

FARMACEUTICKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY
V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**SLEDOVÁNÍ ÚČINKU ATORVASTINU NA LIPIDOVÉ SPEKTRUM
U MYŠÍCH MODELŮ ATEROSKLERÓZY**

**STUDYING OF ATORVASTATIN EFFECTS ON LIPID PROFILE IN
MICE MODELS OF ATHEROSCLEROSIS**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Hradec Králové 2008

PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.
Bc. Martina Slanařová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

„Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za zájem, připomínky a čas, který věnoval mé práci. Mé poděkování rovněž patří celému kolektivu výzkumné laboratoře kliniky metabolické a gerontologické ve fakultní nemocnici Hradec Králové za příjemné pracovní prostředí a možnost konzultace. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem svým blízkým za velkou podporu.“

Abstrakt

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění cév s následným pomalým, mnoho let postupujícím, „zacpáváním“ postižených cév. Poruchy a změny v zastoupení a množství lipoproteinů jsou pro toto onemocnění typické. Statiny jsou v humánní medicíně nejčastěji používané léčiva v terapii dyslipoproteinémií.

Cílem této diplomové práce bylo popsat změny biochemických hodnot lipoproteinů u různých myších modelů aterosklerózy. Dále byly popsány změny parametrů lipidového spektra po podávání atorvastatinu u apoE-deficientních myší a apoE/LDLr-deficientních myší.

Samice apoE-deficientních myší a apoE/LDLr-deficientních myší byly vždy rozděleny do kontrolní a atorvastatinem léčené skupiny, přičemž atorvastatin byl podáván po dobu 8 týdnů v dávce 100 mg/kg myši.

Byla provedena analýza spektra krevních lipidů metodou separace lipoproteinů pomocí ultracentrifugační techniky.

Biochemická analýza krve apoE-deficientních myší ukázala, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL a HDL cholesterolu. Analýza krve apoE/LDLr-deficientních myší ukázala, že osmitýdenní podávání atorvastatinu ve stejných dávkách statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL, TAG a navíc bylo zjištěno, že atorvastatin zvýšil hladiny HDL cholesterolu.

Tyto výsledky tedy naznačují, že apoE/LDLr-deficientní myši by mohly být dobrým modelem pro studium dalších účinků a mechanismů působení statinů.

Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of blood vessels with a successive, very slow progress which takes many years and „plugs“ disabled vessels. Faults and changes in representation and quantity of lipoproteins are for this disease very typical. In human medicine is mostly used medication Statins during a therapy of dyslipoproteinemia.

The aim of this thesis was to describe the changes of biochemical lipoproteins levels at the various mice models of atherosclerosis. Furthermore we wanted to describe the changes lipids after administering of atorvastatin in apoE-deficient mice and apoE/LDLr-deficient mice.

Female of apoE-deficient mice and apoE/LDLr-deficient mice were divided into a control and with atorvastatin treated group, where atorvastatin was administered in a period of 8 weeks in a dose of 100 mg/kg mouse.

Biochemical analysis of lipids was performed by a separation method of lipoproteins by means of ultracentrifugal technique.

Biochemical analysis of blood of apoE-deficient mice demonstrated, that 8 weeks atorvastatin treatment in a dose of 100 mg/kg significantly increased levels of total cholesterol, VLDL, LDL and HDL cholesterol. The blood analysis of apoE/LDLr-deficient mice demonstrated, that 8 weeks long treatment with atorvastatin in the same doses significantly reduced levels of total cholesterol, VLDL, LDL, TAG and furthermore increased levels of HDL cholesterol

These results indicate, that apoE/LDLr-deficient mice could be a good model for the study of statins effects and mechanisms in experimental atherosclerosis.

Obsah:

1. Úvod	9
2. Lipoproteiny	11
2.1 Chylomikrony	12
2.2 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě	14
2.3 Intermediální lipoproteiny	14
2.4 Lipoproteiny o nízké hustotě	14
2.5 Lipoproteiny o vysoké hustotě.....	16
2.6 Apolipoproteiny	17
2.6.1 Lipoprotein (a)	18
3. Dyslipoproteinémie	19
3.1 Klasifikace dyslipoproteinémií	20
3.1.1 Terapeutická klasifikace	21
3.2 Dyslipidémie metabolického syndromu (diabetická dyslipoproteinémie)	22
3.3 Diagnostika dyslipidemií	22
3.4 Vyšetřování krevních lipidů.....	22
4. Ateroskleróza	24
4.1 Patogeneze aterosklerózy.....	25
4.1.1 Iniciace aterosklerózy	26
4.1.2 Fáze progresu	29
4.1.3 Terminální fáze aterosklerózy	29
4.2 Struktura aterosklerotického plátu	30
4.3 Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát.....	31
4.4 Stupně vývoje aterosklerózy	32
4.5 Rizikové faktory aterosklerózy	34
5. Farmakoterapie.....	36
5.1 Hypolipidemika	37
5.2 Statiny	37
5.2.1 Mechanismus účinku	38
5.2.2 Pleiotropní (nelipidové) účinky statinů.....	40
5.3 Atorvastatin.....	40
5.3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	41

