

1. ÚVOD

Ateroskleróza a její orgánové komplikace, tedy infarkt myokardu, mozkové cévní příhody a ischemická choroba dolních končetin, jsou nejčastější příčinou předčasné invalidizace a úmrtí ve většině civilizovaných zemí. Kardiovaskulární mortalita představuje v civilizovaných rozvinutých zemích nejčastější příčinu úmrtí po 45. roce věku i v celkovém úhrnu všech úmrtí, zatímco nejčastější příčinou úmrtí v nejhudších zemích jsou komplikace podvýživy, vzácně přímo hladovění.

Aterosklerotický proces, který se odehrává ve stěně tepny, je složitým dějem, do kterého zasahuje celá řada faktorů. Ateroskleróza je důsledkem kontinuálního celoživotního děje, jehož základy začínají již v raném dětství, ne-li prenatálně. V patogenezi aterosklerózy hrají klíčovou roli zejména metabolické faktory, celý proces má však také aspekty chronického zánětu. Život ohrožujícím vyústěním progresu aterosklerotického procesu je nestabilní aterom. Nestabilní aterom je pojem označující přeměnu poměrně tuhého ateromového stromatu na jeho polotekutou formu, která může v důsledku své konzistence vést k ruptuře ateromového obalu a k herniaci ateromových hmot do lumina cévy, jindy pak semilikvidní ateromový obsah vede k obturaci lumina cévy se všemi dalšími důsledky zejména v řečišti koronárním a cerebrálním.

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 (Handzha 2001).

V této rigorózní práci jsme se zabývali ověřením, zda atorvastatin vykazuje u apoE/LDL-receptor deficientních myší podobné účinky jako je tomu v humánní medicíně. Dále byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi, hladiny

zánětlivých markerů v krvi a také exprese zánětlivých markerů v aterosklerotických plátech a velikost aterosklerotických lézí. K hodnocení morfologických nálezů byly použity stereologické metody.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. FUNKCE ENDOTELU ZA FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK

Endotel byl dlouho považován za strukturu, která vyplňuje oběhový systém, a má primární nezbytnou funkci udržovat permeabilitu buněčné stěny. V 19. století von Reckingausen ustanovil, že cévy nejsou pouze „tunely“ procházející skrz tkáň, ale že jsou též vyplněny buňkami. Starlingův experiment a jeho zákon kapilární výměny, stanovený v roce 1896, vedly k upevnění domněnky, že endotel je především selektivní, ale statická fyzikální bariéra, což popřelo Heidenhahnův popis endotelu z roku 1891 jako aktivního sekrečního buněčného systému. Nicméně studie cévní stěny pod elektronovým mikroskopem provedené Paladem v roce 1953 a fyziologické studie Gowana z roku 1959 popisují interakce mezi lymfocyty a endotelem postkapilárních venul podporované několika následujícími studiemi, které vedou k současnému pohledu na endotel jako na dynamický, heterogenní, diseminovaný orgán, který zastává životní funkce sekreční, syntetické, metabolické a imunologické (1).

Endotel je tedy tvořen jednou vrstvou specializovaných buněk, které mají řadu regulačních funkcí. Základní funkce cévního endotelu jsou: regulace cévního tonu, ovlivnění struktury cévní stěny, antitrombotické a fibrinolytické působení, interakce s buňkami v cirkulaci a regulace permeability cévní stěny (2).

2.1.1. Regulace cévního tonu

Endotel nepředstavuje pouze strukturální bariéru mezi cirkulací a okolními tkáněmi, ale endoteliální buňky také secernují mediátory, které ovlivňují vaskulární hemodynamiku ve fyziologickém stavu. Endoteliální buňky přispívají k regulaci krevního tlaku a toku krve uvolňováním vazodilatačních látek jako je NO a

prostacyklin(PGI 2), stejně jako látek vazokonstrikčních včetně endotelinu a PAF (destičkového aktivačního faktoru) (3). Tyto chemicky rozdílné sloučeniny nejsou skladovány v intracelulárních granulích; přesněji řečeno jejich hlavní biologické účinky jsou regulovány lokalizací specifických receptorů na cévních buňkách, jejich rychlým metabolismem nebo stupněm genové transkripce. NO je konstitutivně secernován endoteliálními buňkami, ale jeho produkce je modulovaná množstvím exogenních chemických i fyzikálních stimulů, zatímco ostatní známé mediátory (PGI 2, endotelin, PAF) jsou syntetizovány primárně jako odpověď na změny vnějšího prostředí (4).

2.1.2. Vazoregulační látky syntetizované endotelem

LÁTKA	HLAVNÍ ÚČINEK	JINÉ ÚČINKY	SEKRECE	SLOUČENINA	PREKURZOR. SLOUČENINA
NO (oxid dusnatý)	VD	Udržuje základní tonus cév, ↓adhezi leukocytů a krevních destiček, ↑sekreci krevních destiček, podporuje destičkovou disagregaci, ↓ migraci a proliferaci hladkých svalových buněk	Parakrinní, konstitutivní a indukovaná trombinem, ADP, bradykininem, substancí P, muskarinovými agonisty, cytokiny	Heterodiatom. volný radikál	L-Arg
PGI 2 (prostacyklin)	VD	Zpomaluje destičkovou agregaci a depozici	Parakrinní, indukovaná a místa poškození endotelu	eikosanoid	Kyselina arachidonová
PAF (destičkový aktivační faktor)	VK	Podporuje leukocytární adhezi na buněčný povrch	Juxtakrinní/ indukovaná	fosfolipid	Kyselina arachidonová
ET -1 (endotelin 1)	VK	Mitogen pro buňky hladkých svalů, moduluje účinky mnoha sloučenin	Parakrinní/indukovaná hypoxií, ischemií	Peptid z 21 aminokyselin	Preproendotelin 1 (203 aminokyselin)

2.1.3. Interakce mezi endoteliálními a krevními buňkami

2.1.3.1. Interakce krevních destiček a leukocytů s cévní stěnou

Cirkulující leukocyty a krevní destičky mohou adherovat na specifické oblasti endotelu během procesů imunitního dozoru a také se účastnit odpovědi na poranění

nebo infekci tkáně. Tyto multicelulární interakce jsou nezbytnými prekurzory fyziologického zánětu nebo hemostázy. Naopak nekontrolovaná adheze leukocytů a krevních destiček přispívá k zánětlivým a trombotickým poruchám(5).

2.2. ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE

V posledních letech se prohlubují poznatky o zásadní úloze endotelu v regulaci funkcí cévního systému a v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. Rizikové faktory jako jsou hypertenze, hyperlipoproteinémie, diabetes a kouření svým chronickým působením poškozují fyziologické funkce endotelu a vedou ke vzniku endoteliální dysfunkce, která 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 (6).

Endotel neustále odpovídá na řadu lokálních a systémových podnětů. Aktivace endotelu těmito podněty vede k různým typům odpovědi-ke změně permeability, vasospastickým 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 krátkou expozici aktivačním faktorům. Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, kouření, hyperhomocysteinémie nebo nedostatek estrogenů, svým chronickým působením poškozují endoteliální funkce a vedou ke vzniku endoteliální dysfunkce (7).

Endoteliální dysfunkcí se rozumí lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi faktory vazorelaxačními a vazokonstrikčními, prokoagulačními a

antikoagulačními, růst stimulujícími a růst inhibujícími. Výsledkem je proaterogenní účinek s převahou vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů.

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.

Vystavení endotelu působení aterogenních lipidů vede ke snížené aktivitě NO, která má za následek uplatnění růstových faktorů, průnik monocytů a LDL částic subendoteliálně a tvorbu pěnových buněk. Přítomnost lipoproteinu inhibuje fibrinolýzu a přispívá ke vzniku trombotických komplikací. U nemocných s arteriální hypertenzí hraje důležitou roli při poškození endotelu zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron a snížená aktivita vazodilatačních působků (EDRF/NO, prostacyklin). Zvýšená permeabilita endotelu a exprese adhezivních molekul (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1) umožňují adhezi a průnik zánětlivých buněk do cévní stěny, dochází ke strukturálním změnám cévní stěny, které se projevují morfologickými změnami endotelií, hypertrofií a hyperplazií hladkých svalových buněk (8).

Hyperglykémie je spojená s glykosylací lipoproteinů, glykací bílkovin a zvýšenou permeabilitou endotelu pro aterogenní lipidy. Hyperglykémie aktivuje endotel k expresi adhezivních molekul, dochází k průniku monocytů přes endotel. Narušena je také produkce vazodilatačních a koagulačních působků (snížená syntéza prostacyklinu, nižší dostupnost NO, zvýšená sekrece von Willebrandova faktoru a PAI-1) (9).

Zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron se u srdečního selhání podílí na zvýšení periferní cévní rezistence. Zvýšená degradace bradykininu a tím i snížená

produkce vazodilatačních faktorů, aktivace syntézy endotelinu a produkce TNF při snížené tkáňové perfuzi dále přispívají k rozvoji endoteliální dysfunkce.

Poškození funkce endotelu je prvním krokem při vzniku aterosklerózy. V časně fázi rozvoje aterosklerózy umožňuje zvýšená permeabilita aktivovaného endotelu průnik aterogenních lipidů a monocytů do cévní stěny. K rozvoji endoteliální dysfunkce přispívá nedostatečná produkce vazodilatačně, antiadhezivně a antitromboticky působícího NO a zvýšená syntéza kontraktálních a růst stimulujících faktorů (endotelin, angiotenzin II, tromboxan A₂, PDGF). Při pohybu leukocytů v blízkosti aktivovaného endotelu dochází k interakci leukocytů s adhezivními molekulami, adhezi a migraci subendoteliálně. Zde se fagocytózou oxidovaných LDL částic monocyty mění v pěnové buňky a vytvářejí tukové proužky jako první stadium aterosklerózy. Postupnou akumulací krevních buněk a lipoproteinů se vytváří aterosklerotický plát.

U pokročilé aterosklerotické léze zvyšuje endoteliální dysfunkce trombotickou pohotovost a riziko ruptury plátu. Dysfunkce endotelu se tak podílí na vzniku nestabilních lézí s vysokým obsahem lipidů a makrofágů, které se klinicky mohou manifestovat akutními kardiovaskulárními příhodami.

Nejčastěji se k průkazu endoteliální dysfunkce používá sledování cévní reaktivity na vazoaktivní podněty, další možností je laboratorní stanovení markerů endoteliální dysfunkce a sledování metabolismu značených prekurzorů.

Léčba endoteliální dysfunkce může předejít rozvoji aterosklerózy zabráněním přechodu funkčních změn ve změny strukturální a umožňuje stabilizovat již vyvinuté aterosklerotické léze. Léčba onemocnění spojených s endoteliální dysfunkcí by měla směřovat k obnovení fyziologických funkcí endotelu eliminací rizikových faktorů

nebo vhodnou farmakologickou léčbou stimulující vazodilatační, antiadhezivní a antiagregační vlastnosti endotelu (10).

Co se týče nefarmakologických možností léčby, nejjednodušším opatřením je odstranění působení rizikových faktorů úpravou životosprávy. Vyloučení vlivu kouření vede do několika měsíců k normalizaci endoteliálních funkcí. Zlepšení endoteliální dysfunkce bylo dosaženo úpravou glykémie u diabetiků, fyzickým tréninkem u nemocných se srdečním selháním, změnou dietních návyků u nemocných s hyperlipoproteinémií.

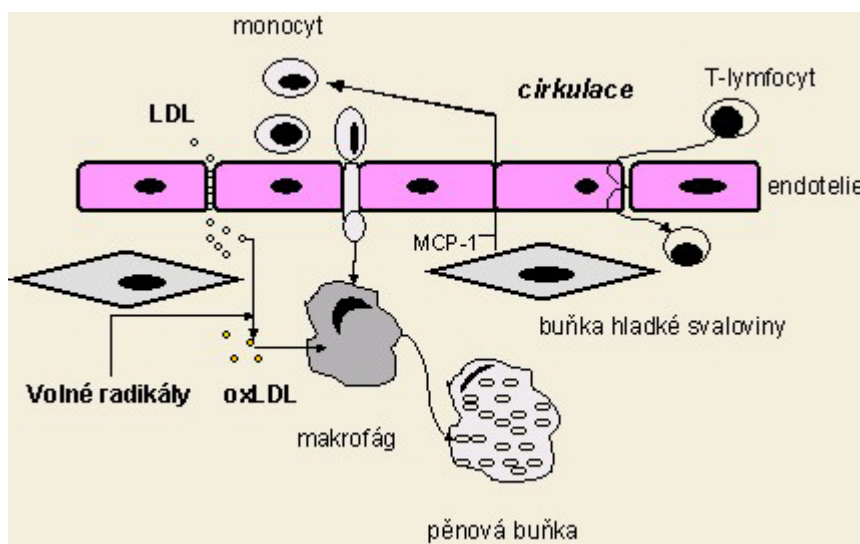
Farmakologická léčba endoteliální dysfunkce spočívá v hypolipidemické léčbě; osvědčily se především statiny, které snižují LDL a oxidovaný LDL-cholesterol, stimuluji produkci EDRF/NO, vedou k obnově endotelem zprostředkované vazodilatace, dochází k významnému poklesu výskytu kardiovaskulárních příhod, na kterém se spíše než regrese aterosklerózy podílí úprava endoteliální dysfunkce (11).

Klinický význam působení inhibitorů ACE na endotel potvrdily například výsledky studie TREND, která u nemocných s koronární aterosklerózou a zvýšením LDL-cholesterolu prokázala úpravu endoteliální dysfunkce při šestiměsíční léčbě quinaprilem (12).

