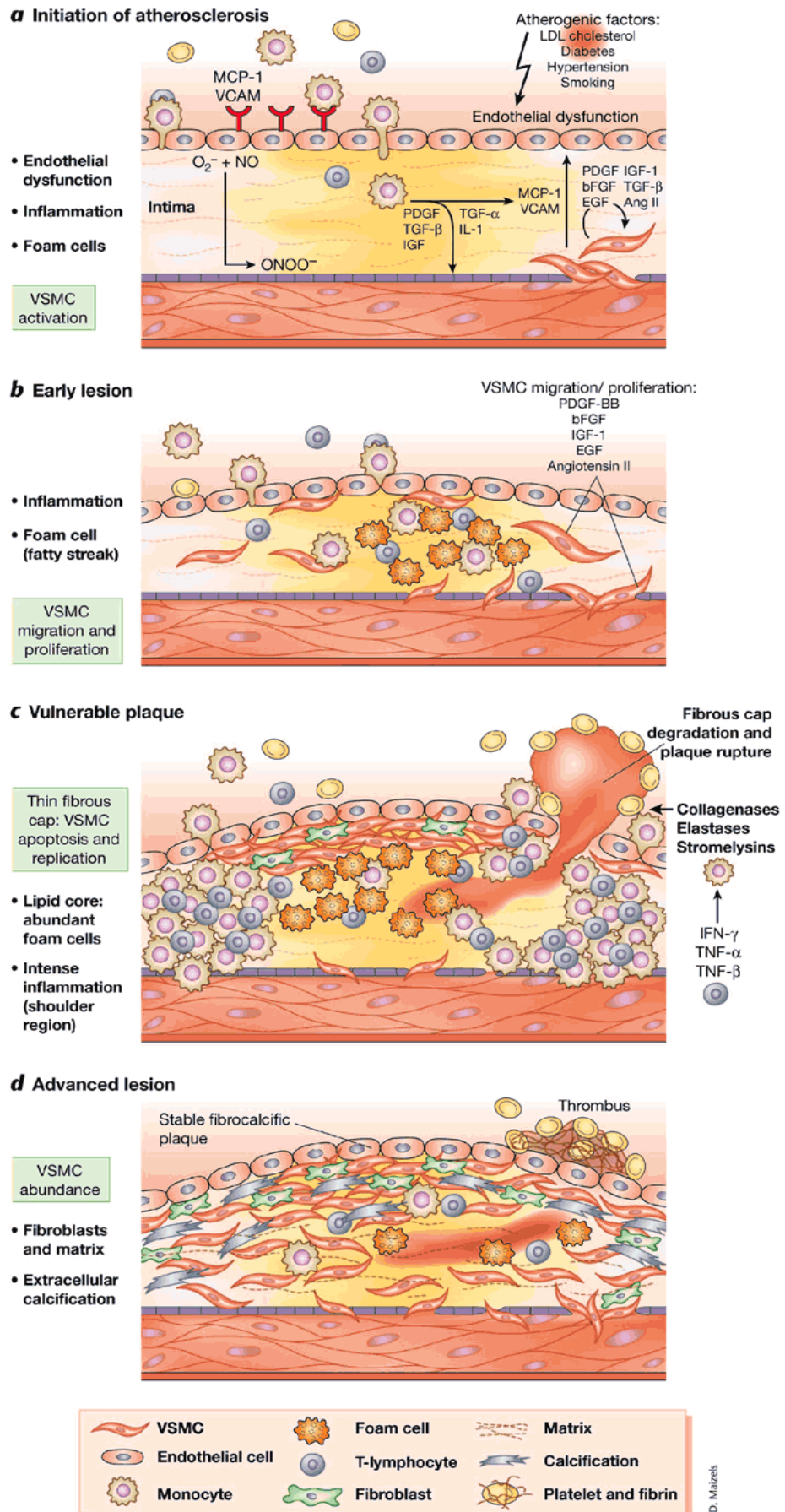
**Vznik trombu** – Toto stádium je vlastně již klinickou komplikací aterosklerózy. Ke vzniku trombu může dojít buď při erozi endotelu, nebo při ruptuře plátu. Na vzniku trombózy se podílí celá řada faktorů, které často patří mezi obecné rizikové faktory aterosklerózy. Jsou to hyperlipidémie, hyperhomocysteinémie, diabetes, zvýšená koagulační aktivita, snížená fibrinolytická aktivita, atd. (32).

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 (36).

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 hluboká, průtok krve pomalý, nízká fibrinolytická aktivita a velká aktivita tkáňového faktoru, dochází k postupné expanzi trombu a může dojít až k úplné okluzi cévního lumen. 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 (23).

**Obrázek 4** Znáznornění jednotlivých fází aterosklerózy



## **2.5 ApoE/LDLR deficientní myš jako model aterosklerózy**

### ApoE deficientní myší model

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (37).

Ačkoli se tento model zprvu vyvíjel slibně, měl dva zásadní problémy. Oproti lidským aterosklerotickým lézím, které se vyskytují ve větvích hlavních cév, kde pláty progredují, myší léze jsou malé, vyskytují se pouze v oblastech aortálního oblouku a nedochází k jejich progresi. Strava, kterou jsou myši krmeny, je nefyziologická, obsahuje 10 – 20x více cholesterolu a žlučových kyselin. Tato strava vyvolá chronický zánět pouze u citlivých kmenů myši, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohadu, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myši jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE) (38). ApoE jsou tvořeny primárně v játrech, mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myši se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených

elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneuryzmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly (39).

Jeden ze spouštěcích mechanismů aterosklerózy je její exacerbace stravou bohatou na cholesterol a tuky. ApoE deficientní myši tento mechanismus napodobují. Pokud jsou tyto myši krmeny stravou obsahující 0,15 % cholesterolu a 21 % tuků, vzroste hladina jejich cholesterolu 3 – 4x a jejich aterosklerotické léze progredují.

#### LDL receptor deficientní myší model

Před nedávnem bylo použito genové modifikace v embryonálních kmenových buňkách, která dala vzniknout LDL receptor deficientním myším jako modelu familiární hypercholesterolemie (40). Tyto myši vykazují menší lipoproteinové abnormality než apoE deficientní myši; vzestup LDL a VLDL cholesterolu vede ke zvýšení celkového plazmatického cholesterolu o 250 mg/dl při normální stravě. Při tomto typu stravy a těchto plazmatických koncentracích cholesterolu nejsou LDL receptor deficientní myši postiženy aterosklerózou. Nicméně se jedná o model velice citlivý na podávanou dietu. Pokud jsou tyto myši krmeny např. Paigenovou dietou, jejich plazmatické koncentrace celkového cholesterolu příkře stoupnou až na 1500 mg/dl a formují se rozsáhlé aterosklerotické léze (41). Bylo však prokázáno, že také při podávání méně toxického (tzv. západního) typu diety dochází k rozvoji rozsáhlých plátů a to při plazmatické koncentraci celkového cholesterolu 400 mg/dl. Patofyziologie vzniku lézí není u tohoto modelu tak dobře charakterizována jako v případě apoE deficientního modelu, ale objevují se podobná stádia progresu lézí: pěnové buňky, lipidní proužky, stádium fibromuskulární proliferace.

#### ApoE/LDL receptor deficientní myší model

Posléze byl vytvořen další myší model – tentokrát se jednalo o kmeny myší deficientní v apoE i v LDL receptoru (37). U tohoto modelu se vyvíjí výrazná hyperlipidémie i ateroskleróza. Dokonce i při podávání běžné stravy je obvykle progresu aterosklerózy markantnější u těchto double deficientních myší než u jedinců deficientních pouze v apoE (42). Model double deficientních myší je tedy vhodný pro studium antiaterosklerotického efektu sloučenin bez nutnosti použití aterogenní diety.

## **2.6 MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1)**

Chemoatrakční protein pro monocyty (MCP-1) je člen rodiny proinflamatorních cytokinů, tzv. chemokinů (43). Chemokiny poutají pozornost díky své schopnosti přitahovat a aktivovat specifické podskupiny leukocytů na úkor ostatních na rozdíl od fragmentů komplementu či formylovaných peptidů. Komplement a formylované peptidy totiž poutají neutrofilly i monocyty, zatímco MCP-1 přitahuje pouze monocyty a interleukin 8 zase pouze neutrofilly. Prostřednictvím chemokinů lze tedy vysvětlit mechanismus výskytu specifických podskupin leukocytů v zánětlivých ohniscích. Patologická nadprodukce MCP-1 je charakterizována infiltráty bohatými na monocyty, které se vyskytují u tuberkulózy a aterosklerózy. Proto se můžeme setkat s často používaným, avšak ne zcela prokázaným, tvrzením, že je MCP-1 odpovědný za zánětlivé procesy probíhající u těchto onemocnění (44).