5.3.2	Mechanismus účinku	42
5.3.3	Farmakodynamické vlastnosti	42
6.	Zvířecí modely aterosklerózy	45
6.1	Pojmy	45
6.2	Využití myších modelů při studiu aterosklerózy	46
6.3	Vývoj myších modelů	46
6.4	ApoE-deficientní a LDL-receptor-deficientní myší modely aterosklerózy	49
7.	Cíl práce	53
8.	Experimentální část	54
8.1	Zvířecí modely	54
8.1.1	Samice apoE-deficientní myši:	54
8.1.2	Samice ApoE/LDLr-deficientní myši:	54
8.2	Předepsaná dieta	55
8.3	Vyšetření základního spektra krevních lipidů	55
8.3.1	Ultracentrifugace	55
8.3.1.1	Zpracování materiálu	56
8.4	Enzymatické stanovení koncentrace cholesterolu v krevním séru	57
8.5	Enzymatické stanovení koncentrace triacylglycerolů v krevním séru	59
9.	Statická analýza	61
9.1	Biochemická analýza u C57BL/6J myší krmených standardní dietou	61
9.2	Biochemická analýza u apoE-deficientních myši:	62
9.3	Biochemická analýza u apoE/LDLr-deficientních myši:	65
10.	Diskuze	68
11.	Závěr	71
12.	Zkratky	72
13.	Literatura	73

1. ÚVOD

Většina populace v rozvinutých zemích ve středním a pokročilém věku má prokazatelně aterosklerózu a každý druhý jedinec zemře na její komplikace.

Současná data Světové zdravotnické organizace ukazují, že kardiovaskulární onemocnění jsou zodpovědná asi za 50% celkové mortality na celém světě. Z těchto 17 milionů úmrtí v roce 2000 bylo 7 milionů způsobeno ischemickou chorobou srdeční (ICHS) a dalších asi 5,5 milionů onemocněními mozkových cév. V průmyslově vyspělých zemích jsou kardiovaskulární onemocnění hlavní příčinou mortality.

Úmrtnost na tato onemocnění je v České republice jedna z nejvyšších v Evropě, i když v posledních několika letech začala konečně klesat. Nejčastější příčinou kardiovaskulární mortality u nás i v průmyslově vyspělých zemích je ICHS, která je způsobena koronární aterosklerózou (1).

Ateroskleróza je postižení způsobené pomalým, mnoho let postupujícím, „zaccpáváním“ cév. Slovo „zaccpávání“ je v tomto případě nutno chápat ne úplně doslova, protože nánosy v cévách zapřičiňují tuhnutí cévní stěny nikoli její obstrukci. Dojde-li k úplnému uzávěru tepny, a tím k úplnému přerušení přístupu živin, především kyslíku, postižené tkáně odumírají.

Ateroskleróza se rozvíjí pomalu a nenápadně. Tuky se tiše usazují do cévní stěny a zužují její průsvit, aniž bychom pocíťovali jakoukoli změnu.

Mnoho lidí si často stěžuje na klouby, záda, nohy, plíce, dokonce i na ledviny, ale jen zřídka se věnuje pozornost tepnám. Důvody jsou pochopitelné. Následky poškození tepen jsou totiž především nepřímé, a tudíž jen málo z nás si skutečně uvědomuje, jak nezbytně důležité pro náš organizmus jsou. Je ovšem smutnou skutečností, že následky potíží s tepnami bývají mnohem vážnější než u jakýchkoliv jiných nemocí, které nás sužují.

Nemoc se začíná vyvíjet v dětství a její vývoj postupuje ve většině případů velice pomalu po celý život. Velmi záleží na stadiu, do kterého se dostane, a to z jednoho

prostého důvodu: tepnami proudí krev, jež roznáší po těle kyslík a nezbytné živiny. Pokud jsou tyto dodávky přerušeny, pak orgány, do kterých je krev tepnami přenášena, začnou odumírat. Pokud je postiženým orgánem srdce a zúžení je nadměrné, dochází k srdečnímu infarktu a v některých případech i ke smrti postiženého. Jestliže je tím nejvíce poškozeným orgánem mozek, onemocnění aterosklerózou přivodí mozkovou mrtvici. Pokud jsou postiženy dolní končetiny, onemocníme gangrénou.