Předpokládaným mechanismem působení antioxidantů (vitamín E, C, beta-karoten) na endoteliální dysfunkci je snížení oxidačního stresu vedoucí k nižší inaktivaci NO a stimulaci syntézy prostacyklinu; výsledky studií však jsou zatím nejednoznačné.

Řada studií prokázala účinnost estrogenové substituce v menopauze na úpravu endoteliální dysfunkce a pokles kardiovaskulární mortality; estrogeny mimo jiné zvyšují syntézu NO a prostacyklinu, inhibují syntézu troboxanu A₂ a endotelinu-1, snižují hladinu LDL-cholesterolu a mají antioxidantní účinky.

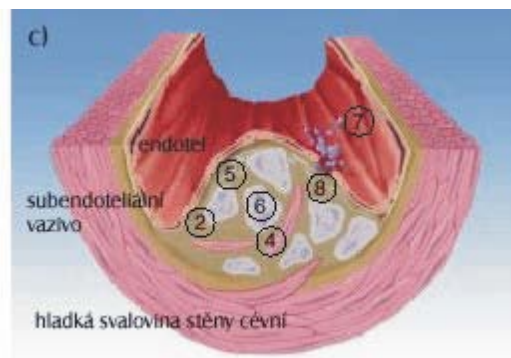
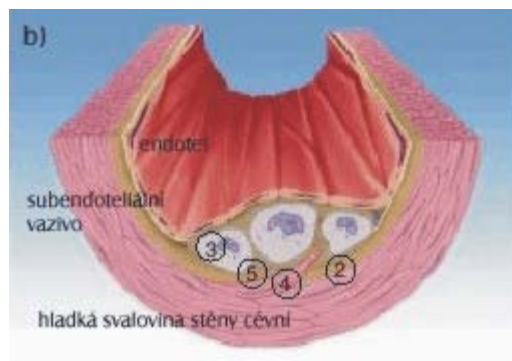
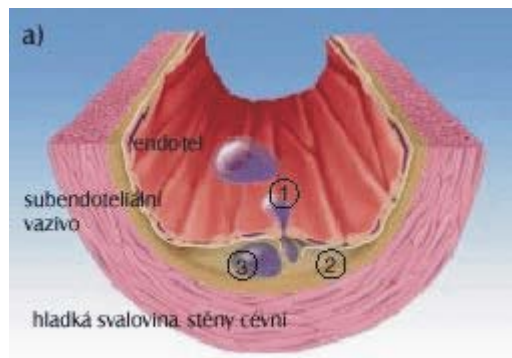
Dalšími látkami ovlivňujícími endoteliální funkce jsou blokátory kalciových kanálů. Amlodipin ovlivňuje endotel stimulací produkce bradykininu a inhibicí oxidace lipidů volnými radikály a tvorby pěnových buněk (13).



Obr. 1: Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu

2.2.1. Endotel při ateroskleróze

Ateroskleróza je nejvíce rozšířené onemocnění cév v rozvinutých zemích. Představa, že ateroskleróza vzniká jako odpověď na endoteliální poranění, byla poprvé vyslovena před více než 20 lety, když bylo zjištěno, že již při nepravidelnostech v organizaci endoteliálních buněk jsou často v těchto místech nalézány tukové proužky, zatímco úplná destrukce endotelu může být patrná pouze v pozdním stádiu nemoci. Tyto a další práce jasně poukazují na fakt, že ne pouze mechanická, ale i funkční porucha endotelu může vést k rozvoji endoteliální dysfunkce (5).



1. migrace monocytu
2. infiltrace lipoproteiny
3. makrofág
4. migrace a proliferace buněk hladké svaloviny
5. novotvorba vaziva
6. tvorba pěnových buněk
7. adheze a agregace trombocytů
8. ruptura aterosklerotického plátu

Obr. 2: Endotel při ateroskleróze

2.3. RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY

Rizikové faktory aterosklerózy a jejích orgánových komplikací se dělí na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné faktory patří věk (s vyšším věkem stoupá jak progres aterosklerotického procesu, tak množství jeho komplikací), mužské pohlaví (muži měli častěji komplikace aterosklerotického procesu, nyní se zdá, že se poměr mezi muži a ženami začíná postupně srovnávat) a genetické vloh y. Za hlavní ovlivnitelné faktory považujeme kouření, inzulinovou rezistenci a hyperinzulinismus, arteriální hypertenzi, dyslipidémii, obezitu, diabetes mellitus, hyperfibrinogémi i, nedostatek aerobní aktivity, nedostatek estrogenů, hyperhomocysteinémi i, snížený příjem antioxidantů, nenasycených mastných kyselin a vlákniny, nadbytek přijímané energie, cholesterolu, nasycených mastných kyselin a dále biologické faktory (14).

Věk je faktor zřetelně neovlivnitelný, je základním přístupem oddálení manifestace orgánových komplikací aterosklerózy, tedy ischemické choroby srdeční, a po jejich eventuální manifestaci dalšího oddálení recidivy těchto komplikací.

Mužské pohlaví bylo a je tradičně považováno za rizikový faktor zejména pro ischemickou chorobu srdeční. V posledních letech se postupně vyrovnává rozdíl mezi procentuálním zastoupením kouření u mužů a u žen a současně stoupá poněkud věk manifestace ICHS. Proto se zdá, že tradičně pojímaný neovlivnitelný rizikový faktor spojený s mužským pohlavím není tak zřetelný jako před deseti či patnácti roky. Je však evidentní, že ženy onemocní ICHS častěji až v menopauze (15).

Primární, geneticky podmíněnou dyslipoproteinémi i je například familiární hypercholesterolémie; autozomálně dominantní onemocnění, které je důsledkem chybní nebo funkční poruchy LDL receptoru a následně zpomaleným katabolismem LDL a IDL. K manifestaci nemoci dochází od narození, u heterozygótů jsou koncentrace LDL-C 2-3krát zvýšeny ve srovnání se zdravými osobami. Koncentrace

TC se pohybují mezi 9-13 mmol/l, paralelně jsou zvýšené koncentrace LDL-C a apo B-100; u homozygótů se koncentrace TC nachází mezi 15-30 mmol/l a proporcionálně jsou zvýšeny koncentrace LDL-C.

Mezi další geneticky podmíněná onemocnění patří familiární defekt apolipoproteinu B-100 autozomálně dominantní, který je způsoben bodovou mutací (Glu 3500→Arg) apo B-100, která vede ke snížené afinitě LDL k LDL-R. Nejčastější příčinou vzestupu TC a LDL-C v populaci je polygenní hypercholesterolemie; frekvence onemocnění se udává mezi 1:20-100, kdy se patofyziologicky uplatňuje kombinace genetických faktorů i vlivů zevního prostředí, což ústí ve zvýšenou produkci LDL, ale i jejich zpomalené odbourávání.

Familiární kombinovaná hyperlipidémie je nejčastější geneticky podmíněná porucha metabolismu LP, frekvence v běžné populaci je asi 0.5-1%; jedná se o smíšenou hyperlipidémii, která se často vyskytuje u nemocných po prodělaném infarktu myokardu (v 10-15%), porucha má autozomálně dominantní dědičnost. Může se jednat o poruchu jednoho hlavního genu a několika genů kandidátních, charakteristickým rysem je zvýšená syntéza apo B-100 a produkce „malých“ VLDL, TC od 6.5 do 8.0 mmol/l, část má pokles HDL-C a hyper apo B-100. Další genetickou příčinou DLP může být familiární dysbetalipoproteinémie, familiární endogenní a familiární smíšená hypertriglyceridémie, atd. (16).

Co se týče ovlivnitelných rizikových faktorů, je dokázáno, že riziko rozvoje ICHS stoupá se zvyšující se tělesnou hmotností. Riziko ICHS je u lidí s body mass indexem 23-25 vyšší o 50% než u osob s BMI pod 21. Obezita může mít (asi i vlivem mobilizovaných volných mastných kyselin) přímý vliv na předčasný rozvoj aterosklerózy, která je častěji spojena s centrálním typem obezity. Kombinace

centrální obezity a inzulínové rezistence vede k rychlé nadprodukci VLDL (s vysokým obsahem TG) v játrech (17).

Je prokázán přímý vliv hyperinzulinémie; inzulínová rezistence zvyšuje koncentraci VLDL, snižuje koncentraci HDL, zvyšuje výskyt arteriální hypertenze. Inzulín působí na cévní stěnu stimulací tvorby růstových faktorů, proliferací buněk hladkého svalstva, stimulací produkce pojivové tkáně, zvýšenou aktivitou LDL-C, zvýšenou tvorbou a sníženou regresí tukových proužků, zvýšením hladiny plazmatického endotelinu-1, zvýšením inhibitoru plazminového aktivátoru-1 (18).

Arteriální hypertenze je i se svými možnými komplikacemi složitým onemocněním, jehož všechny aspekty nejsou dosud vysvětleny. Na stěnu tepny působí přímo zvýšení krevního tlaku, změny proudění krve, dochází k poruše endoteliální vrstvy. Hypertenze vede k remodelaci hladké svaloviny ve velkých tepnách, v malých tepnách vede ke zvýšení cévního tonusu (19).

Předčasná menopauza a s tím spojený nedostatek estrogenů představuje také zvýšené riziko aterosklerózy.

Dalším rizikovým faktorem je vysoká koncentrace lipoproteinu Lp(a), která je spojena s vyšším rizikem ICHS; nebezpečný je i jeho protrombotický vliv, který je dán kompeticí a podobností struktury Lp(a) a fibrinogenu (zvýšená hladina fibrinogenu představuje výrazné riziko ICHS) (20).

Společné enviromentální faktory v rodině představují zejména výživa a také kouření. V rodinách kuřáků častěji kouří i filiární generace, nehledě na fakt pasivního kouření. Kouření u nás v posledních letech přibývá, zejména mezi mládeží a ženami mladšího a středního věku. Kouření, stejně jako výživa a arteriální hypertenze, představují pochopitelně faktory patogeneze aterosklerózy ovlivnitelné.

Sedavý způsob života má vliv především na svalové komponenty syndromu inzulinové rezistence a na rozvoj abdominální obezity. Je jisté, že sportování několikrát týdně po dobu několik desítek minut denně představuje významný faktor prevence ischemické choroby srdeční.

Faktory výživy v patogenezi aterosklerózy-opakovaně bylo prokázáno, že zvýšený přívod nasycených mastných kyselin či současný nižší přívod více-či mononenasycených mastných kyselin představují základní riziko aterosklerózy. Jejím rizikem je také vyšší celkový přísun energie, nižší příjem vlákniny, nižší příjem vitamínů, zejména kyseliny listové a protioxidačně působících vitamínů (vitamín C, vitamín E) a dále nižší příjem protioxidačně působících látek (například obecně flavonoidy, zejména antokyany) představuje riziko vzniku, udržování a progresu aterosklerotického procesu. Běžně jsou doporučovány rostlinné tuky; mnoho rostlinných tuků na bázi margarínu ale obsahuje vysoké procento trans-mastných kyselin, jejichž aterogenní potenciál je dvojnásobný při srovnání s nasycenými mastnými kyselinami. Proto obecné doporučování rostlinných tuků může vést ke zvýšené zátěži trans-mastnými kyselinami.

Z hlediska tak zvané správné výživy je za správný model v současné době považována dieta středomořská, obsahující ryby, drůbež, vzácněji maso hovězí či vepřové, málo uzenin, vyšší příjem zeleniny a ovoce, což znamená i vyšší příjem vlákniny, vitamínů a protioxidačních látek. Z hlediska příjmu alkoholu se považuje uměřený příjem zejména vína za protektivní. Uměřený příjem znamená do 40 g denně pro muže a do 20-25 g denně alkoholu pro ženy. Podle některých názorů je z hlediska protekce výhodnější pít víno s přívodem flavonoidů, jiné názory se opírají o fakt, že při mírném příjmu alkoholu stoupá HDL-cholesterol. Vysoký příjem

alkoholu vede naopak ke zvýšení plazmatických hladin triacylglycerolů, k jaterní steatóze a posléze cirhóze, atd. (21).

Nakonec bych zmínila ještě vliv zánětlivých markerů jako rizikového faktoru aterosklerózy; jednoznačné patogeny určeny nebyly, ale o určitých mikrobech je známo, že jejich výskyt byl spojen s vyšší frekvencí infarktu myokardu. Nejčastěji jsou studovány *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Coxiella burnetii*, *Coxsackie B*, *Herpes virus hominis*, *Cytomegalovirus* (nalezený v restenózách karotických tepen). Byly zjištěny zvýšené titry proti *Chlamydia pneumoniae* u mužů s ICHS. Séropozitivita protilátek proti *Chlamydia pneumoniae* byla zjištěna až u 80-85% pacientů s aterosklerotickým postižením (22).

O tom, že infekční agens mohou být negativním jevem pro rozvoj aterosklerotických změn, svědčí vztah C-reaktivního proteinu (CRP) a ICHS. Zvýšené hladiny CRP byly nalezeny u nemocných s chronickou infekcí *Chlamydia pneumoniae* a u pacientů s chronickou gastritidou způsobenou *Helicobacter pylori*. Vztah byl prokázán k ICHS. Hodnoty CRP korelují též s teplotou aterosklerotického plátu (aktivita plátu).

Vzhledem k četnosti rizikových faktorů je jasné, že je třeba pečlivě léčit; farmakologicky i nefarmakologicky; jednotlivé rizikové faktory. Léčba u nemocných s vysokým individuálním rizikem je založena na léčbě poruch metabolismu tuků, arteriální hypertenze, diabetes mellitus, či poruchy glukózové tolerance. S ohledem na celou škálu faktorů, které ovlivňují chování aterosklerotické léze, je třeba do léčby zahrnout i sanaci zánětlivých ložisek, protože formace aterosklerotického plátu je dána hlavně částicemi LDL-cholesterolu, jeho nestabilita však může být výrazně ovlivněna nejen chemickými, ale i infekčními faktory (23).