### Aktivita MCP-1 *in vivo*

#### A) ZA FYZIOLOGICKÉHO STAVU

MCP-1 je *in vitro* silný chemoatraktant specifický pro monocyty a T-buňky, což vyvolává dojem, že je to jeho hlavní funkce také *in vivo*. Původní zprávy, že lidský MCP-1 poutá monocyty, je-li injikován do myši kůže, nebyly dosud potvrzeny. Neuspokojivé výsledky mohou být zapříčiněny druhovou specifitou. Lidský MCP-1 může slabě působit na hlodavčí monocyty, ale v některých případech může být dokonce složité *in vivo* prokázat odezvu myších monocytů na myší MCP-1.

Znamená to tedy, že je chemotaxe leukocytů zprostředkovaná chemokiny pouhý *in vitro* artefakt a chemokiny nehrají stejnou úlohu *in vivo*? Nebo je prostě příliš složité dodat takové množství chemokinů *in vivo*, abychom vyvolali příslušnou odpověď? Jedno z řešení této otázky spočívá ve vytvoření transgenních myší, které produkují MCP-1 výhradně ve specifických orgánech. Nyní existují tři transgenní myší modely, které vykazují „spontánní“ infiltraci monocytů do thymu, mozku a ostrůvků pankreatu v závislosti na transgenní expresi MCP-1 (32). Pro zajímavost: ve všech třech případech nebyly monocyty aktivovány a nedošlo k poškození tkání. Z toho vyplývá, že MCP-1 hraje velmi důležitou úlohu v chemoatrakci bez předchozí aktivace. Tato pozorování se shodují s předběžnými výsledky získanými u MCP-1<sup>-/-</sup> deficientních myší, které vykazují vážně zhoršenou infiltraci monocytů v závislosti na různých inflamatorních stimulech (45).

Čtvrtý transgenní myší model vnáší světlo do dalších funkcí MCP-1 *in vivo*. V tomto modelu exprimují myši základní hladinu MCP-1 několikanásobně vyšší než

myši náležející do jiných modelů a jejich sérové hladiny MCP-1 jsou vyšší než  $EC_{50}$  ve srovnání s chemotaxí monocytů *in vitro*. Tyto myši však překvapivě nevykazují infiltraci monocytů do orgánů produkujících MCP-1. Jsou spíše vnímavější k letálním infekcím intracelulárními patogeny jako *Listeria monocytogenes* či *Mycobacterium tuberculosis*. Jeden z možných výkladů zní, že MCP-1 je zapojený do procesů důležitých pro eliminaci těchto agens z těla hostitele. Vyšší hladiny cirkulujícího MCP-1 u těchto myší tedy mohou desenzitizovat krevní monocyty, které se tak stávají neschopnými odpovědi na akutní fyziologické zvýšení produkce MCP-1.

## B) MCP-1 A JEHO ROLE V NĚKTERÝCH ONEMOCNĚNÍCH

Za předpokladu, že je MCP-1 schopen *in vivo* přitahovat monocyty, lze vyslovit hypotézu, že je zodpovědný za infiltraci monocytů při onemocněních jako např. ateroskleróza, revmatoidní artritida nebo roztroušená skleróza. Ve skutečnosti se zvýšená produkce MCP-1 při těchto onemocněních objevuje, avšak nemáme přímý důkaz, že je MCP-1 patogeneticky zodpovědný za tuto infiltraci.

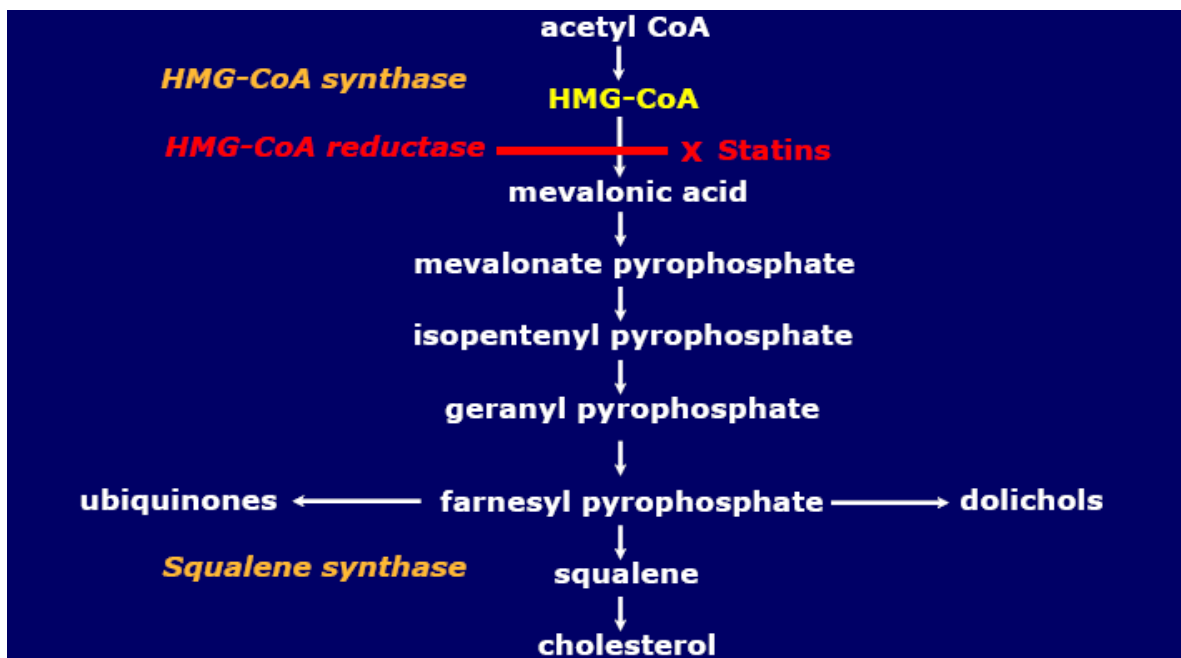
Například imunohistochemická analýza lidské aterosklerózy dokazuje, že je MCP-1 primárně syntetizován endoteliálními buňkami, subendoteliálními makrofágy a pěnovými buňkami v časných lézích. Naproti tomu ve zralých aterosklerotických plátech se zdají být převládajícím zdrojem MCP-1 subendoteliální makrofágy a příležitostně hladkosvalové buňky, zatímco endoteliální buňky přispívají mnohem méně (46). Tento důkaz poskytuje velice zajímavý model aterogeneze, v němž MCP-1 přitahuje monocyty do subendotelu, protože jeho syntéza může být *in vivo* indukována minimálně pozměněným LDL lipoproteinem (44).

## **2.7 Statiny v léčbě hypercholesterolémie**

Statiny (někde uváděny též pod názvem vastatiny) jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktázy). Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením, tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizací ateromatózních plátů, aj. (47). Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

### 2.7.1 Mechanismus účinku

Obrázek 5 Mechanismus účinku statinů



Statiny blokují jeden z časných kroků endogenní biosyntézy cholesterolu, přeměnu HMG-CoA na mevalonát inhibicí HMG-CoA reduktázy. Výsledkem inhibice syntézy cholesterolu je snížená buněčná koncentrace cholesterolu zejména v hepatocytu, která vede ke zvýšené syntéze jaterních LDL receptorů, čímž dochází k rychlejšímu odstraňování LDL cholesterolu z oběhu. Hladiny triglyceridů a VLDL cholesterolu jsou rovněž snižovány, HDL cholesterol se mírně zvyšuje nebo zůstává nezměněn (48).