Zvýšené riziko pro rozvoj aterosklerózy představuje především nevhodná životospráva a životní styl. Kdo holduje tučným jídlům, dopřává si pravidelné přídělky nikotinu a fandí sportu pouze jako televizní divák, jistě nemá k ateroskleróze daleko. Vyšší riziko je spojené i s cukrovkou, vysokým krevním tlakem, obezitou, či v rodinně prodělaným srdečním infarktem nebo mozkovou mrtvicí (1).

Protože choroby srdce a cév představují nejzávažnější onemocnění současné doby, je nutná snaha objasnit molekulární a buněčné mechanismy jejich vzniku a rozvoje, a v neposlední řadě je potřeba snažit se nalézt nové možnosti či rozšíření možností již známých terapeutických postupů.

2. LIPOPROTEINY

Vzhledem k tomu, že lipidy mají hydrofobní povahu, je jejich transport v plazmě (vodném prostředí organismu) uskutečňován ve vazbě na bílkovinný nosič, kterým může být např. albumin (transport mastných kyselin), nebo prostřednictvím velkých makromolekulových komplexů, tzv. lipoproteinů. Tyto částice mají polární obal a nepolární jádro. Obal je tvořen apoproteiny, fosfolipidy a volným cholesterolem, jádro pak triacylglyceroly a estery cholesterolu. Procentuální zastoupení jednotlivých složek je u různých lipoproteinů rozdílné (tab. 1).

Tabulka 1 - Procentuální zastoupení jednotlivých složek v lipoproteinové částici

	chylomikrony	VLDL	HDL	LDL
apolipoproteiny	1 - 2 %	6 – 10 %	18 – 22 %	45 – 55 %
triglyceridy	85 – 95 %	50 – 65 %	4 – 8 %	2 – 7 %
cholesterol	3 – 7 %	20 – 30 %	51 – 58 %	18 – 25 %
ostatní	3 – 6 %	15 – 20 %	18 – 24 %	26 – 32 %

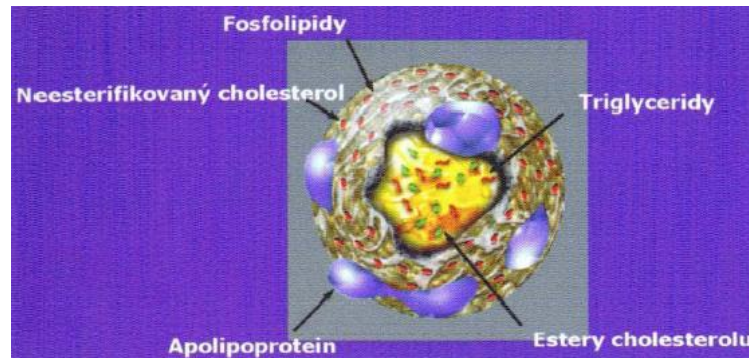
Význam apoproteinů spočívá především v zajištění transportu hydrofobních lipidů v plazmě. Dále jsou ještě potřebné pro:

- syntézu a sekreci specifických lipoproteinů
- aktivaci enzymů modifikujících lipoproteiny
- vazbu na specifické receptory na povrchu buněk odstraňujících lipoproteiny z krevního řečiště.

Jednotlivé lipoproteinové částice lze klasifikovat např. podle bílkovinné části neboli apolipoproteinu nebo podle zastoupení jednotlivých lipidů v jedné struktuře. Nejčastěji jsou však rozlišovány podle fyzikálně-chemických vlastností. Díky nim se totiž jednotlivé typy lipoproteinů liší svou pohyblivostí v elektrickém poli při provádění elektroforézy na papíře nebo agarózovém gelu nebo svou sedimentací při ultracentrifugaci. Při

elektroforetickém dělení zůstávají na startu chylomikrony, následuje frakce beta, prebeta a nejdále doputuje frakce alfa. Schematicky je lipoproteinová částice znázorněna na obr. 1 (2).

Obrázek 1 - Schema lipoproteinové částice (Češka et al, 2006)



Podle ultracentrifugace je dělení lipoproteinů následující:

- chylomikrony
- lipoproteiny o velmi nízké hustotě
- lipoproteiny o střední hustotě
- lipoproteiny o nízké hustotě
- lipoproteidy o vysoké hustotě.