2.4. PATOFYZIOLOGIE ATEROSKLERÓZY

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

Četná pozorování u lidí i živočichů vedla k formulaci hypotézy o reakci na poškození, která původně předpokládala, že prvním krokem v ateroskleróze je poškození endotelu. Nejnovější verze této hypotézy spíše upřednostňuje vznik a rozvoj endoteliální dysfunkce před pouhým poškozením endotelu (24).

2.4.1. Schéma aterogeneze

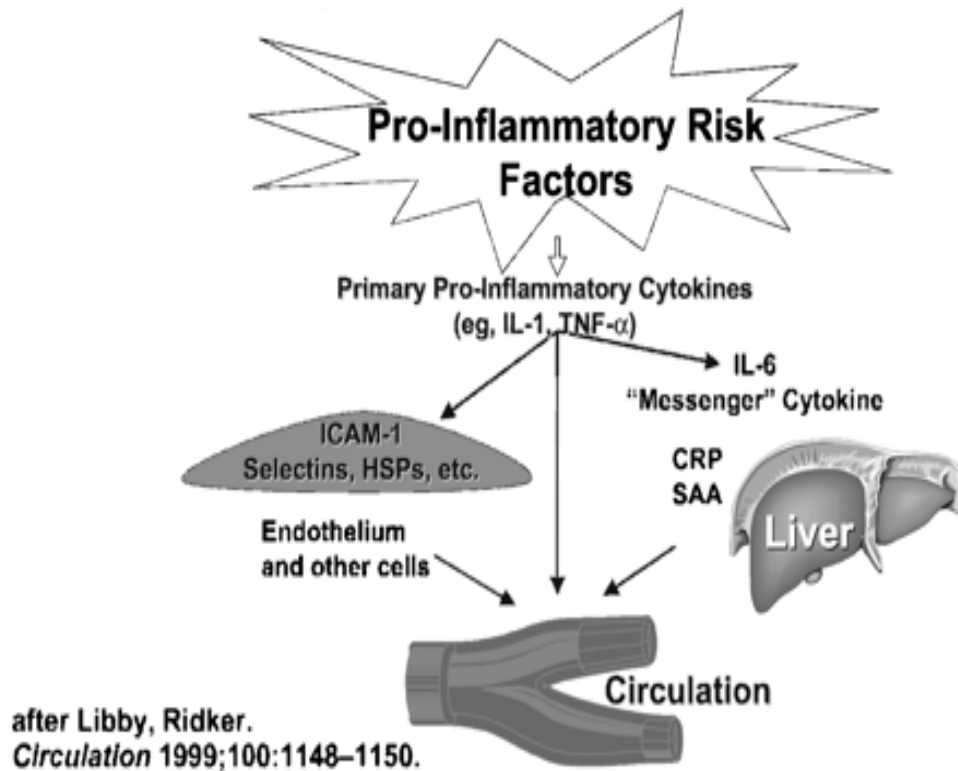
Leukocyt má tendenci rolovat po endotelu. Dochází k tomu prostřednictvím vzájemného kontaktu molekul selektinů na endotelové buňce a oligosacharidových molekul na leukocytech. Následuje pevná adheze leukocytu na endotel díky molekulám z řady imunoglobulinů VCAM-1 a ICAM-1. Vazebnou složku tvoří integriny,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

Určitá místa arterií, jako jsou bifurkace a oblouky, způsobují charakteristické změny v toku krve. Změny v krevním průtoku se zdají být rozhodující v určení, která místa cév mohou být náchylná k tvorbě lézí. Pohyb a adheze monocytů a T-buněk na

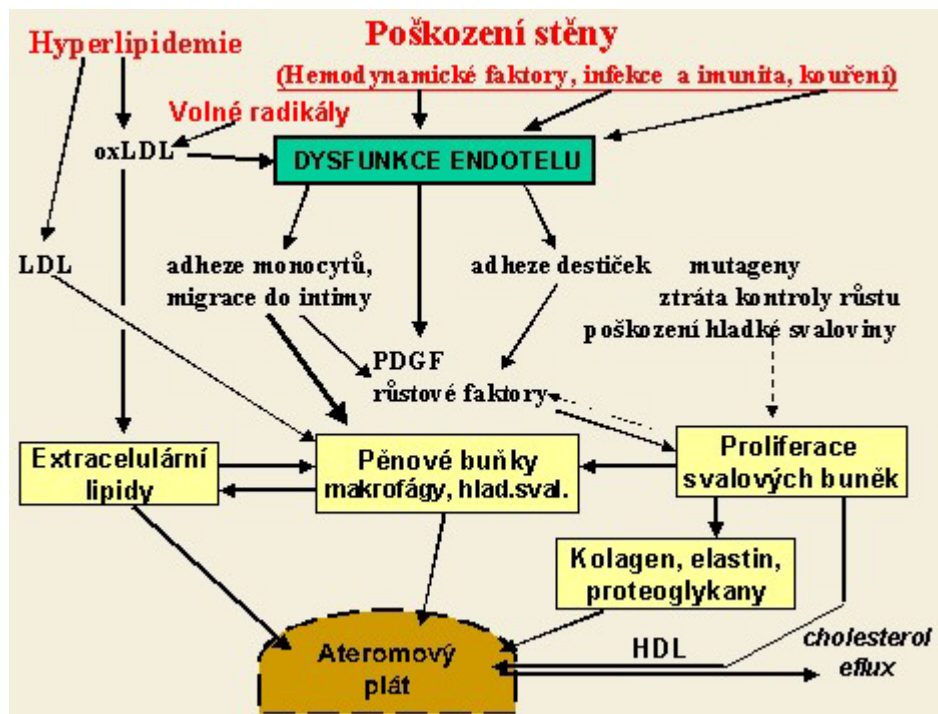
těchto místech je výsledkem up-regulace adhezních molekul jak na endotelu, tak i na leukocytech.

Endoteliální dysfunkce vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti endotelu. Zvyšuje se tak adhezivita (s přičiněním leukocytů a krevních destiček) i propustnost (permeabilita) endotelu. Endotel má tedy spíše koagulační než antikoagulační schopnosti a vytváří vazoaktivní molekuly, cytokiny a růstové faktory. Pokud není zánětlivá odpověď účinně kompenzována a nejsou odstraněny napadající agens, může proces dále pokračovat. Takto stimuluje zánětlivá odpověď migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny, ty se prolínají s oblastí zánětu a vytváří intermediární (střední) lézi. Pokud tato reakce pokračuje trvale, může způsobit ztluštění stěny tepny, které je později kompenzováno postupnou dilatací, tudíž průsvit cévy zůstává ještě nezměněn (25).

Odpověď je dále způsobena a usměrňována makrofágy vzniklými z monocytů a specifickými subtypy T-lymfocytů. Aktivace těchto buněk vede k uvolnění hydrolytických enzymů, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, které způsobují další poškození a případně vedou k místní nekróze. Akumulace mononukleárních buněk, migrace a proliferace buněk hladké svaloviny a vznik fibrotické tkáně vedou k dalšímu zvětšení a restrukturalizaci léze. Ta začíná být pokryta vazivovým krytem (čepičkou), který překrývá jádro (je tvořeno lipidovou a nekrotickou tkání) a vzniká tzv. komplikovaná léze. V tomto okamžiku již céva dále nemůže kompenzovat tuto situaci dilatací, vyklenuje se do lumen cévy a omezuje krevní průtok (26).



Obr. 3: Patofyziologie zánětlivého procesu



Obr. 4: Schéma mechanismu rozvoje aterosklerózy

2.4.2. Lipoproteiny

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

LDL je hlavní příčinou poškození endotelu a pod ním ležící hladké svaloviny. LDL může být modifikován oxidací, glykací u diabetes mellitus, agregací a spojením s proteoglykany nebo včleněním do imunitních komplexů. Když jsou částice LDL zachyceny v arterii, mohou projít progresivní oxidací a být pohlceny makrofágy a to díky specifickým (scavengerovým) receptorům na povrchu těchto buněk. Pohlcení vede ke vzniku lipidových peroxidů a usnadňuje nahromadění esterů cholesterolu. Jakmile je LDL modifikován a pohlcen makrofágy, mění se na pěnové buňky. Odstranění modifikovaného LDL je důležitou součástí úvodní ochranné úlohy makrofágů v zánětlivé odpovědi a minimalizuje účinek modifikovaného LDL na buňky endotelu a hladké svaloviny. Oxidovaný LDL je chemotaktický pro další monocyty a může regulovat kolonie stimulační faktor makrofágů a monocytní chemotaktický protein produkovaný buňkami endotelu. Rozšiřuje tedy zánětlivou odpověď vstupem nových monocytů do lézí (27).

Zánětlivé mediátory (např. TNF- α , interleukin-1 a mikrofág-kolonie stimulující faktor) zvyšují vazbu LDL na endotel a hladkou svalovinu a zvyšují transkripci genu receptoru pro LDL.

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

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

2.4.3. Monocyty

Monocyty, prekurzory makrofágů, jsou přítomny v každé fázi aterogeneze. Makrofágy produkují cytokiny, chemokiny, molekuly regulující růst, metaloproteinázy a další hydrolytické enzymy. Vznik a množení mononukleárních buněk v lézích závisí na faktorech, jakými jsou makrofág-kolonie stimulující faktor a granulocyty-makrofág kolonie stimulující faktor. Vystavení makrofág-kolonie stimulujícímu faktoru umožňuje makrofágům přežít in vitro a pravděpodobně se i rozmnožovat v lézích. Naopak některé zánětlivé cytokiny (např. interferon-gama aktivovaný makrofágy) jim umožňují průběh programované buněčné smrti (apoptózy) (28).

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

Aktivované makrofágy zastupují třídu II histokompatibilních antigenů (HLA II), které umožňují prezentovat antigeny T-lymfocytům. T-buňky jsou aktivovány,

když naváží antigen vyprodukovaný makrofágy. Aktivace T-buňky má za následek sekreci cytokinů včetně interferonu-gama a TNF- α a β , které zesilují zánětlivou odpověď. Buňky hladké svaloviny v lézích mají také na svém povrchu molekuly třídy HLA II (pravděpodobně vytvořené interferonem-gama) a mohou tedy vytvářet antigeny T-buňkám (29).

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

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

2.4.4. Destičky

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

Destičky jsou důležité v udržení cévní integrity a při ochraně proti spontánnímu krvácení. Aktivované destičky se mohou akumulovat na stěnách arterií a doplňovat další destičky do rostoucího trombu (30).

2.4.5. Nestabilita a ruptura plátů

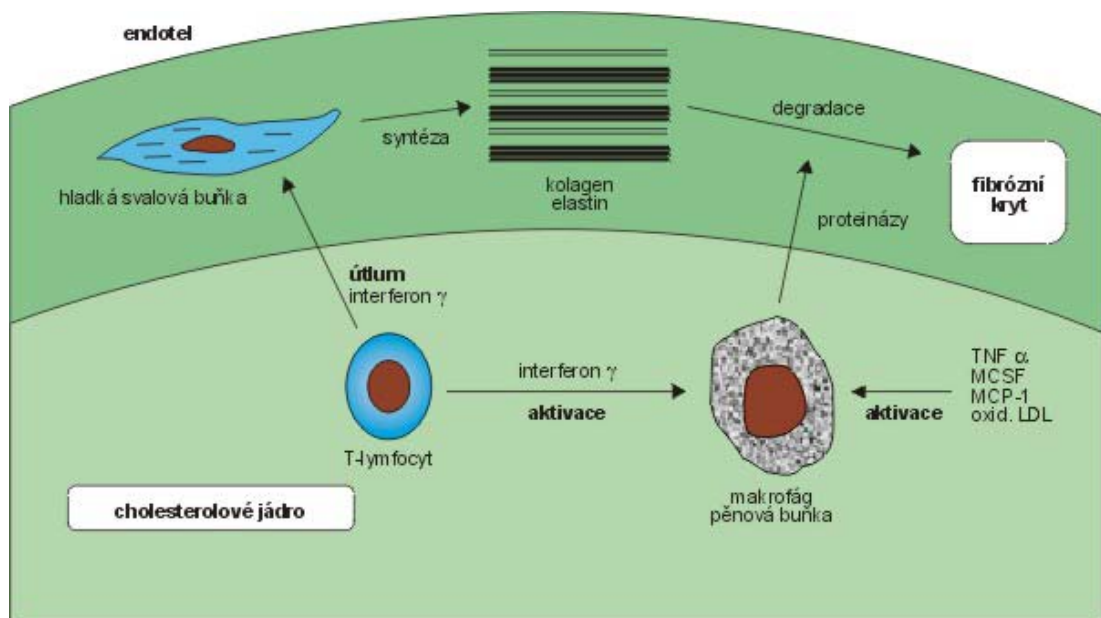
Ruptura plátů a trombóza jsou významnými komplikacemi, které vedou k nestabilním koronárním syndromům.