### 2.7.2 Pleiotropní účinky statinů

Několik velkých randomizovaných studií prokázalo, že pacienti léčení statiny měli významně nižší riziko koronárních příhod než pacienti léčení jinými hypolipidemiky i přes srovnatelný pokles sérové hladiny cholesterolu. Ke klinickému prospěchu z léčby statiny tedy zřejmě přispívají jejich extralipidové účinky, které nejsou závislé na snížení koncentrace LDL cholesterolu (49). Významné antiaterogenní účinky statinů spočívají v příznivém ovlivnění funkce endotelu, zánětlivých parametrů, formaci trombů, stability plátů, inzulínové rezistence a kostní formace, což jsou mechanismy a procesy uplatňující se v patofyziologii aterosklerózy,



ishemické cévní mozkové příhody, demence, osteoporózy nebo diabetes mellitus. Tyto vlastnosti statinů by mohly rozšířit spektrum jejich doposud známých farmakodynamických účinků a umožnit tak jejich využití v jiných než kardiovaskulárních indikacích (50).

Protizánětlivé účinky statinů se projevují především snížením hladin C-reaktivního proteinu, inhibicí interakce mezi endotelovými buňkami a leukocyty a snížením počtu zánětlivých buněk v aterosklerotickém plátu.

Příznivé ovlivnění stavu endoteliální dysfunkce spočívá pravděpodobně v jejich schopnosti zvyšovat expresi a aktivitu endoteliální NO syntázy (dochází zde k ovlivnění posttranskripčních a posttranslačních dějů, ne však ke zvýšené genové transkripci eNOS). Zvýšení syntézy NO indukované statiny může kompenzovat nedostatečnou tvorbu NO v aterosklerotických lézích a působit tak proti progresi aterosklerózy.

Některé (především lipofilnější statiny) snižují migraci a proliferaci hladkosvalových buněk a to nezávisle na svých hypocholesterolemických vlastnostech, čímž zpomalují vznik aterosklerotické léze. Statiny též inhibují expresi tkáňového faktoru u lidských makrofágů, což může vést ke snížení intenzity trombózy doprovázející rupturu plátu; dále snižují syntézu metaloproteináz (proteolytických enzymů produkovaných aktivovanými makrofágy), které způsobují oslabení fibrózního krytu plátu. Snížení syntézy metaloproteináz znamená také snížení rizika ruptury plátu (51).

Snížení hladin triglyceridů statiny může být zodpovědné za snížení inzulínové rezistence u nemocných s DM II posunem od volných mastných kyselin zpět ke glukóze jako hlavnímu intracelulárnímu zdroji energie periferních tkání. Protizánětlivé vlastnosti statinů mohou zase zpomalit vývoj inzulínové rezistence zprostředkovaný některými cytokiny z tukové tkáně obézních pacientů.

Experimentální podávání statinů bylo spojeno se snížením intracelulárních a extracelulárních hladin amyloidu. Omezení tvorby  $\beta$ -amyloidních plaků je zapříčiněno snížením množství membránového cholesterolu v membránách mozkových buněk, čímž se zpomaluje progresse Alzheimerovy choroby. Statiny mohou působit na rozvoj demence ještě dalším mechanismem nezávislým na metabolismu cholesterolu. Autoři nedávno publikované studie zjistili vztah mezi podáváním statinů a jejich schopností inhibovat lidské cholinesterázy, zejména butyrylcholinesterázu, která bývá u pacientů s Alzheimerovou chorobou patologicky zvýšená (52).

Statiny by mohly působit i při novotvorbě kostní hmoty zvýšením exprese genu pro kostní morfogenetický protein-2. Tento protein je růstový faktor, který umožňuje proliferaci a zrání osteoblastů a novotvorbu kostí. V několika observačních studiích bylo zjištěno přibližně 50% snížení rizika zlomenin u pacientů užívajících statiny ve srovnání s pacienty s nestatinovými hypolipidemiky nebo bez hypolipidemické léčby.

Výše popsané účinky, založené ve většině případů na modulaci biosyntézy mevalonátu, výrazně přispívají ke snížení rizika aterosklerotických komplikací a mohly by být v budoucnu využity i v dalších indikacích, jako je snížení rizika nového vývoje DM II, demence či osteoporózy. Použití statinů v jiných než hypolipidemických indikacích však zatím brání nedostatek randomizovaných klinických studií, takže obecně platí názor, že extralipidové účinky statinů efektivně doplňují jejich přímý účinek na hladinu lipidů (53).

### **2.7.3 Atorvastatin**

Atorvastatin je podáván ve formě aktivní látky. Po perorálním užití je rychle absorbován, většina dávky je vycytována z krve v játrech v průběhu jediného průchodu tímto orgánem. Tak se atorvastatin koncentruje v hlavním cílovém orgánu, tedy v játrech. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 1–2 hodinách. Váže se asi z 98 % na plazmatické proteiny. Je metabolizován cytochromem P450 3A4, z velké části na biologicky aktivní metabolity. Je vylučován žlučí po hepatální a extrahepatální metabolizaci. Asi 80 % podané dávky se objevuje ve stolici (54).

Atorvastatin se používá pro léčbu hypercholesterolemie způsobené zvýšením plazmatických koncentrací LDL cholesterolu – zvláště jsou vhodné pro familiární hypercholesterolemii typu IIa. Při samotné léčbě statiny se sníží koncentrace LDL cholesterolu přibližně o 40 %. Pokud se statiny kombinují s iontoměníči, lze dosáhnout snížení LDL až o 60 % při současném příznivém vlivu na průběh koronární aterosklerózy (47).

Atorvastatin je kontraindikován při jaterních onemocněních v aktivním stavu nebo s neobjasněným zvýšením sérových transamináz na více než trojnásobek normálních hodnot, při myopatii, u žen v reprodukčním věku bez spolehlivě zajištěné antikoncepce, u těhotných žen. Vzhledem k nedostatečným zkušenostem je léčba atorvastatinem u dětí vyhrazena pouze specialistům a pro děti s těžkou formou hypercholesterolemie. Incidence nežádoucích účinků při léčbě statiny je relativně nízká.

<b>Farmakokinetické vlastnosti atorvastatinu</b>	
<i>Absorpce</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ po orálním užití je rychle absorbován; maximální koncentrace dosaženo po 1 – 2 hodinách</li> <li>✓ míra absorpce vzrůstá proporcionálně s dávkou atorvastatinu</li> <li>✓ absolutní biologická dostupnost atorvastatinu je přibližně 12 %; systémově dosažitelná inhibiční aktivita HMG-CoA reductázy je asi 30 %</li> </ul>
<i>Distribuce</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ průměrný distribuční objem atorvastatinu je přibližně 381 l/kg</li> <li>✓ atorvastatin je zhruba z 98 % vázán na plazmatické proteiny</li> </ul>
<i>Metabolismus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ metabolizován cytochromem P450 3A4 na aktivní metabolity (orto- a parahydroxylové deriváty), jimž je připisováno 70 % inhibiční aktivity HMG-CoA reductázy</li> <li>✓ dále metabolizován cestou glukuronidace</li> </ul>
<i>Eliminace</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ vylučován žlučí po hepatální a extrahepatální metabolizaci</li> <li>✓ neprochází signifikantní enterohepatální recirkulací</li> <li>✓ střední eliminační poločas je cca 14 hodin</li> <li>✓ poločas inhibiční aktivity HMG-CoA reductázy je cca 20 – 30 hodin díky aktivním metabolitům</li> </ul>
<b>Speciální skupiny pacientů</b>	
<i>Geriatrickí pacienti</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ plazmatické koncentrace atorvastatinu včetně jeho aktivních metabolitů jsou vyšší než u mladých dospělých</li> <li>✓ hypolipidemické účinky u obou skupin srovnatelné</li> </ul>
<i>Děti</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ farmakokinetické údaje nejsou k dispozici</li> </ul>
<i>Pacienti s renální insuficiencí</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ onemocnění ledvin nemá vliv na plazmatickou hladinu atorvastatinu či jeho aktivních metabolitů ani na jeho účinnost</li> </ul>
<i>Pacienti s jaterní insuficiencí</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ plazmatické koncentrace atorvastatinu a jeho aktivních metabolitů je výrazně zvýšená (cca 16x vyšší C<sub>max</sub> a 11x vyšší AUC)</li> </ul>

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem této rigorózní práce bylo ověřit, zda atorvastatin vykazuje u apoE/LDL-receptor deficientních myší podobné účinky jako je tomu v humánní medicíně. K tomu byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi, hladiny zánětlivých markerů v krvi a dále exprese zánětlivých markerů v aterosklerotických plátech a velikost aterosklerotických lézí. K hodnocení morfologických nálezů byly použity stereologické metody.