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

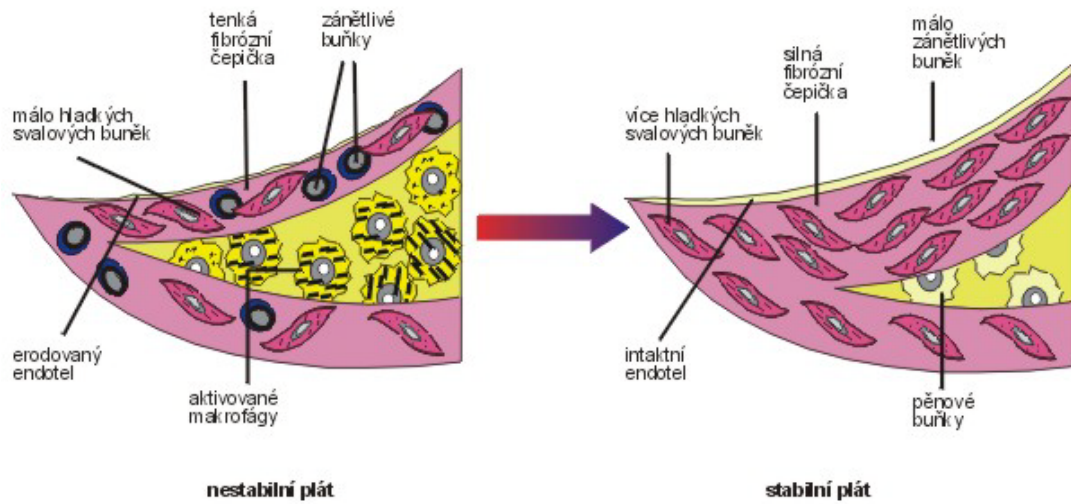
Aterosklerotické pláty můžeme rozdělit na stabilní a nestabilní. Stabilní plát má nízký obsah tuků a nemá tendenci k ruptuře s vytvořením následné trombózy, která pak obturuje cévní lumen. Nestabilní plát je bohatý na lipidy a při okrajích často praská. Dává tak vzniknout trombóze, která se projeví akutní cévní příhodou (31).

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

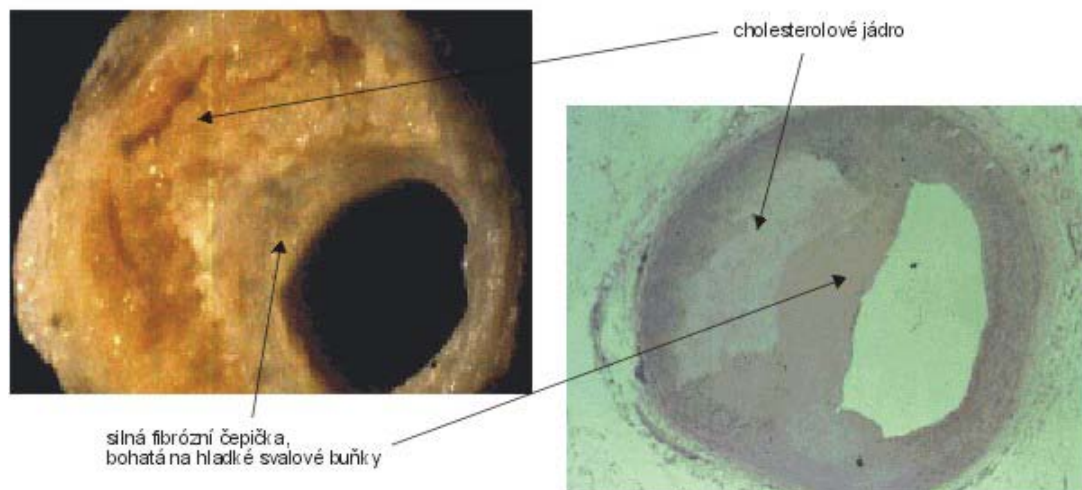
Následkem ukládání plátů je zúžení cévního průsvitu, které může vést k ischemii. Dalšími následky tvorby plátů jsou ztuhnutí cévní stěny (kalcifikace), vznik trombů, které uzavírají zbylý průsvit a mohou způsobit periferní embolizaci, dále krvácení do plátů a do cévní stěny. Takto poškozená stěna může mimo jiné povolit tlaku a dokonce prasknout, takže dojde k nebezpečnému krvácení do okolní tkáně, např. z aorty nebo z mozkových cév (32).



Obr. 5: Zjednodušené schéma tvorby a degradace fibrózního krytu aterosklerotického plátu



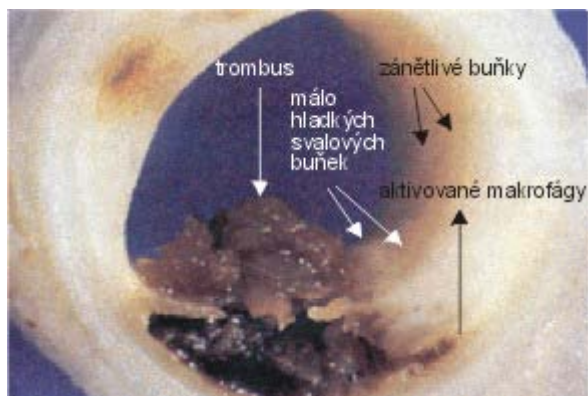
Obr. 6: Schéma stabilního a nestabilního aterosklerotického plátu



Obr. 7: Stabilní aterosklerotický plát



Obr. 8: Nestabilní aterosklerotický plát



Obr. 9: Ruptura aterosklerotického plátu

2.5. BUNĚČNÉ ADHEZIVNÍ MOLEKULY – VCAM-1

Buněčné adhezivní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Adhezivní molekuly se účastní řízení řady fyziologických dějů jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciace, hojení ran, či obnova tkání. Uplatňují se ale také při patologických procesech, kde se např. podílejí na interakcích mezi složkami imunitního systému (33). Podle strukturních vlastností je můžeme rozdělit na 4 základní skupiny. Jsou to selektiny, integriny, immunoglobulinová skupina a kadheriny.

Imunoglobulinová skupina adhezivních 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. Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce) (34). Patří sem celá řada adhezivních molekul jako antigenně specifické

receptory T a B-lymfocytů TCR, BCR, koreceptory T-lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1) a platelet cell adhesion molecule-1(PECAM-1).

2.5.1. Struktura a funkce VCAM-1

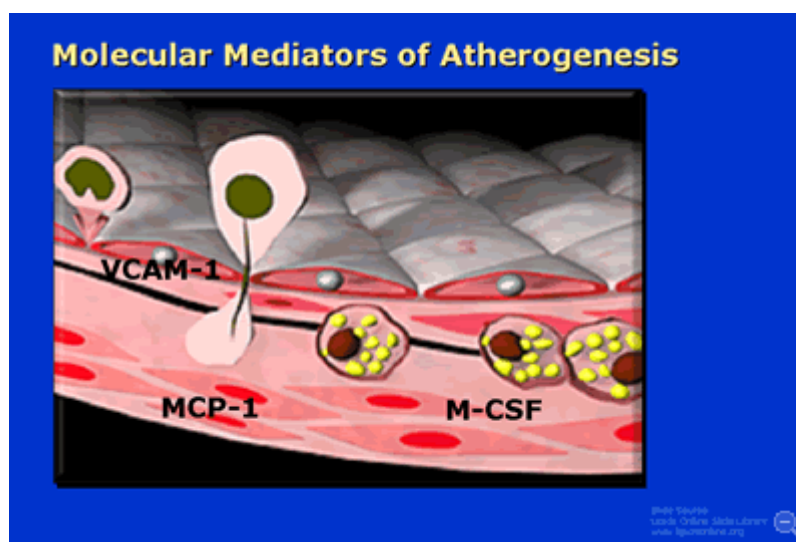
Z hlediska struktury je tato adhezivní molekula transmembránový glykoprotein obsahující N-konec, sérii Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. VCAM-1 má 7 extracelulárních domén, přičemž domény 1 a 4 jsou specifická vazebná místa pro vazbu $\alpha_4\beta_1$ integrinu(VLA-4) a někdy pro vazbu $\alpha_4\beta_7$ integrinu (35). VCAM-1 se podílí na stabilizaci vazby leukocytů k endotelu a podílí se tedy na jejich diapedezi a zřejmě navíc selektivně vychytává mononukleární leukocyty, protože ty na rozdíl od neutrofilů exprimují α_4 integriny (36).

2.5.2. Exprese VCAM-1

VCAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami (37). Studie na králících a myších prokázaly, že VCAM-1 je endoteliálními buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T-lymfocytů v oblastech, které jsou predispoziční ke vzniku lézí, přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především shear stresem (38). U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 exprimován především endoteliálními i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 exprimován většinou buněk, které

se nacházejí v intimě cév. Přesto se ukazuje, že VCAM-1 je exprimován především v oblastech výskytu lézí.

Exprese této adhezivní molekuly je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Hypercholesterolemie a oxidované LDL a diabetes zvyšují expresi VCAM-1 (39). Také kouření, hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi VCAM-1 (40). Exprese molekuly je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- α nebo IL-1.



Obr. 10: Molekulové markery aterogeneze

2.6. MCP-1 (MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1)

Chemoatrakční protein pro monocyty (MCP-1) je člen rodiny proinflamatorních cytokinů, tzv. chemokinů (41). 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 neutrofilů i monocytů, zatímco MCP-1 přitahuje pouze monocytů a interleukin-8 zase pouze neutrofilů.

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 (42)

2.6.1. 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 příležitostným hladkosvalové buňky, zatímco endoteliální buňky přispívají mnohem méně (43). 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 (42).

2.7. STATINY

Statiny jsou dnes běžně indikovanými léky u pacientů s komplikacemi aterosklerózy a stojí po boku „základním“ kardiologickým preparátům, jakými jsou např. betablokátory, kyselina acetylsalicylová nebo ACE inhibitory. Pro svou účinnost a minimum nežádoucích účinků se řadí k nejčastěji předepisovaným hypolipidemikům. Léčba statiny se v posledních několika letech výrazně rozšířila. Před deseti lety byly statiny vyhrazeny nejtěžším formám familiárních hypercholesterolémii, dnes jsou indikovány u osob, které mají vedle dalších kritérií zcela normální nebo jen hraničně vyšší hladiny sérového cholesterolu. Statiny patří mezi preparáty, které by zřejmě neměly chybět u žádného pacienta s ICHS. Stále častěji se s nimi setkáváme u diabetiků a osob s metabolickým syndromem, kde jsou většinou součástí kombinačních hypolipidemických režimů (23).

Hlavní indikací statinů zůstává hypercholesterolemie nebo smíšená dyslipidémie s převahou hypercholesterolemie u pacientů s manifestní aterosklerózou nebo ve vysokém riziku aterotrombotických komplikací (44).

Statiny jsou tedy indikovány především u nemocných s izolovanou hypercholesterolémií včetně heterozygótů familiární hypercholesterolemie. Uplatnění však mohou nalézt i v terapii smíšené hyperlipoproteinémie, účinek léčby statiny je optimální tehdy, jestliže vstupní hodnota triglyceridů nepřesahuje hodnotu 4 mmol/l. Při vyšších hodnotách triglyceridů statiny v monoterapii selhávají a je třeba užít kombinaci s fibráty (někteří autoři doporučují vysokou dávku statinů v monoterapii). V terapii homozygótů familiární hypercholesterolemie statiny bohužel obvykle selhávají. Pozitivních výsledků bylo dosaženo pouze s vysokou dávkou atorvastatinu (45).

V roce 2003 byla publikovaná rozsáhlá metaanalýza několika desítek studií, ze které vyplývá, že terapie statiny snižuje riziko kardiovaskulárních příhod o 61% a riziko ischemické cévní mozkové příhody o 17%. K dispozici je však řada důkazů pro podávání statinů i v jiných situacích než je dlouhodobá prevence komplikací aterosklerózy, např. pozitivní přínos časné zahájené terapie statiny u akutního koronárního syndromu-časně zahájená hypolipidemická léčba vedoucí k „dramatickým“ poklesům koncentrací LDL-cholesterolu dokonce výrazně pod uznávané cílové hodnoty přináší nemocným s akutním koronárním syndromem významné snížení rizika (46).

Statiny se nepodávají pouze v monoterapii, ale jsou i důležitou součástí kombinované léčby. Dlouhou dobu byly užívány v kombinaci s pryskyřicemi, nyní se do popředí při snaze o maximální snížení LDL-CH dostává kombinace s ezetimibem. Další kombinace s fibráty nachází místo v terapii smíšených hyperlipidemií. S rostoucím významem metabolického syndromu se kromě kombinace statin+fibrát uplatní i kombinace statin+niacin.

V klinické praxi jsou u nás používány tyto statiny: lovastatin, pravastatin, simvastatin, atorvastatin, fluvastatin a rosuvastatin. Největší pokles LDL byl zaznamenán u atorvastatinu(60%) a simvastatinu(40%). TAG nejúčinněji snižuje fluvastatin(31%), po kterém také nejvíce stoupá koncentrace HDL (47).

2.7.1. Mechanismus účinku statinů

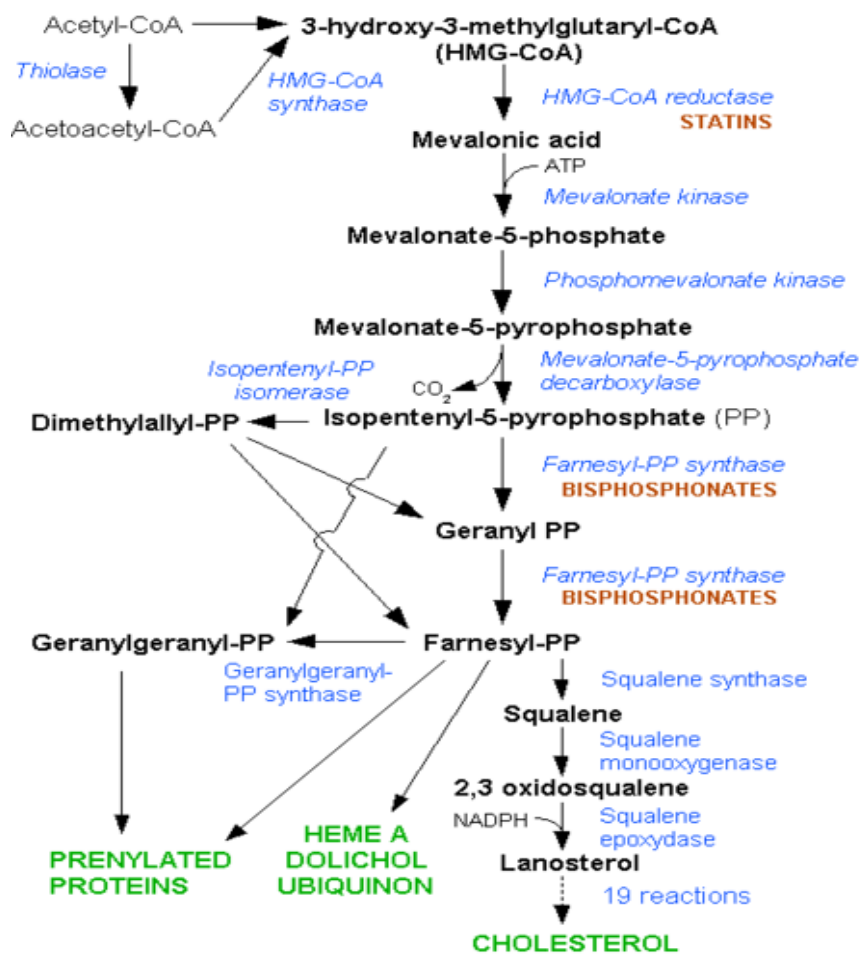
V roce 1976 zjistili Endo a spol., že produkt plísně *Penicilium citricum* snižuje syntézu cholesterolu kompetitivní inhibicí klíčového enzymu biosyntézy cholesterolu 3-HMG-CoA reductázy(statiny tzv. I.generace-lovastatin, simvastatin a pravastatin jsou produkty plísní, II.generace-fluvastatin je semisyntetický racemát a III.

generace-atorvastatin a cerivastatin jsou již plně syntetické). Tento enzym katalyzuje přeměnu 3HMG-CoA na mevalonát, což je jeden z prvních kroků biosyntézy cholesterolu. Snížením nitrobuněčné syntézy cholesterolu se buňka dostává do situace deficitu cholesterolu, což vede ke zvýšené expresi LDL receptorů na buněčné membráně všech buněk, především ale hepatocytů. Zvýšená syntéza a zvýšení aktivity LDL receptorů umožňují urychlené vychytávání LDL partikulí z plazmy (48).

Hypolipidemický účinek statinů je poměrně dobře objasněn, zatímco dosud není jednoznačně vysvětlen mechanismus, jakým statiny snižují koncentraci triglyceridů. Předpokládá se především snížení syntézy VLDL v játrech, dalším možným mechanismem je zvýšení clearance a odbourávání VLDL cestou LDL receptorů, jejichž počet se na povrchu hepatocytů zvyšuje. Chylomikronové remnanty obsahují totiž stejně jako VLDL apolipoprotein E, který je schopen navázat lipoproteinovou částici na LDL receptor.

Podle výsledků mnoha prací zabývajících se vlivem statinů na parametry tukového metabolismu lze shrnout a uvést, že léčba statiny snižuje koncentrace celkového cholesterolu o 20-30%, LDL-cholesterolu o 25-40%, triglyceridů o 5-20% a současně mírně zvyšuje koncentrace HDL-cholesterolu o 5-10%. Těmto změnám odpovídají i změny ve spektru apolipoproteinů-významný pokles koncentrace apolipoproteinu B a mírný vzestup hladiny apolipoproteinu A-I.

Co se týče změny zastoupení aterogenních „malých denzích LDL částic“ a velkých neaterogenních LDL částic, donedávna platil názor, že statiny se chovají vesměs neutrálně a poměr těchto částic se nemění. Teprve v nedávné době se prokázalo, že u nemocných se smíšenou HLP dochází ke snížení výskytu aterogenních „small dense LDL“ po léčbě statiny (49).



Obr. 11: Mechanismus účinku statinů

2.7.2. Pleiotropní účinky statinů

Statiny jsou schopny ovlivňovat také řadu dějů, které však nesouvisí s hladinami lipidů. Tyto účinky statinů jsou označovány jako nelipidové nebo pleiotropní. Tento tzv. nehypolipidemický efekt vede ke snížení nejen koronární a kardiovaskulární, ale i celkové mortality (50). Jedná se zejména o:

- ▶ inhibici proliferace hladkých svalových buněk cévní stěny
- ▶ úpravu endoteliální dysfunkce

- ▶ stabilizaci aterosklerotického plátu
- ▶ protizánětlivé působení
- ▶ snížení trombotické pohotovosti

Za zcela nelipidový účinek statinů je třeba považovat jejich antiagregační působení, které je nejvíce vyjádřeno u pravastatinu. Druhým typicky nelipidovým účinkem statinů je inhibice proliferace hladkých svalových buněk ve stěně cévní. Tento účinek je nejvíce vyjádřen u fluvastatinu a simvastatinu, ale i u lovastatinu, naopak u pravastatinu prakticky chybí. Zatímco většina autorů považuje inhibici proliferace myocytů za pozitivní efekt léčby, který působí protiterogenně, objevují se i názory zcela opačné. Ty považují proliferaci myocytů za významný faktor při stabilizaci plátů a pozitivní vliv inhibice proliferace zpochybňují.

Po podání statinů (původní pozorování je popsáno po lovastatinu, později byly publikovány práce se všemi statiny v klinické praxi) dochází ke zlepšení endoteliální funkce, konkrétně ke zlepšení koronární vazodilatace po stimulačním podnětu (např. po podání acetylcholinu). Tento účinek však může být vysvětlen jistě i jen hypocholesterolemizujícím efektem statinu.

Po léčbě statiny dochází ke stabilizaci aterosklerotického plátu. Tento efekt je však opět snadno vysvětlitelný právě snížením hladiny cholesterolu (51).

Velmi diskutovanou otázkou je možný pozitivní účinek statinů na srdeční selhání. Potenciální přínos statinů pro nemocné s chronickým srdečním selháním souvisí velmi pravděpodobně s výše popsány lipidovými i nelipidovými účinky této skupiny léků.

2.7.3. Atorvastatin

Atorvastatin patří do skupiny hypolipidemik, která nejvýznamněji snižují celkový a LDL-cholesterol. Je indikován u nemocných s izolovanou hypercholesterolémií a se smíšenou hyperlipoproteinémií s převahou hypercholesterolémie a jen mírným zvýšením triglyceridů. Kromě monoterapie je používán v kombinační léčbě s fibráty, s inhibitory vstřebávání cholesterolu (ezetimibem), i s pryskyřicemi (52).

Atorvastatin je účinné hypolipidemikum ze skupiny statinů. Ve srovnání s ostatními dostupnými statiny je jeho účinek srovnatelný nebo vyšší, incidence nežádoucích účinků je přitom srovnatelná s ostatními statiny (53). Z obvykle udávaných výsledků terapie statiny vybočují výsledky studií s atorvastatinem. Atorvastatinem dosahované poklesy celkového a LDL-cholesterolu odpovídají již při běžně užívaných dávkách (10 mg) vesměs nejvýraznějším změnám, zdůrazňována je také vysoká schopnost atorvastatinu snižovat koncentrace triglyceridů-výrazněji, než ostatní léky této skupiny. Již při obvyklých dávkách dochází k poklesu koncentrace triglyceridů okolo 20% (54).

2.7.3.1. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku atorvastatinu, stejně jako ostatních statinů, spočívá v selektivní kompetitivní inhibici 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductázy (HMG-CoA reductáza) (52). HMG-CoA reductáza je enzym zodpovědný za syntézu kyseliny mevalonové, která je výchozím metabolitem pro tvorbu cholesterolu de novo. Nedostatek cholesterolu v játrech vyvolaný inhibicí jeho novotvorby vede ke zmnožení receptorů pro LDL na povrchu jaterních buněk s následným zvýšením katabolismu LDL. Výše uvedeným mechanismem dochází po podání atorvastatinu k

výraznému snížení koncentrace celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a malých denzních částic LDL při signifikantním zvýšení koncentrace HDL-cholesterolu. Dále dosud ne zcela známým mechanismem výrazněji než ostatní statiny snižuje koncentrace triacylglycerolů. Mimo výše uvedené účinky atorvastatin (stejně jako ostatní inhibitory HMG-CoA reductázy) inhibuje destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor-PDGF), což vede ke snížení migrace makrofágů do subendoteliálního prostoru a ke snížení migrace a proliferace buněk hladké svaloviny a fibroblastů v subendoteliálním prostoru; následně pak dochází ke zlepšení funkce cévního endotelu. Atorvastatin má určité antitrombotické působení (snížení koncentrace komplexu trombin-antitrombin III, trombomodulinu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu) (55).

2.7.3.2. Nežádoucí účinky a interakce

Atorvastatin je ve většině případů dobře snášen, celkový výskyt nežádoucích účinků v kontrolovaných studiích byl velmi podobný jako u ostatních statinů. V převážné míře se jednalo o málo závažné nespecifické nežádoucí účinky, které obvykle neměly kauzální souvislost s terapií atorvastatinem (podobný výskyt byl po podávání placebo). Specifické nežádoucí účinky se objevily u méně než 5 % pacientů. Pouze u necelých 2 % pacientů bylo nutné terapii atorvastatinem přerušit z důvodů nežádoucích účinků. Nejčastěji se vyskytly gastrointestinální nežádoucí účinky, jako je plynatost (3 %), zácpa (2 %) nebo naopak průjem (1 %) a bolest břicha (1 %). Výskyt těchto nežádoucích účinků nepřevyšoval jejich četnost po podání placebo. Výskyt myalgií, případně dalších poruch muskuloskeletálního ústrojí (v průměru 2 %) nepřesahoval výskyt těchto nežádoucích účinků pozorovaný po podání ostatních

statinů (v průměru 3 %). Zvýšení hodnot kreatinfosfokinázy nad trojnásobek horní hranice normy se vyskytlo u 2,5 % pacientů (56).

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 myši 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 10 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 myši byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a byla provedena 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 Klinice gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice Hradec 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).

4.3. ELISA ANALÝZA

Analýza hladin MCP-1 a VCAM-1 v krevním seru 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).

4.4. 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.

4.5. IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a v části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm 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 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 napipetovány 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% H₂O₂ (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 ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ 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	

4.6. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ

Plocha velikosti barvení olejovou červení a endoteliální exprese VCAM-1 byla kvantifikována pomocí stereologických metod (57). Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μ 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 5 řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou olejové červeně, respektive VCAM-1 barvením v intimě cévy na jednu cévu (58). Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

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

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

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

Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

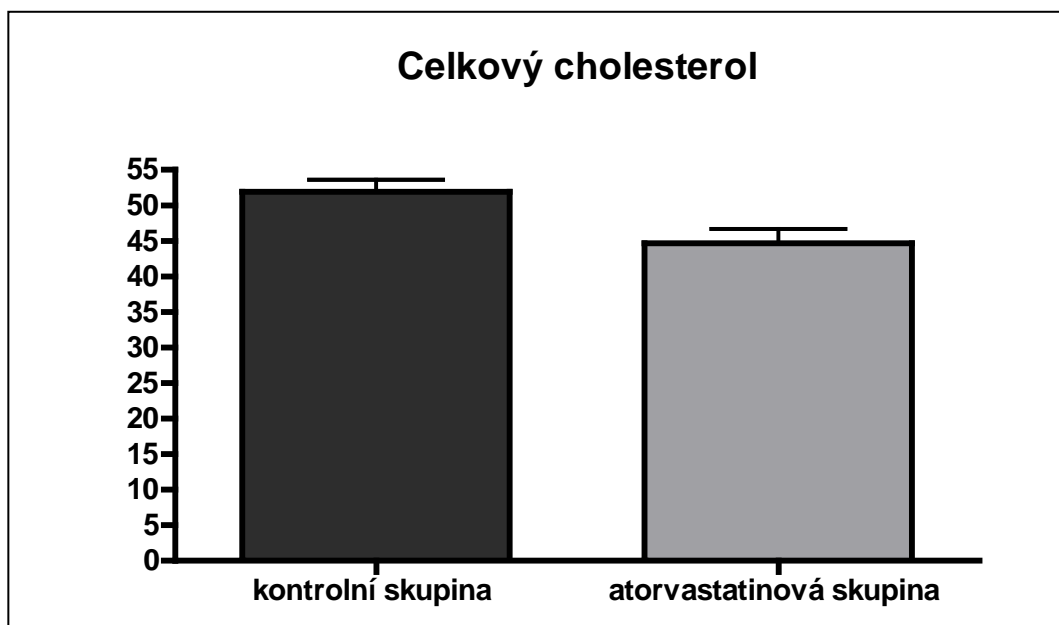
4.7. STATISTICKÁ ANALÝZA

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 $\alpha=0,05$.