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15-20 gramů, byly zakoupeny v Taconic Europe (Dánsko) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

### **4.1 Zvířata a předepsaná dieta**

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin, kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta, a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21 % tuku (11 % nasycených mastných kyselin) a 0,15 % cholesterolu.

Obě skupiny byly krmeny experimentálními dietami po dobu 8 týdnů. Každá z myší byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

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

## **4.2 Biochemická analýza**

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

## **4.2 ELISA analýza**

Analýza hladin MCP-1 a VCAM-1 v krevním séru byla provedena na Ústavu klinické imunologie a alergologie. Byla využita standardní sendvičová enzymatická technika za využití konvenčních kitů pro stanovení MCP-1 a VCAM-1 od firmy (R&D Systems, Inc., MN, USA).

## **4.3 Histologické barvení olejovou červení**

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

Postup barvení olejovou červení:

### **Barvení Oil Red O:**

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

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

### **4.3 Imunohistochemie**

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7  $\mu\text{m}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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 patnáctiminutovém usušení vložily na 10 minut do destilované vody, následně se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). V další fázi byly na sklíčka nepipetovány roztoky anti-avidinu a anti-biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do roztoku 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy inkubovaly se sekundárními protilátkami (30 minut) – goat anti-hamster IgG a goat anti-rat IgG (Vector Laboratories), které byly značeny biotinem a opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dále byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories). 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.

Byla použita následující primární protilátka:

monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) – zředění 1/100

Pracovní postup

nechat uschnout řezy	60 minut
fixace aceton (uschovaný v -20°C)	15 minut
usušit	15 minut
PBS	10 minut
10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	30 minut
Inkubace s avidinem D	15 minut
oplach v PBS	5 minut
Inkubace s biotinem	15 minut
PBS	oplach
primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
PBS 1	2x5 minut
10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	15 minut
sekundární protilátka (+ mouse sérum v PBS)	30 minut
PBS 3	5 minut
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 70 ml H <sub>2</sub> O)	15 minut
PBS 4	2x5 minut
ABC komplex elite	30 minut
PBS 5	5 minut
DAB (podle návodu)	nutno určit čas
destilovaná voda	oplach
aceton	oplach
aceton – xylen (10:1)	3 minuty
aceton – xylen (1:10)	3 minuty
3x xylen	2 minuty
Eukitt – montování krycího sklíčka	



#### **4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí**

Plocha velikosti barvení olejovou červení a endoteliální exprese VCAM-1 byla kvantifikována pomocí stereologických metod (10). Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 $\mu$ m (0,385 mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně, a pak se vybral každý pátý řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou olejové červeně, respektive VCAM-1 barvením v intimě cévy na jednu cévu (55). Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$\text{est}A = a * P,$$

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

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

#### **4.5 Statistická analýza**

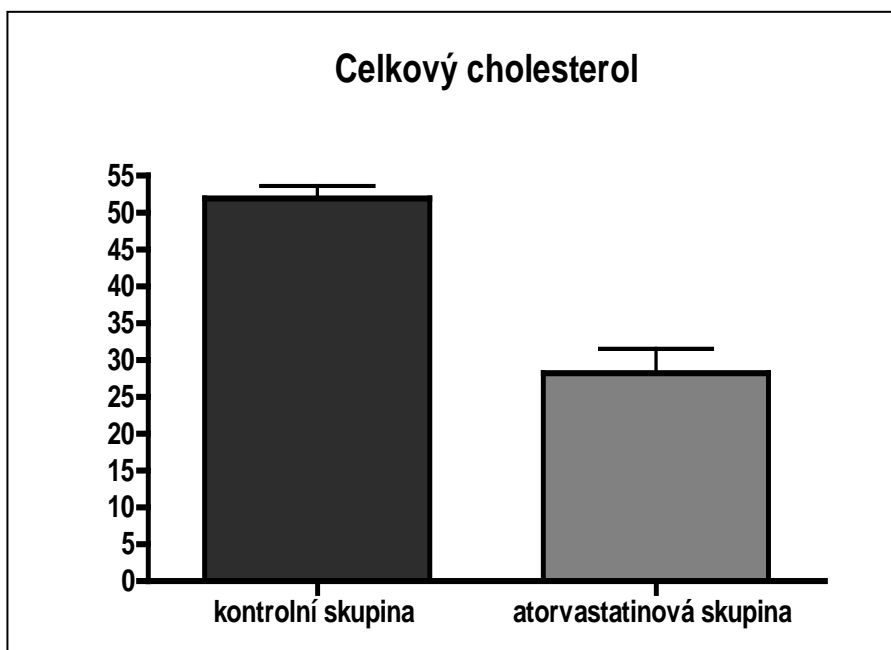
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byl použit neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$  kde  $\alpha=0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

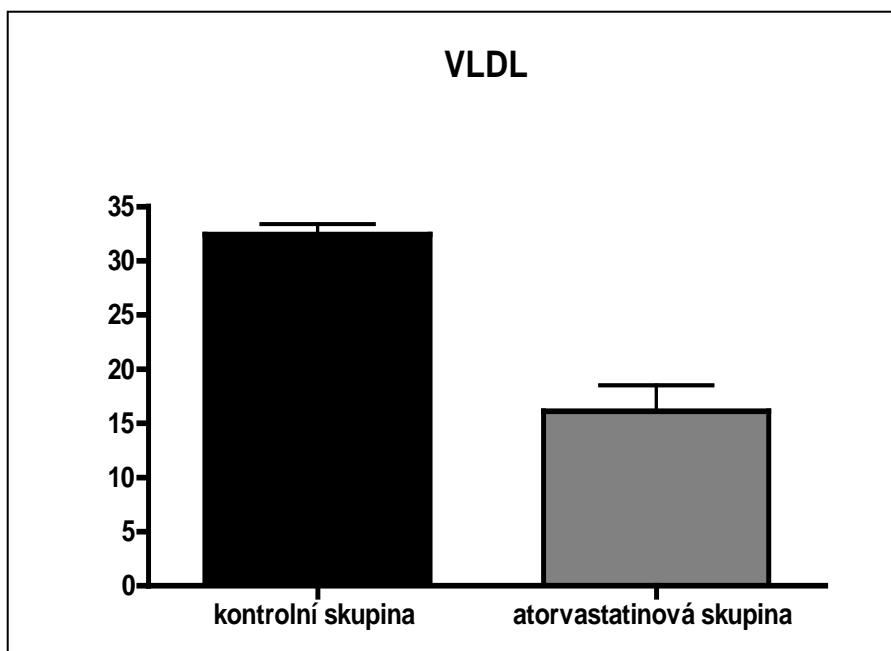
### 5.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL a TAG (viz. obr.6-8;10). Navíc bylo zjištěno, že atorvastatin také zvýšil hladiny HDL cholesterolu (viz. obr.9).

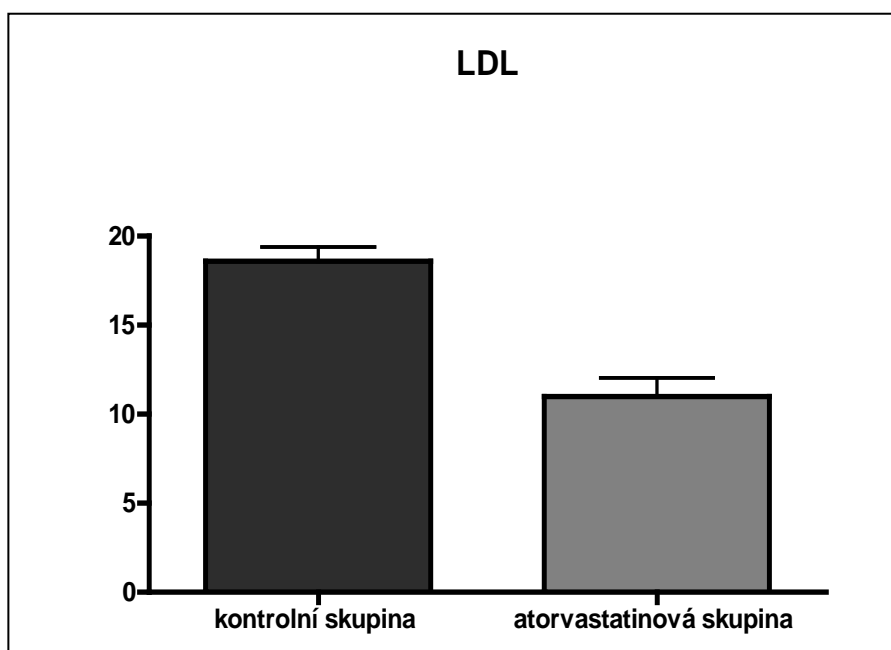
**Obrázek 6** Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (<sup>xxx</sup>P≤0,001).