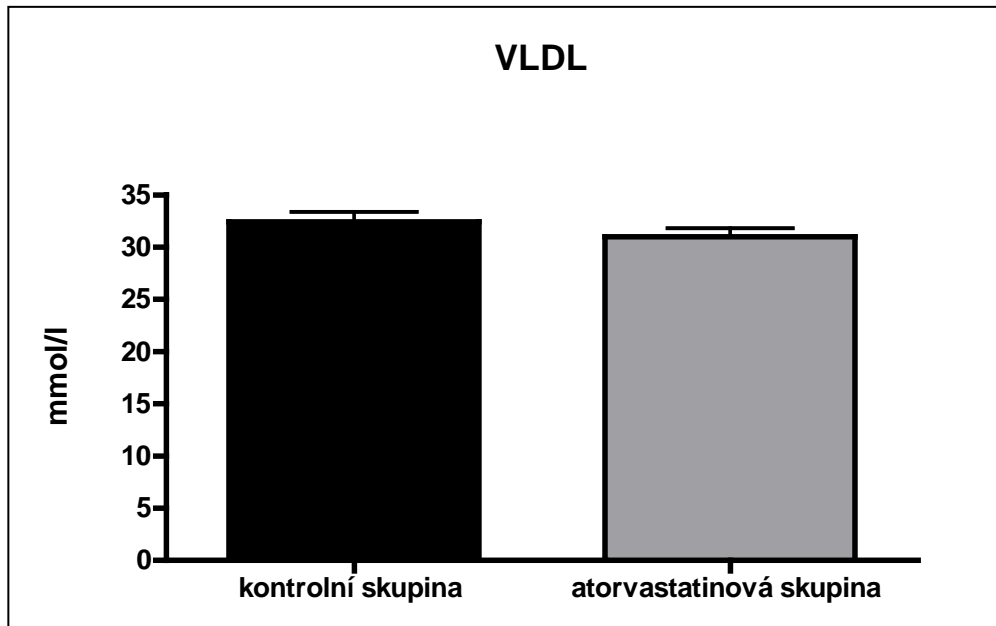
5. VÝSLEDKY

5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

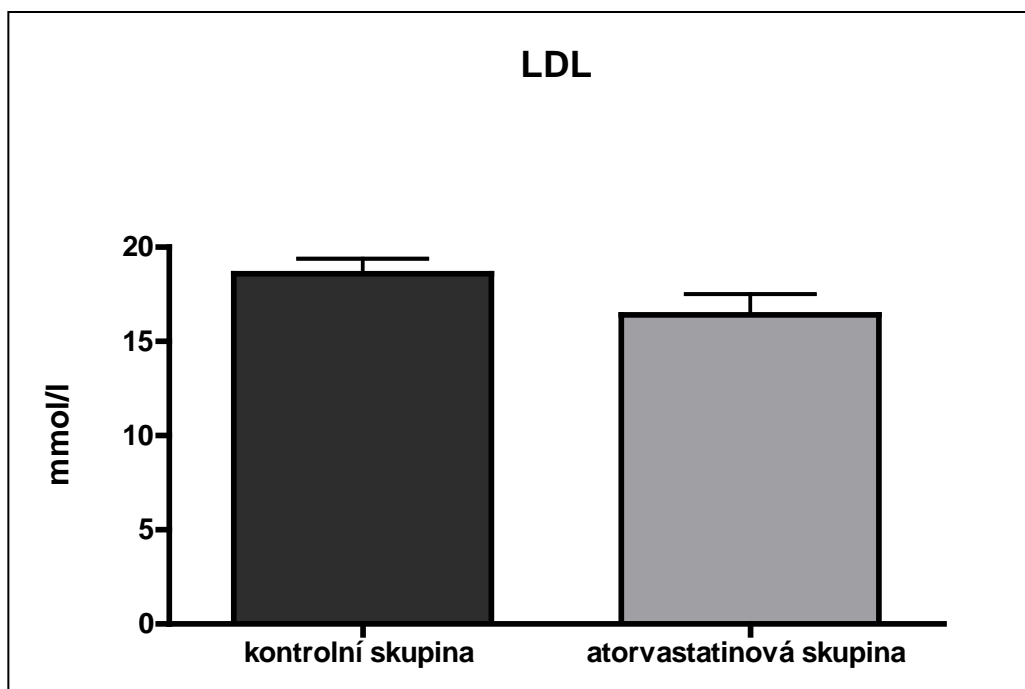
U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání 10 mg/kg atorvastatinu statisticky významně snížilo pouze hladiny celkového cholesterolu (graf 1). VLDL cholesterol, LDL cholesterol a TAG byly sníženy pouze mírně a statisticky nevýznamně (viz graf 2, 3, 5). Bylo ovšem zjištěno, že atorvastatin statisticky významně zvýšil hladiny HDL cholesterolu (viz graf 4).



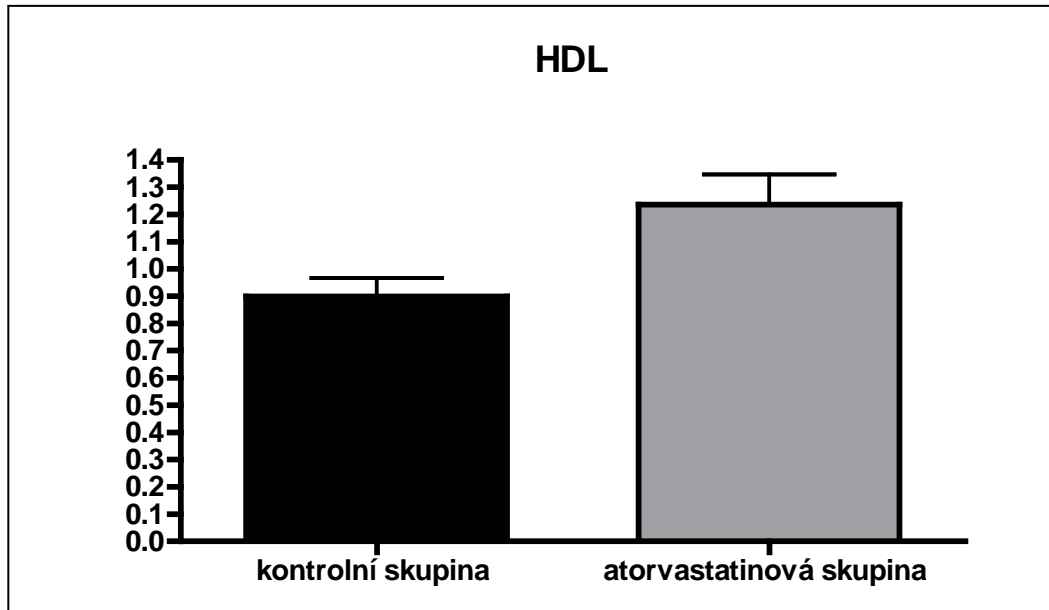
Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou ($^xP < 0,05$).



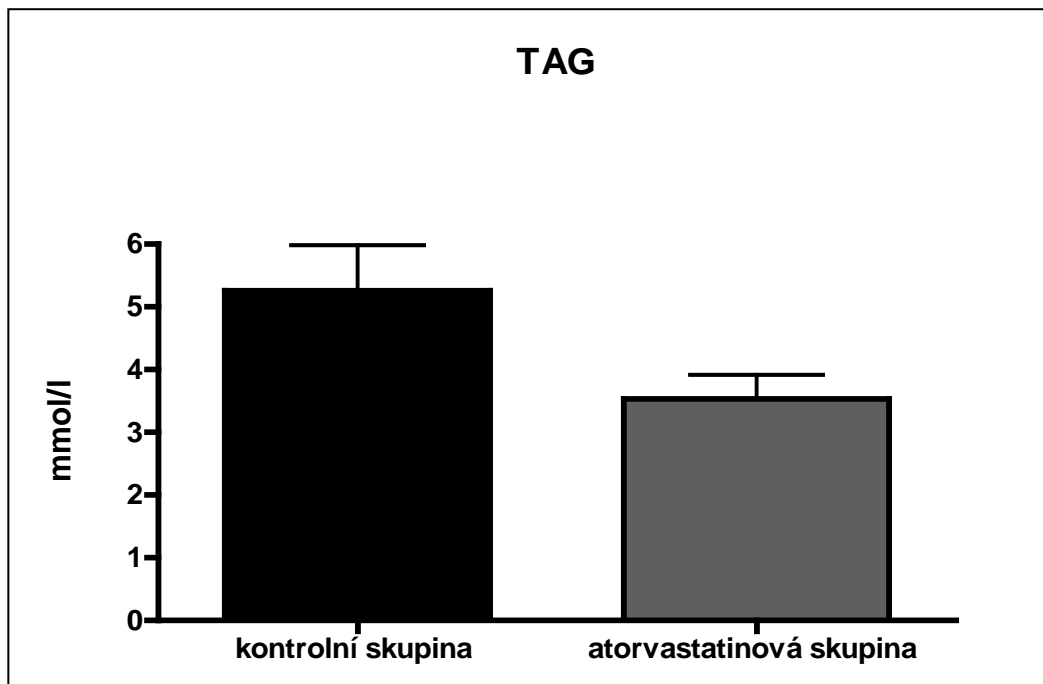
Graf 2: Hladiny VLDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu pouze mírně a nesignifikantně snížilo hladiny VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou.



Graf 3: Hladiny LDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu pouze mírně a nesignifikantně snížilo hladiny LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou.



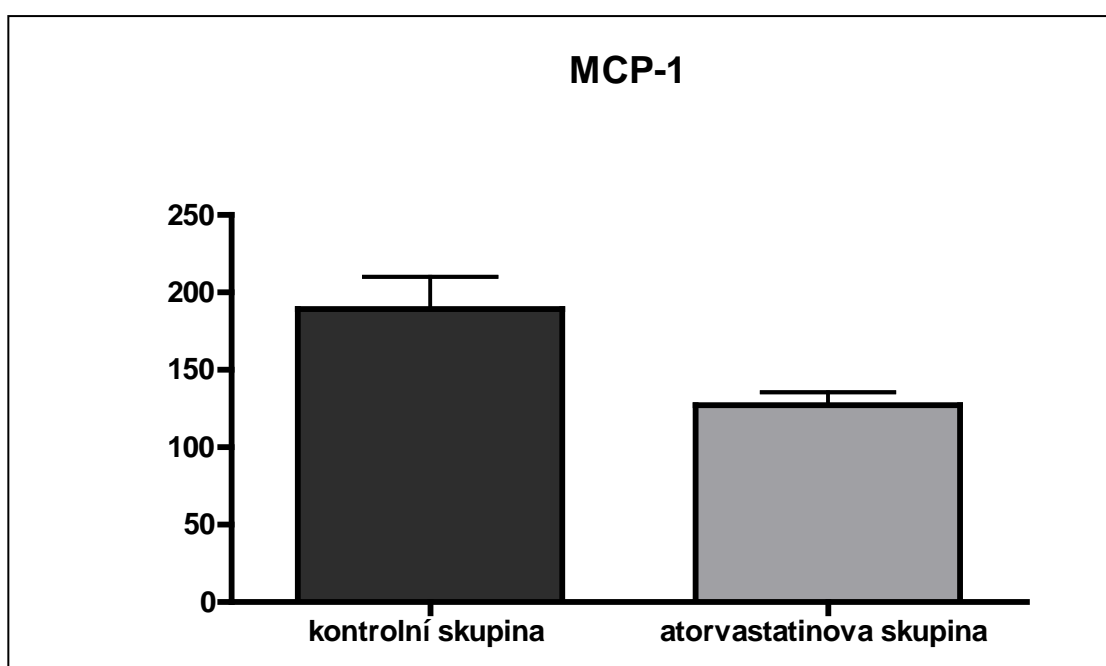
Graf 4: Hladiny HDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny HDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ($^xP < 0,05$).



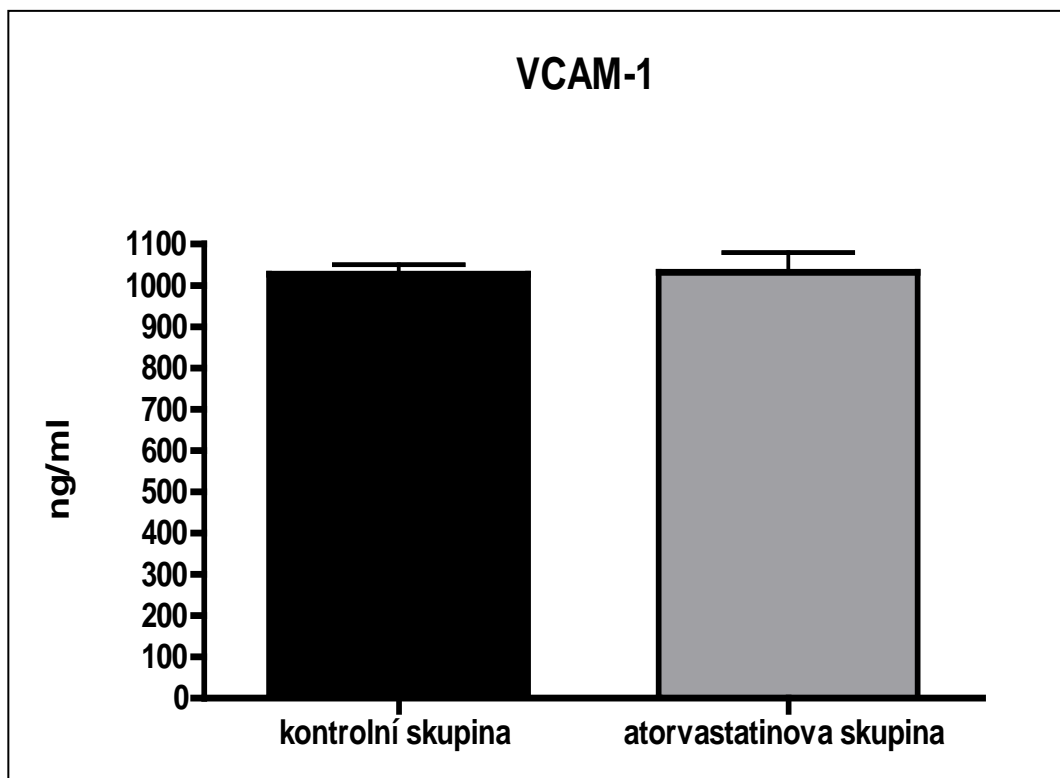
Graf 5: Hladiny triacylglycerolů u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu pouze mírně a nesignifikantně snížilo hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou.

5.2. ELISA ANALÝZA

Byla provedena analýza sérových koncentrací prozánětlivých markerů MCP-1 a VCAM-1. Hladina MCP-1 byla po podávání atorvastatinu snížena (graf 6). Naproti tomu koncentrace VCAM-1 v séru nebyla po podávání atorvastatinu nijak ovlivněna (graf 7).



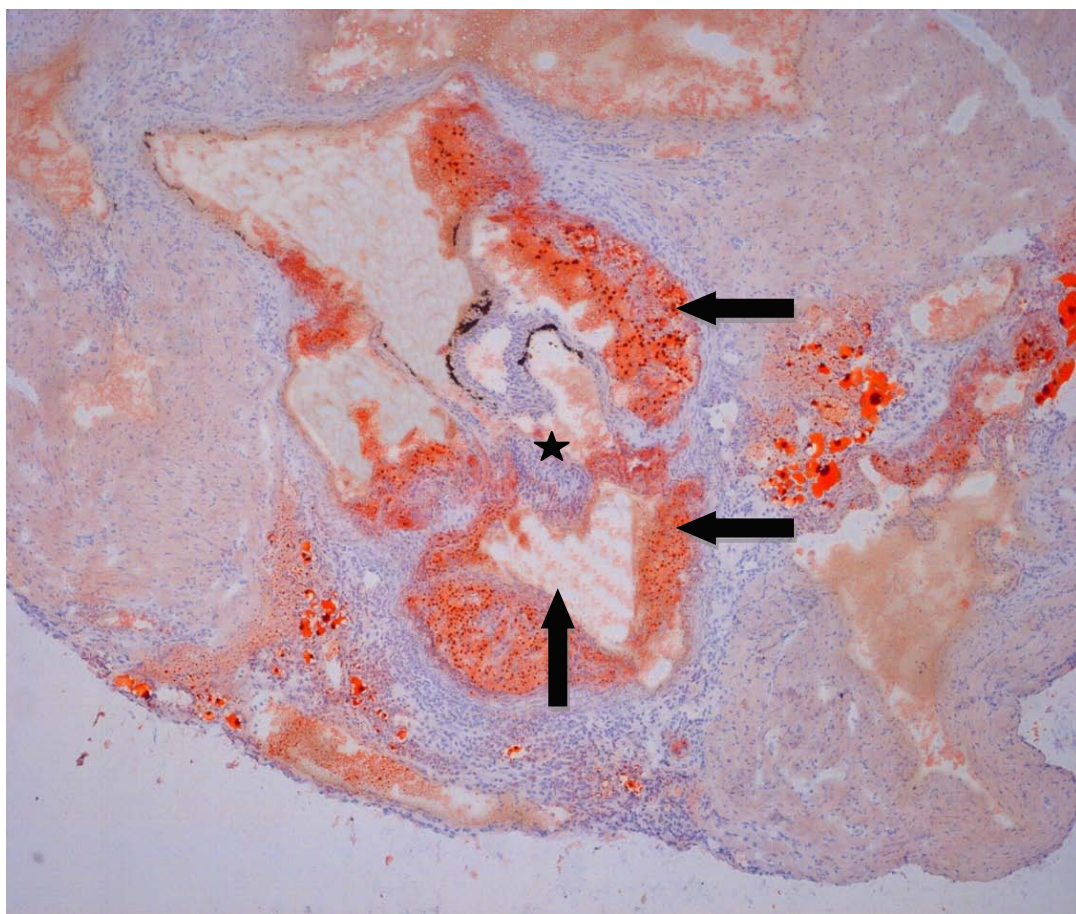
Graf 6: Hladiny MCP-1 u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Podávání atorvastatinu vedlo ke statisticky významnému snížení hladin MCP-1 v porovnání s kontrolní skupinou. ($xP < 0,05$).



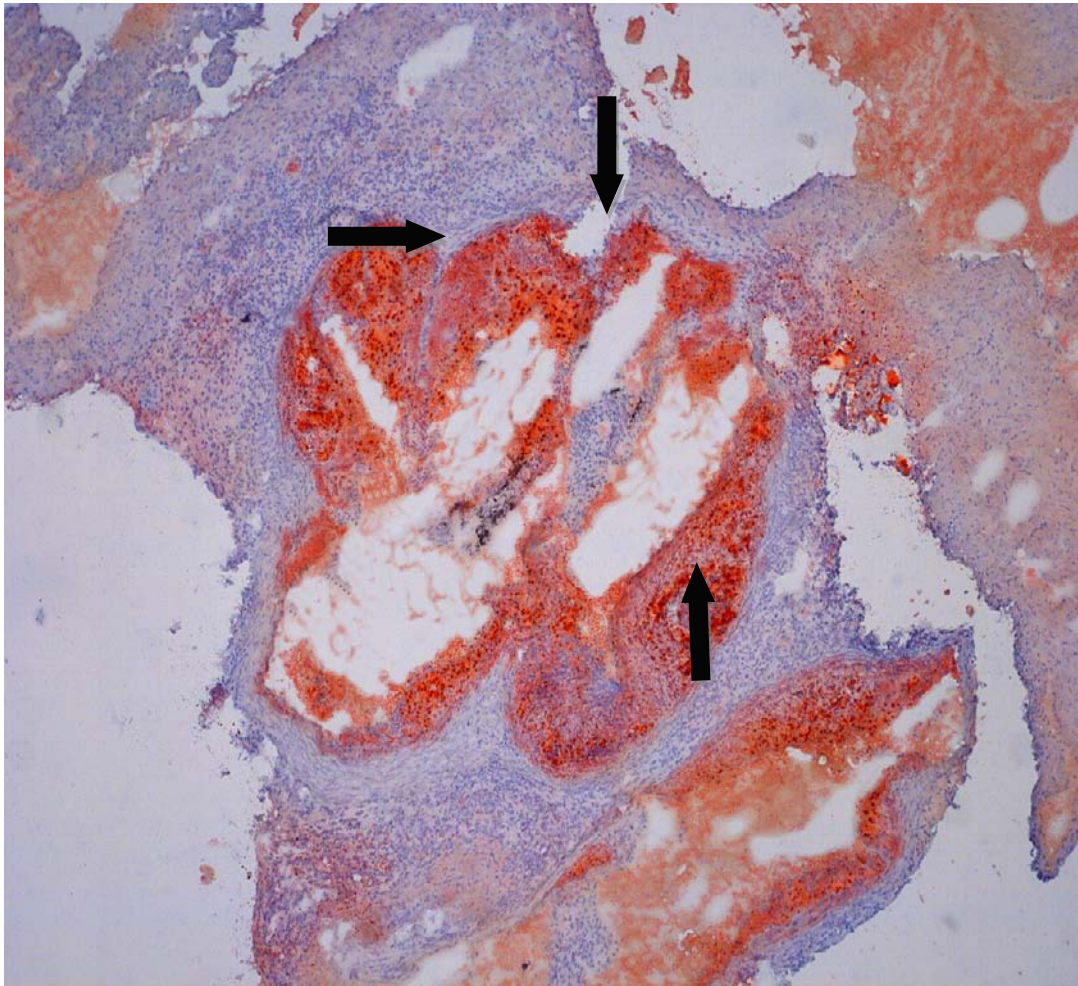
Graf 7: Hladiny VCAM-1 u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny VCAM-1 v porovnání s kontrolní skupinou.

5.3. 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 nevedlo ke změně intenzity barvení olejovou červení v aterosklerotických lézích.



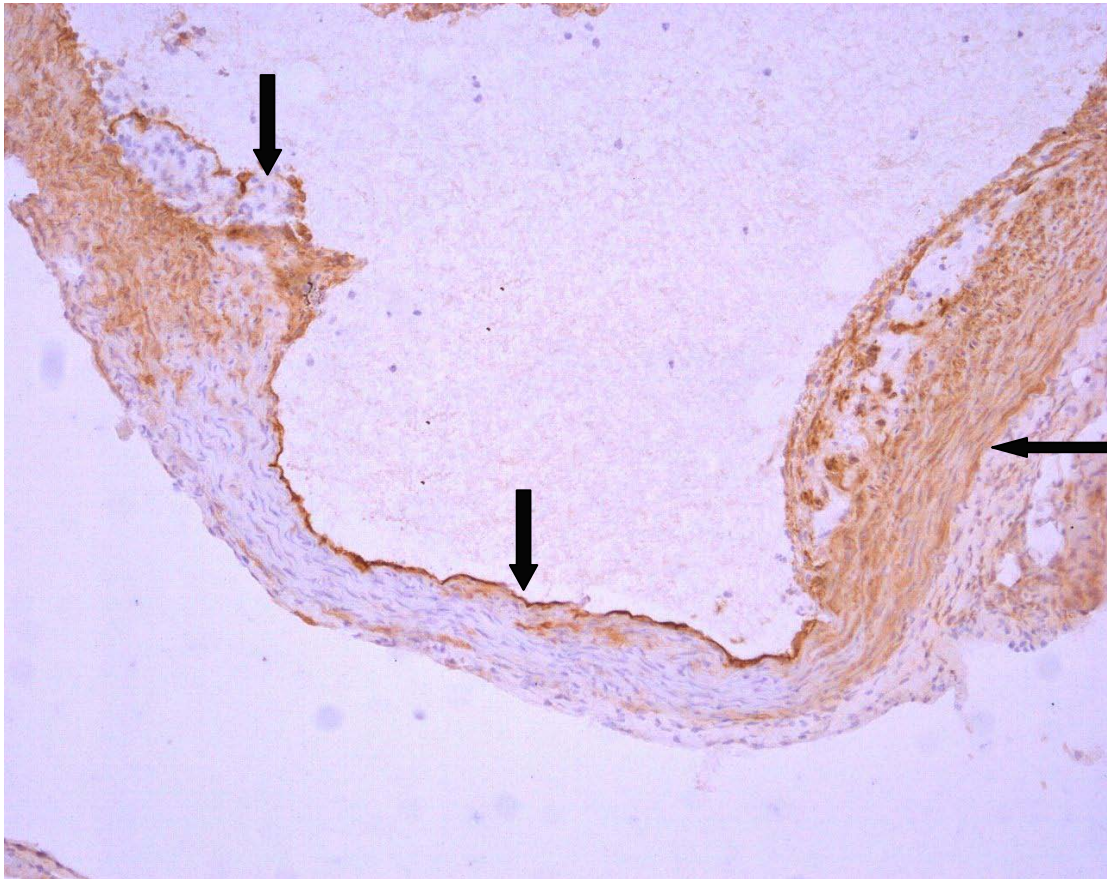
Obr. 12: Barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Zvětšení preparátu 40x.



Obr. 13: Barvení olejovou červení u atorvastatinové skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta společně s 100 mg/kg atorvastatinu. Šípky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní. Intenzita a plocha barvení olejovou červení se zdá být stejná jako u kontrolní skupiny. Zvětšení preparátu 40x.

5.4. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ VCAM-1 V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU

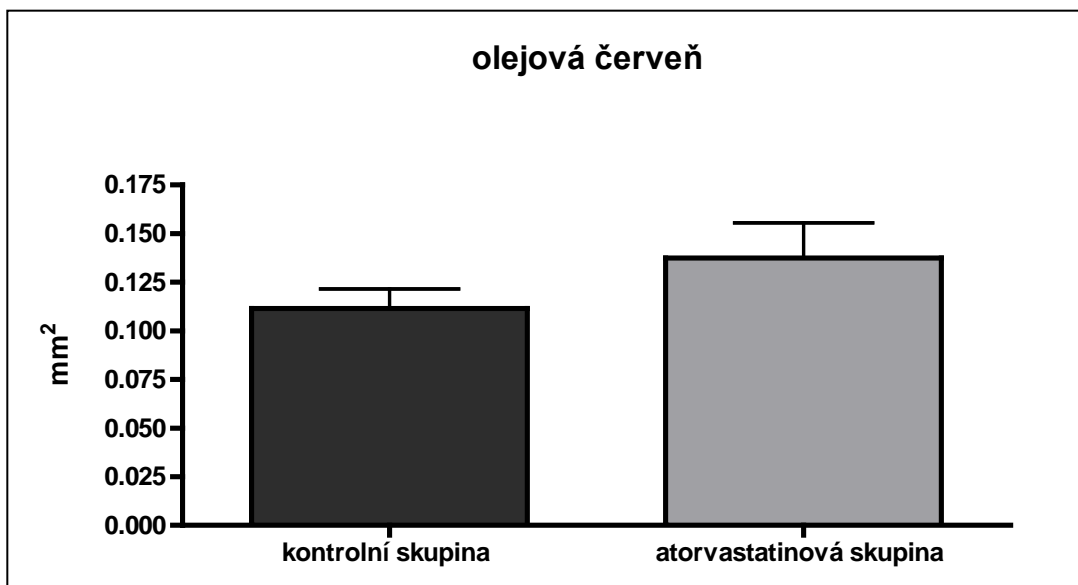
Exprese VCAM-1 byla pozorována v kontrolní i atorvastatinové skupině. Silná intenzita byla pozorována v medii cév pod aterosklerotickými pláty. Dále byla pozorována exprese v aterosklerotických plátech. Silná exprese byla pozorována také na cévním endotelu v oblasti plátu i mimo něj.