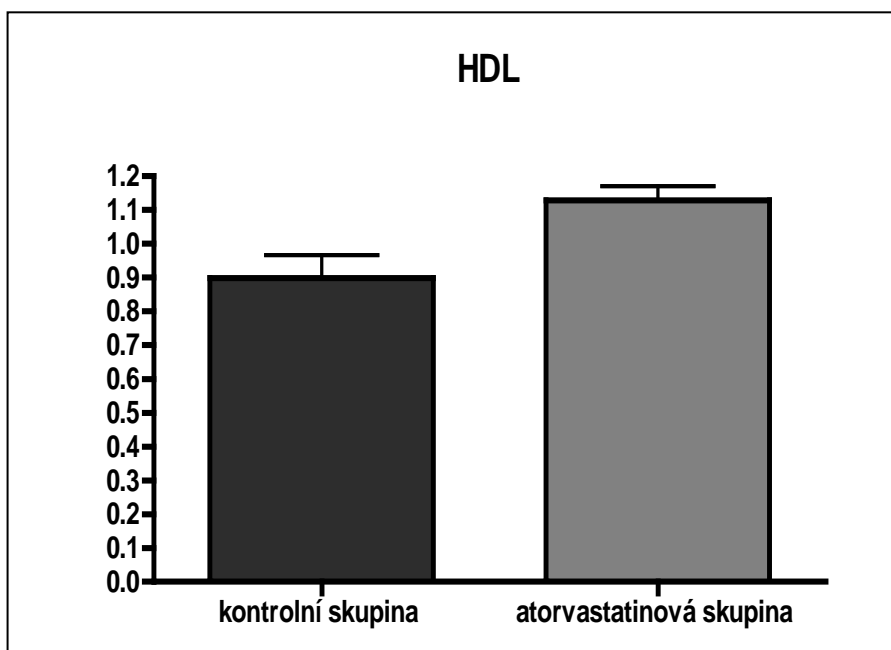
**Obrázek 7** Hladiny VLDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (<sup>xxx</sup>P≤0,001).



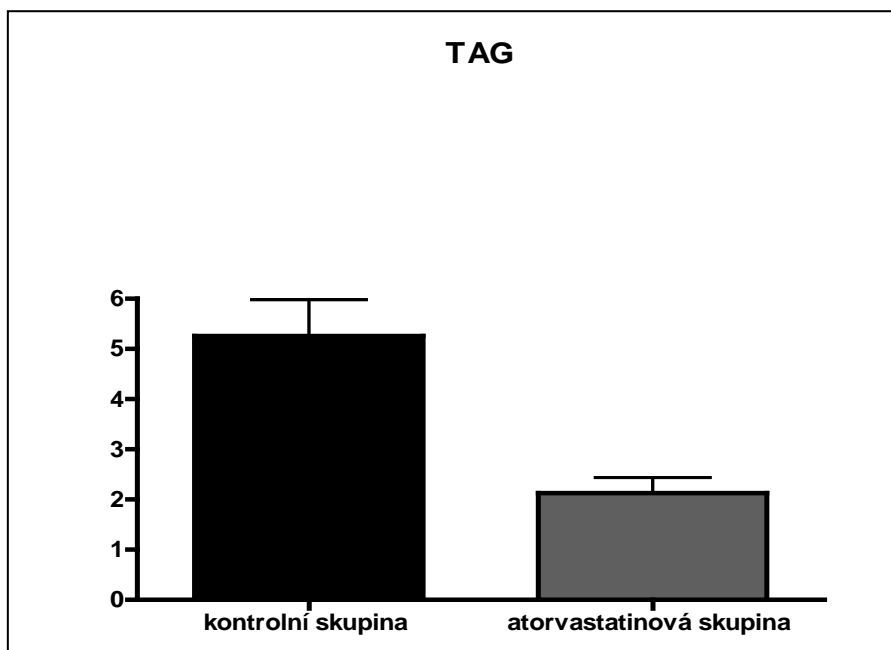
**Obrázek 8** Hladiny LDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (<sup>xxx</sup>P≤0,001).



**Obrázek 9** Hladiny HDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny HDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (<sup>xx</sup>P≤0,05).



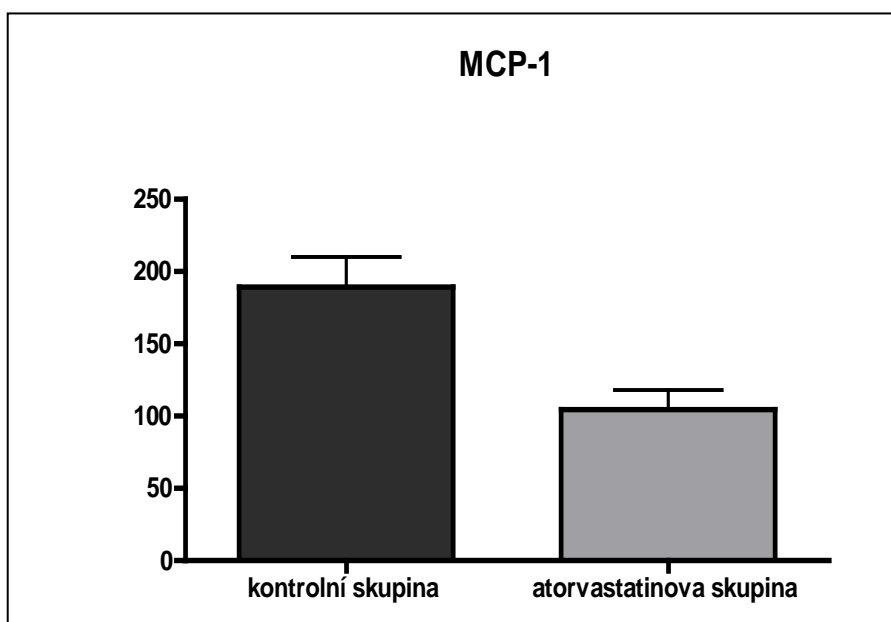
**Obrázek 10** Hladiny triacylglycerolů u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou. (<sup>xxx</sup>P≤0,001).



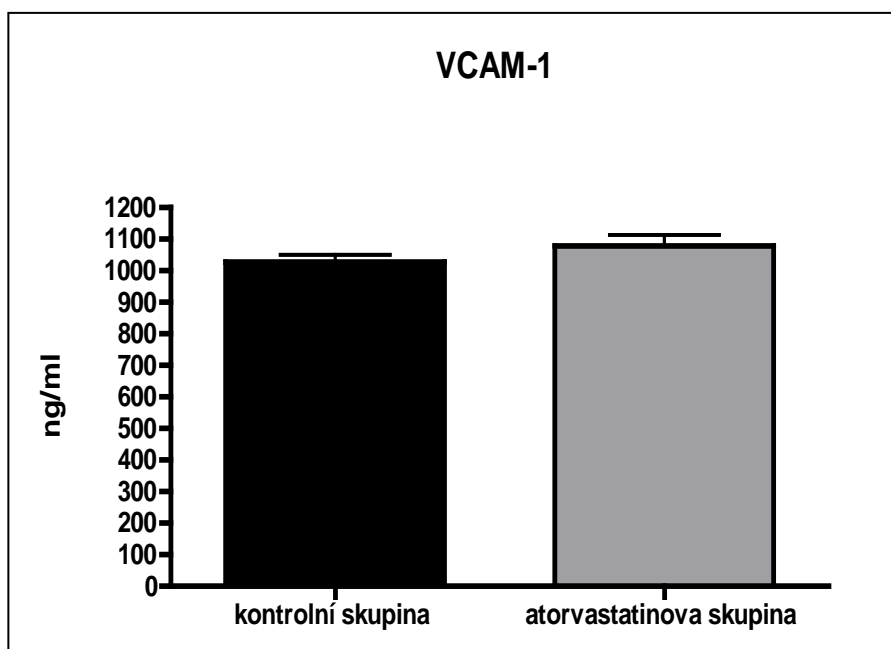
## 5.1 ELISA analýza

Byla provedena analýza sérových koncentrací prozánětlivých markerů MCP-1 a VCAM-1. Hladina MCP-1 byla po podávání atorvastatinu snížena (obr.11). Naproti tomu koncentrace VCAM-1 v séru nebyla po podávání atorvastatinu nijak ovlivněna (obr.12).