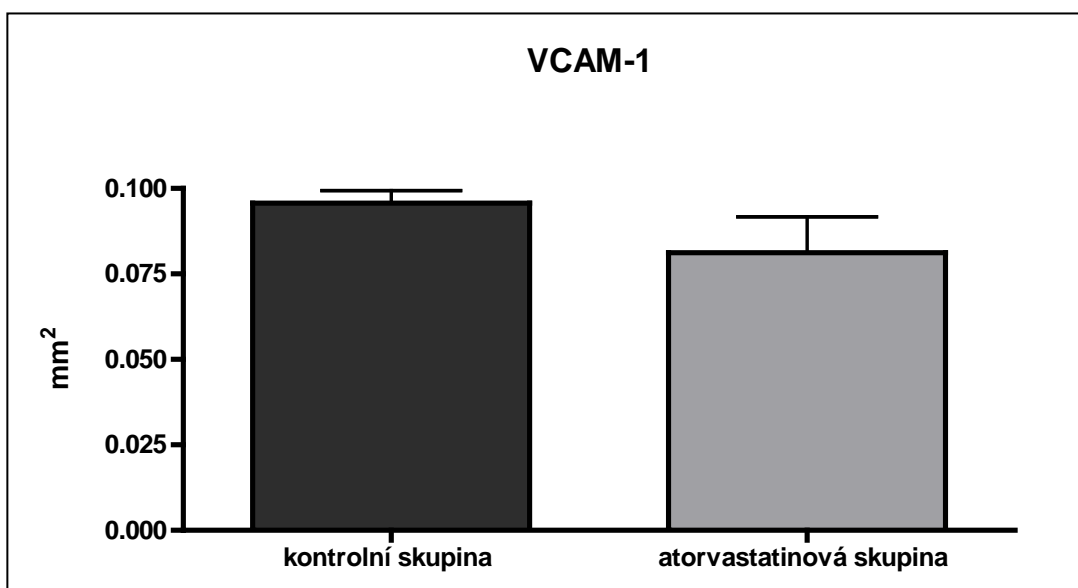
Obr. 14: Imunohistochemické barvení VCAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je pozorována v medii cévy pod aterosklerotický plátem, v plátu a na cévním endotelu. Zvětšení 200x.

5.5. STEREOLOGICKÁ ANALÝZA HISTOLOGICKÉHO BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ A IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ VCAM-1

Stereologická analýza překvapivě prokázala sice statisticky nevýznamné, ale přesto zvětšení plochy barvení olejovou červení. Naproti velikost plochy VCAM-1 barvení byla mírně snížena po podávání atorvastatinu.



Graf 8: Stereologická analýza velikosti plochy barvení olejovou červení. Podávání atorvastatinu vedlo k mírnému, statisticky nevýznamnému zvýšení plochy barvení olejovou červení.



Graf 9: Stereologická analýza velikosti plochy VCAM-1 barvení. Podávání atorvastatinu vedlo ke statisticky nevýznamnému snížení plochy barvení ve srovnání s kontrolní skupinou.

6. DISKUSE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují, až v pozdějších letech života jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze (24).

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. (59). 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 myší začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (60).

Ačkoli se tento model nejprve 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 myší, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohady, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myší 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) (61). 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

myši 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 (62).

U těchto myši bylo prokázáno, že podávání statinů a tohoto modelu nevede k očekávanému hypolipidemickému účinku a tudíž je možné tento model považovat za vhodný ke studiu pleiotropních účinků statinů (63). 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 myši (64). Tyto výsledky tedy naznačují, že tento kmen není příliš vhodný ke studiu účinku statinů.

LDL-receptor deficientním myši jsou myši, které také vznikly genetickými úpravami kmene C57BL/6J. Po podání standardní diety u nich nedochází ke spontánnímu rozvoji hypercholesterolemie jako u apoE^{-/-}-myši. Hypercholesterolemie a morfologicky významná ateroskleróza se vyvíjí až po podávání vysokotukové diety. Přesto je nutné poměrně dlouhodobé podávání takovéto diety k indukci významných aterosklerotických plátů (65).

Podávání statinů těmto myším vede k hypolipidemickému a antiaterogennímu účinku nicméně se často musí využívat velké dávky statinů a to až 300mg/kg/den (66).

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 deficientním myši vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v 5 týdnu svého života. V 8 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 hypolipidemik (67).

My jsme se v této rigorózní práci pokusili ověřit, zda atorvastatin u těchto myší vykazuje hypolipidemické, protizánětlivé a antiaterogenné účinky. Podávání dávky 10mg/kg/den atorvastatinu po dobu 8 týdnů přineslo poněkud rozporuplné výsledky. Došlo sice ke snížení celkového cholesterolu a zvýšení HDL cholesterolu nicméně LDL, VLDL a TAG nebyly významně sníženy. Mírný protizánětlivý účinek byl prokázán zejména díky snížení hladiny MCP-1 v krvi. Naopak hladina VCAM-1 v krvi a jeho exprese v plátu nebyly po podání atorvastatinu sníženy. Z výše uvedených výsledků lze usuzovat, že podávání 10mg/kg/den atorvastatinu není dostatečné pro zajištění výrazného hypolipidemického a protizánětlivého účinku, tedy účinků, které jsou demonstrovány po podávání statinů u lidí.

6. ZÁVĚR

Osmítýdenní podávání atorvastatinu v dávce 10 mg/kg/den vedlo k mírnému zlepšení lipidového profilu léčených apoE/LDL receptor deficientních myší. Tento velmi mírný hypolipidemický účinek byl doprovázen také mírným protizánětlivým účinkem, který se projevil sníženou hladinou MCP-1 v krvi.

Vzhledem k tomu že, v další rigorózní práci, kde byl použit stejný design experimentu, ale kde byla použita dávka 100mg/kg/den, došlo k demonstraci velmi výrazného hypolipidemického a protizánětlivého účinku, lze tedy konstatovat, že apoE/LDL receptor deficientním myši by mohly být dobrým zvířecím modelem pro studium účinků statinů na aterogenezi. Je nutné však použít dávku statinu pohybující se kolem 100 mg/kg/den. Zejména by však tyto myši mohly být využity pro studium možné kombinace jiných hypolipidemik (s jiným mechanismem účinku) se statiny.

LITERATURA:

1. Davignon J, Ganz P, Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109: III27-32, 2004.
2. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG, Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res*, 252: 13-19, 1999.
3. Cannon RO, 3rd, Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*, 44: 1809-1819, 1998.
4. Vanhoutte PM, [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 90 Spec No 6: 9-19, 1997.
5. Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al., Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91: 3527-3561, 1998.
6. Najemnik C, Sinzinger H, Kritz H, Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca*, 26: 148-153, 1999.
7. 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.
8. Mysliwiec M, Borawski J, Naumnik B, Rydzewska-Rosolowska A, Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia--possibilities of intervention. *Rocz Akad Med Bialymst*, 49: 151-156, 2004.
9. Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M et al., Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem*, 263: 5797-5803, 1988.

10. Nitenberg A, [Endothelial dysfunction in patients with diabetes: identification, pathogenesis and treatment]. *Presse Med*, 34: 1654-1661, 2005.
11. Ikeda U, Shimada K, Pleiotropic effects of statins on the vascular tissue. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 1: 51-58, 2001.
12. Chlopicki S, Gryglewski RJ, Angiotensin converting enzyme (ACE) and HydroxyMethylGlutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors in the forefront of pharmacology of endothelium. *Pharmacol Rep*, 57 Suppl: 86-96, 2005.
13. Taylor AL, Endothelial dysfunction and nitric oxide enhancing therapy: a new approach to the treatment of heart failure. *Congest Heart Fail*, 10: 237-242, 2004.
14. Muntner P, He J, Astor BC et al., Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol*, 16: 529-538, 2005.
15. 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.
16. Pedraza A, [Hyperlipoproteinemia in the production of atherosclerosis. Risk factors: diagnosis and treatment]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, 51: 21-33, 1993.
17. 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.

18. D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Karter AJ et al., Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care*, 27: 2234-2240, 2004.
19. Catena C, Novello M, Lapenna R et al., New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a). *J Hypertens*, 23: 1617-1631, 2005.
20. Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G, [Novel risk factors for atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and cholesterol as predictors of peripheral arteriopathy]. *Ital Heart J Suppl*, 2: 1031-1033, 2001.
21. Daubresse JC, [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux*, 21: A359-362, 2000.
22. 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.
23. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT, The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 35: 1-10, 2000.
24. Ross R, Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.
25. Taatjes DJ, Wadsworth MP, Schneider DJ, Sobel BE, Improved quantitative characterization of atherosclerotic plaque composition with immunohistochemistry, confocal fluorescence microscopy, and computer-assisted image analysis. *Histochem Cell Biol*, 113: 161-173, 2000.
26. 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.
27. Gudev A, [The role of the oxidative modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Mol Med (Sofia)*, 1: 31-38, 1996.
 28. Yla-Herttuala S, Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Med*, 23: 561-567, 1991.
 29. Takeya M, [Monocytes and macrophages--multifaced cell population involved in inflammation, atherosclerosis, and obesity]. *Nippon Rinsho*, 63 Suppl 4: 117-122, 2005.
 30. Gavrish AS, Sergienko OV, [The functional morphology of the thrombocytes and their role in the pathogenesis of atherosclerosis and ischemic heart disease (a review of the literature)]. *Lik Sprava*: 31-36, 1993.
 31. Boyle JJ, Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol*, 3: 63-68, 2005.
 32. Stehbens WE, The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses*, 58: 359-360, 2002.
 33. Joseph-Silverstein J, Silverstein RL, Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest*, 16: 176-182, 1998.
 34. Mareckova Z, Heller S, Horky K, [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek*, 45: 46-50, 1999.
 35. Springer TA, Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*, 57: 827-872, 1995.
 36. Cybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L, Iiyama K, Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta*, 286: 207-218, 1999.

37. Blann AD, McCollum CN, Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 72: 151-154, 1994.
38. 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.
39. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM, Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 95: 1262-1270, 1995.
40. Walpole PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL, Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 2-10, 1995.
41. 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.
42. 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.
43. 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.

44. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P et al., Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation*, 102: 2803-2809, 2000.
45. Auer J, Berent R, Weber T, Eber B, Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem*, 9: 1831-1850, 2002.
46. Mori S, Saito Y, [Pleiotropic effects of statins]. *Nippon Rinsho*, 60: 875-881, 2002.
47. 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.
48. Davignon J, Mabile L, [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 62: 101-112, 2001.
49. Bellosta S, Ferri N, Arnaboldi L et al., Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care*, 23 Suppl 2: B72-78, 2000.
50. Calabro P, Yeh ET, The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol*, 20: 541-546, 2005.
51. 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.
52. Duriez P, [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie*, 58: 5-14, 2003.
53. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H, Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and

- atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 162: 179-185, 2002.
54. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM, Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*, 348: 1079-1082, 1996.
55. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A, The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther*, 99: 95-112, 2003.
56. Endres M, Laufs U, Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke*, 35: 2708-2711, 2004.
57. 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.
58. 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.
59. Stancu C, Sima A, Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 5: 378-387, 2001.
60. Paigen B, Morrow A, Holmes PA et al., Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, 68: 231-240, 1987.
61. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW et al., ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Tromb*, 14: 133-140, 1994.
62. Hofker MH, Breuer M, Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol*, 110: 63-78, 1998.

63. 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.
64. 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.
65. Breslow JL, Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272: 685-688, 1996.
66. 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.
67. 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.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. FUNKCE ENDOTELU ZA FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK.....	7
2.1.1. Regulace cévního tonu	7
2.1.2. Vazoregulační látky syntetizované endotelem.....	8
2.1.3. Interakce mezi endoteliálními a krevními buňkami.....	8
2.1.3.1. Interakce krevních destiček a leukocytů s cévní stěnou.....	8
2.2. ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE	9
2.2.1. Endotel při ateroskleróze.....	13
2.3. RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY.....	15
2.4. PATOFYZIOLOGIE ATEROSKLERÓZY	20
2.4.2. Lipoproteiny	23
2.4.3. Monocyty	24
2.4.4. Destičky	25
2.4.5. Nestabilita a ruptura plátů	26
2.5. BUNĚČNÉ ADHEZIVNÍ MOLEKULY – VCAM-1	29
Buněčné adhezivní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Adhezivní molekuly se účastní řízení řady fyziologických dějů jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciace, hojení ran, či obnova tkání. Uplatňují se ale také při patologických procesech, kde se např. podílejí na interakcích mezi složkami imunitního systému (33). Podle strukturních vlastností je můžeme rozdělit na 4 základní skupiny. Jsou to selektiny, integriny, immunoglobulinová skupina a kadheriny.....	
Immunoglobulinová skupina adhezivních 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. Zprostředkovávají jak homofilní(vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce(vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce) (34). Patří sem celá řada adhezivních molekul jako antigenně specifické receptory T a B-lymfocytů TCR, BCR, koreceptory T-lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.	
29	
Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1) a platelet cell adhesion molecule-1(PECAM-1).	
30	
2.5.1. Struktura a funkce VCAM-1	30
2.7.....	STATINY
.....	
33	
2.7.1. Mechanismus účinku statinů.....	34
2.7.2. Pleiotropní účinky statinů	36
2.7.3.....	Atorvastatin
.....	
38	
2.7.3.1. Mechanismus účinku.....	38
2.7.3.2. Nežádoucí účinky a interakce	39
3. CÍL PRÁCE	41
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA	42
4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	43

4.3. ELISA ANALÝZA	43
4.4. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ	43
4.5. IMUNOHISTOCHEMIE	44
4.6. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ	47
4.7. STATISTICKÁ ANALÝZA	48
5. VÝSLEDKY	49
5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	49
5.2. ELISA ANALÝZA	52
5.4. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ VCAM-1 V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU	55
5.5. STEREOLOGICKÁ ANALÝZA HISTOLOGICKÉHO BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ A IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ VCAM-1	56
6. ZÁVĚR	62
LITERATURA:	63