**Obrázek 11** Hladiny MCP-1 u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Podávání atorvastatinu vedlo ke statisticky významnému snížení hladin MCP-1 v porovnání s kontrolní skupinou. (<sup>xx</sup>P≤0,05).



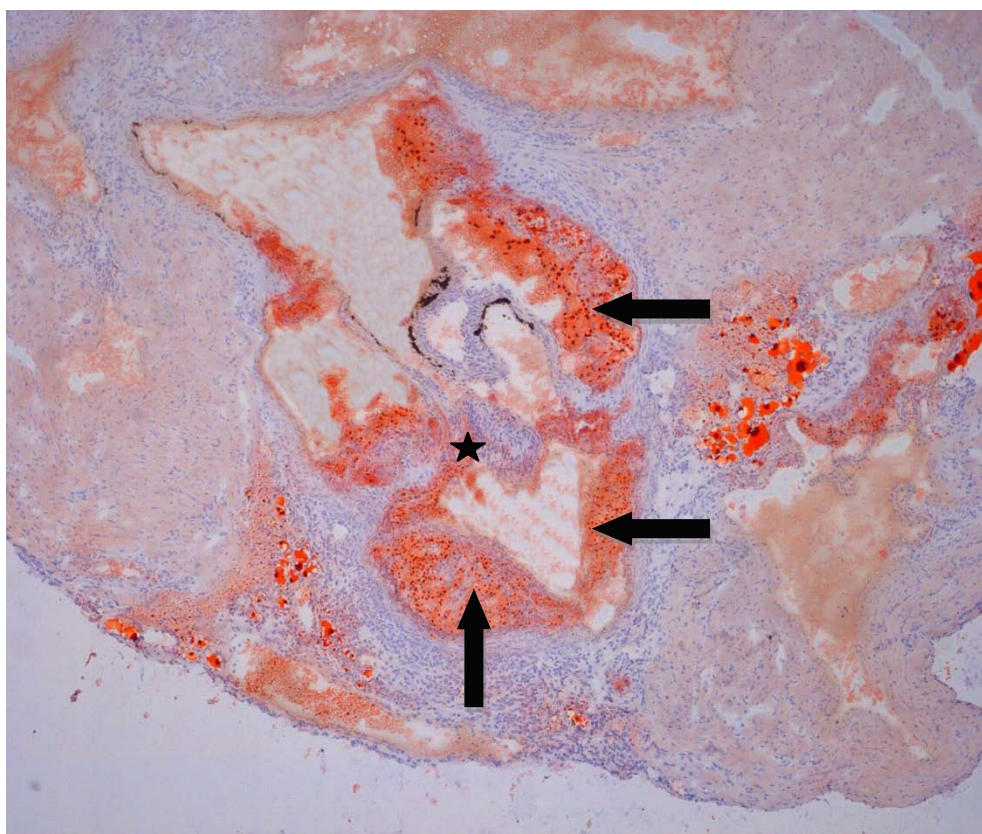
**Obrázek 12** Hladiny VCAM-1 u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny VCAM-1 v porovnání s kontrolní skupinou.



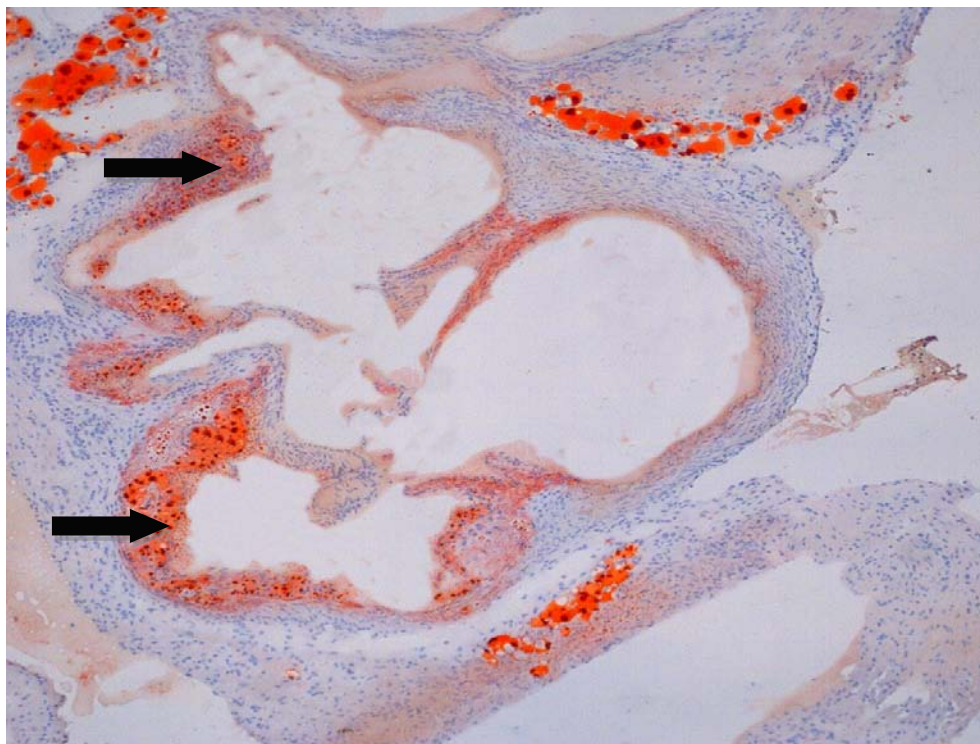
## 5.2 Histologické barvení olejovou červení

U všech řezů v kontrolní i atorvastatinové skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí. Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Podávání atorvastatinu vedlo k mírnému snížení akumulace lipidů v aterosklerotických lézích.

**Obrázek 13** Barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Zvětšení preparátu 40x.



**Obrázek 14** Barvení olejovou červení u atorvastatinové skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta společně se 100 mg/kg atorvastatinu. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní. Intenzita a plocha barvení olejovou červení se zdá být menší, než tomu bylo u kontrolní skupiny. Zvětšení preparátu 40x.

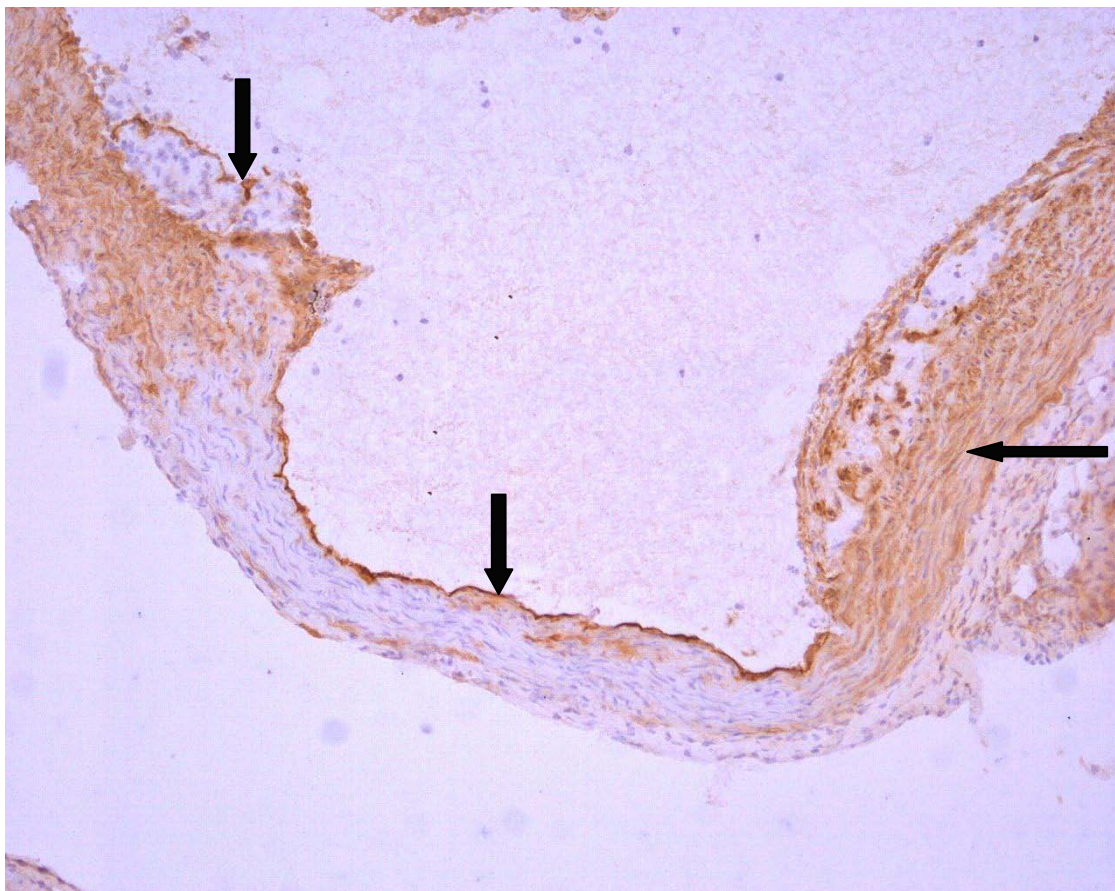


### **5.3 Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu**

Expres VCAM-1 byla pozorována v kontrolní i atorvastatinové skupině. Silná intenzita byla pozorována v medii cév pod aterosklerotickými pláty. Dále byla pozorována exprese v aterosklerotických plátech a to zejména u kontrolní skupiny. Silná exprese byla pozorována také na cévním endotelu v oblasti plátu i mimo něj.



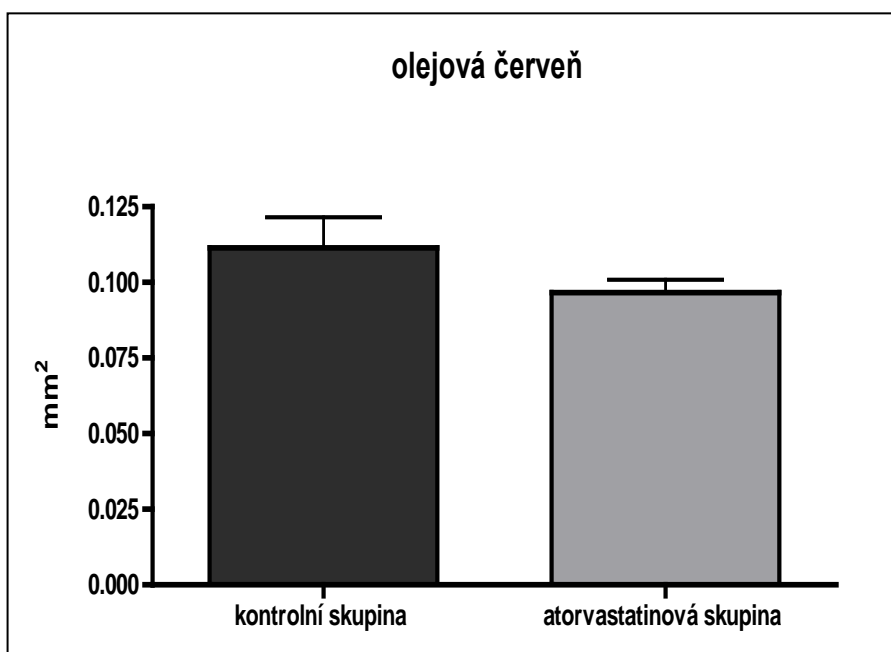
**Obrázek 15** Imunohistochemické barvení VCAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je pozorována v medii cévy pod aterosklerotický plátem, v plátu a na cévním endotelu. Zvětšení 200x.



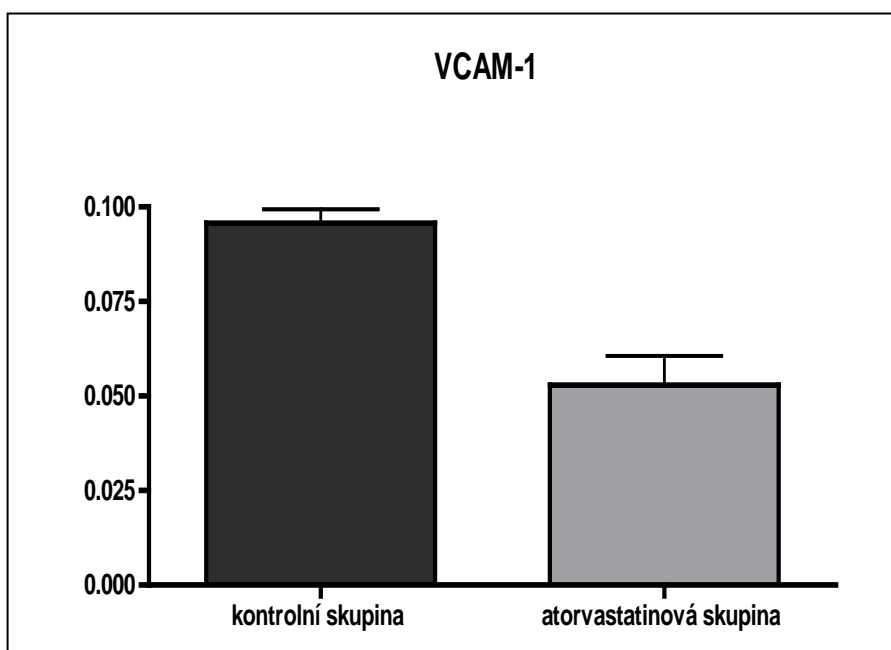
#### **5.4 Stereologická analýza histologického barvení olejovou červení a imunohistochemického barvení VCAM-1**

Stereologická analýza prokázala pouze malé zmenšení plochy barvení olejové červeně (obr.16). Naproti tomu velikost plochy VCAM-1 barvení byla výrazně snížena po podávání atorvastatinu.

**Obrázek 16** Stereologická analýza velikosti plochy barvení olejovou červení. Podávání atorvastatinu vedlo pouze k mírnému statisticky nevýznamnému snížení plochy barvení.



**Obrázek 17** Stereologická analýza velikosti plochy VCAM-1 barvení. Podávání atorvastatinu vedlo ke statisticky významnému snížení plochy barvení ve srovnání s kontrolní skupinou. <sup>xxx</sup>P≤0,001.



## **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 (1).

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky statiny. Statiny (někde uváděny též pod názvem vastatiny) jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktázy). Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením, tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizací ateromatózních plátů, aj. (47). Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (56).

Ačkoli se tento model zprvu vyvíjel slibně, měl dva zásadní problémy. Oproti lidským aterosklerotickým lézím, které se vyskytují ve větvích hlavních cév, kde pláty progredují, myší léze jsou malé, vyskytují se pouze v oblastech aortálního oblouku a nedochází k jejich progresi. Strava, kterou jsou myši krmeny, je nefyziologická, obsahuje 10 – 20x více cholesterolu a žlučových kyselin. Tato strava vyvolá chronický zánět pouze u citlivých kmenů myši, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohadu, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myši jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE) (57). ApoE jsou tvořeny primárně v játrech, mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myší se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneurysmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly (39).

U těchto myší bylo prokázáno, že podávání statinů u tohoto modelu nevede k očekávanému hypolipidemickému účinku a tudíž je možné tento model považovat za vhodný ke studiu pleiotropních účinků statinů (58). Na druhou stranu ale někteří autoři prokázali opačný vliv podávání statinů u tohoto modelu aterosklerózy. Wang et al. a Bea et al. prokázali hyperlipidemický účinek simvastatinu, který byl navíc doprovázen progresí aterogenních změn u těchto myší (59). Výše uvedené výsledky tedy naznačují, že tento kmen není příliš vhodný ke studiu účinku statinů.

LDL-receptor deficientní myši jsou jedinci, kteří také vznikli genetickými úpravami kmene C57BL/6J. Po podání standardní diety u nich nedochází ke spontánnímu rozvoji hypercholesterolemie jako u apoE<sup>-/-</sup> myší. Hypercholesterolemie a morfologicky významná ateroskleróza se vyvíjí až po podávání diety s vysokým obsahem tuků. Přesto je nutné poměrně dlouhodobé podávání takovéto diety k indukci významných aterosklerotických plátů (60).

Podávání statinů těmto myším vede k hypolipidemickému a antiaterogennímu účinku, nicméně se často musí využívat velkých dávek statinů, a to až 300mg/kg/den (61).

Z výše uvedeného vyplývá, že ani jeden z těchto myších modelů není ideální pro studium účinků statinů a to buď z toho důvodu, že zde nejsou dostatečně vyvinuty aterosklerotické léze nebo že zde statiny nemají typický benefit srovnatelný s humánní medicínou.

ApoE/LDL receptor deficientní myši vyvíjejí výraznou spontánní hypercholesterolémii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z toho důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium účinků hypolipidemik (62).

My jsme se v této rigorózní práci pokusili ověřit, zda atorvastatin u těchto myší vykazuje hypolipidemické, protizánětlivé a antiaterogenní účinky. Podávání dávky 100mg/kg/den atorvastatinu po dobu osmi týdnů velmi pozitivně ovlivnilo všechny parametry lipidového spektra. Došlo ke snížení celkového, VLDL, LDL cholesterolu a TAG. Navíc se signifikantně zvýšil HDL cholesterol. Podobné hypolipidemické účinky byly pozorovány také u lidí (47). Protizánětlivý účinek byl prokázán zejména díky snížení hladiny MCP-1 v krvi a díky snížení exprese VCAM-1 v intimě cév v oblasti aortálního sinu. Vzhledem k tomu, že oba tyto markery jsou důležité pro činnost makrofágů, jejich akumulace v intimě a pro rozvoj zánětlivé reakce v plátu, lze snížení těchto markerů hodnotit jako protizánětlivý účinek. Podobné účinky vykazují statiny také ve studiích u lidí (63).

## **7. ZÁVĚR**

Osmítýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100mg/kg/den vedlo k významnému zlepšení lipidového profilu léčených apoE/LDL receptor deficientních myší. Tento hypolipidemický účinek byl doprovázen výrazným protizánětlivým účinkem, který se projevil sníženou hladinou MCP-1 v krvi a expresí VCAM-1 ve stěně cévy.

Závěrem této rigorózní práce tedy může být tvrzení, že apoE/LDL receptor deficientní myši by mohly být dobrým zvířecím modelem pro studium účinků statinů na aterosogenezi. Tyto myši by mohly být využity zejména pro studium možné kombinace statinů s jinými hypolipidemiky (hypolipidemiky s jiným mechanismem účinku).

## **8. POUŽITÁ LITERATURA**

1. Ross R, Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.
2. Handzha IM, [Viral infection, atherosclerosis, and ischemic heart disease]. *Lik Sprava*: 65-67, 2001.
3. Krieglstein CF, Granger DN, Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*, 14: 44S-54S, 2001.
4. Cannon RO, 3rd, Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*, 44: 1809-1819, 1998.
5. Vanhoutte PM, [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 90 Spec No 6: 9-19, 1997.
6. Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al., Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91: 3527-3561, 1998.
7. Price DT, Loscalzo J, Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med*, 107: 85-97, 1999.
8. McEver RP, Moore KL, Cummings RD, Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*, 270: 11025-11028, 1995.
9. Joseph-Silverstein J, Silverstein RL, Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest*, 16: 176-182, 1998.
10. Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M et al., 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.
11. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ, Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 24: 1591-1601, 1994.
12. Mareckova Z, Heller S, Horky K, [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek*, 45: 46-50, 1999.
13. Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M, Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med*, 1: 447-456, 1995.
14. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M et al., Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*, 85: 199-207, 1999.
15. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA, PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma*, 17: 229-244, 1995.
16. Moiseeva EP, Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res*, 52: 372-386, 2001.
17. Bobryshev YV, Lord RS, Watanabe T, Ikezawa T, The cell adhesion molecule E-cadherin is widely expressed in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res*, 40: 191-205, 1998.
18. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM, Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1048-1054, 2003.
19. van Haelst PL, van Doormaal JJ, Asselbergs FW et al., Correlates of endothelial function and their relationship with inflammation in patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*, 104: 627-632, 2003.
20. Muntner P, He J, Astor BC et al., Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol*, 16: 529-538, 2005.

21. McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW et al., Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation*, 103: 1546-1550, 2001.
22. Coniglio RI, Colombo O, Vasquez L et al., [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. *Medicina (B Aires)*, 57: 21-28, 1997.
23. Stehbens WE, The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses*, 58: 359-360, 2002.
24. Semenkovich CF, Heinecke JW, The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes*, 46: 327-334, 1997.
25. Shantaram V, Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 21: 69-77, 1999.
26. Daubresse JC, [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux*, 21: A359-362, 2000.
27. Laurila A, Bloigu A, Nayha S et al., Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 2910-2913, 1997.
28. Mehta JL, Saldeen TG, Rand K, Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 31: 1217-1225, 1998.
29. Williams KJ, Tabas I, The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*, 9: 471-474, 1998.
30. Vestweber D, Blanks JE, Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 79: 181-213, 1999.
31. Konstantopoulos K, McIntire LV, Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest*, 100: S19-23, 1997.
32. Boyle JJ, Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol*, 3: 63-68, 2005.
33. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H et al., A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*, 107: 1255-1262, 2001.
34. Schwartz SM, Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*, 100: S87-89, 1997.
35. Hackman A, Abe Y, Insull W, Jr. et al., Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation*, 93: 1334-1338, 1996.
36. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V et al., Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*, 99: 1780-1787, 1999.
37. Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L et al., Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol*, 56: 483-489, 2005.
38. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N, Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258: 468-471, 1992.
39. Hofker MH, Breuer M, Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol*, 110: 63-78, 1998.
40. Bisgaier CL, Essenburg AD, Auerbach BJ et al., Attenuation of plasma low density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res*, 38: 2502-2515, 1997.
41. Nishina PM, Lowe S, Verstuyft J et al., Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res*, 34: 1413-1422, 1993.
42. Ishibashi S, Herz J, Maeda N et al., The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density



- lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4431-4435, 1994.
43. Martin T, Cardarelli PM, Parry GC et al., Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol*, 27: 1091-1097, 1997.
  44. Xiao D, Wang Z, She M, Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 expression in vivo and a novel model for monocyte adhesion to arterial intima. *Chin Med J (Engl)*, 112: 438-442, 1999.
  45. Yang AL, Chen HI, Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis*, 169: 11-17, 2003.
  46. Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC et al., Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation*, 106: 1390-1396, 2002.
  47. Stancu C, Sima A, Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 5: 378-387, 2001.
  48. Davignon J, Mabile L, [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 62: 101-112, 2001.
  49. Calabro P, Yeh ET, The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol*, 20: 541-546, 2005.
  50. Arnaud C, Mach F, Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 98: 661-666, 2005.
  51. Hernandez C, Lecube A, Barbera G et al., Effects of hypolipidemic treatment on serum markers of vascular inflammation in dyslipidemic men. *Med Sci Monit*, 9: CR114-119, 2003.
  52. Duriez P, [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie*, 58: 5-14, 2003.
  53. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A, The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther*, 99: 95-112, 2003.
  54. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM, Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*, 348: 1079-1082, 1996.
  55. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF et al., The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, 96: 857-881, 1988.
  56. Paigen B, Morrow A, Holmes PA et al., Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, 68: 231-240, 1987.
  57. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW et al., ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 14: 133-140, 1994.
  58. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M et al., Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 115-121, 2001.
  59. Bea F, Blessing E, Bennett B et al., Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 1832-1837, 2002.
  60. Breslow JL, Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272: 685-688, 1996.
  61. Levy Z, Rachmani R, Trestman S et al., Low-dose interferon-alpha accelerates atherosclerosis in an LDL receptor-deficient mouse model. *Eur J Intern Med*, 14: 479-483, 2003.
  62. Olszanecki R, Jawien J, Gajda M et al., Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *J Physiol Pharmacol*, 56: 627-635, 2005.
  63. Takebayashi K, Matsumoto S, Wakabayashi S et al., The effect of low-dose atorvastatin on circulating monocyte chemoattractant protein-1 in patients with

type 2 diabetes complicated by hyperlipidemia. *Metabolism*, 54: 1225-1229, 2005.