2.1 Chylomikrony

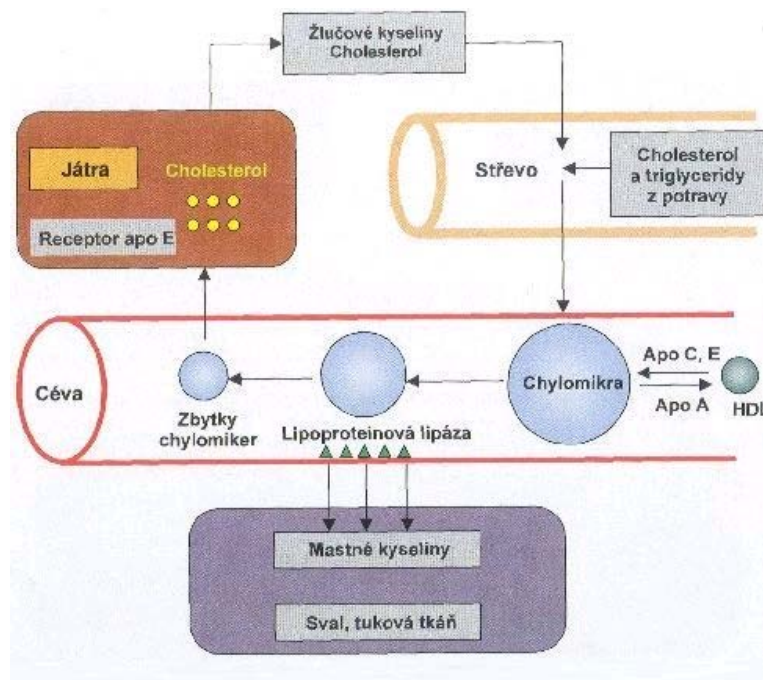
Chylomikrony jsou největší lipoproteinové částice. Díky velkému obsahu lipidové složky (zejména TAG) mají nejmenší hustotu. Vznikají v buňkách sliznice tenkého střeva vstřebáním tuku z potravy. Odtud se secernují do lymfy a cestou ductus thoracicus se dostávají do krevního oběhu.

Jsou tvořeny převážně triacylglyceroly a malým množstvím ostatních lipoproteinových složek. Hlavním apoproteinem, nezbytným pro syntézu chylomikronů, je

apoB 48. Tyto částice ale dále obsahují i apoproteiny A a z plazmy přijaté apoproteiny E a C, které jsou nezbytné pro jejich katabolismus.

V krevním řečišti jsou TAG obsažené v jádře chylomikronů hydrolyticky štěpeny lipoproteinovou lipázou, obsaženou v povrchových membránách endotelií kapilár, za vzniku „chylomikronových zbytků“ a mastných kyselin. Některé složky si chylomikrony vyměňují s částicemi HDL. Mastné kyseliny vzniklé hydrolyzou se váží na albumin jako volné MK. Většina z nich pak slouží jako zdroj energie nebo se uloží v tukové tkáni jako zásoba triglyceridů. „Zbytky chylomikronů“, obsahující hlavně cholesterol, fosfolipidy a apo B, jsou vychytávány játry, která je dále remodelují (3). (obr. 2)

Obrázek 2 - Metabolismus chylomikrů (Pace NEWS 1/2000)



2.2 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě

Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL - very low density lipoproteins neboli prebeta lipoproteiny) mají obdobné složení jako chylomikrony, ale jsou menší a hlavním apoproteinem je zde apoB-100. Vznikají v játrech v drsném endoplazmatickém retikulu hepatocytů, kde přibírají endogenní triacylglyceroly a malé množství esterů cholesterolu. Z jater transportují lipidy do periferie. Kromě apoB-100 obsahují VLDL i malé množství apoE. V plazmě tato forma VLDL přebírá z lipoproteinů o vysoké hustotě estery cholesterolu, apoC a snad také další apoE (4).

Podobně jako chylomikrony jsou tyto zralé částice v krevním řečišti štěpeny lipoproteinovou lipázou. Ta působí na TAG umístěné v jádře VLDL. Vznikají tak částice nazývané lipoproteiny o střední hustotě neboli IDL. (obr. 3)

2.3 Intermediální lipoproteiny

Intermediální lipoproteiny (IDL - intermediate density lipoproteins) jsou částice bohaté hlavně na cholesterol. Z krevního oběhu jsou vycytávány játry. Tam jsou následně i metabolizovány. Hepatocyty IDL lipoproteiny působením jaterní lipázy přeměňují (odstraňují triacylglyceroly a zbytky apoE a C) a do krevního oběhu vylučují jako LDL. (obr. 3)

2.4 Lipoproteiny o nízké hustotě

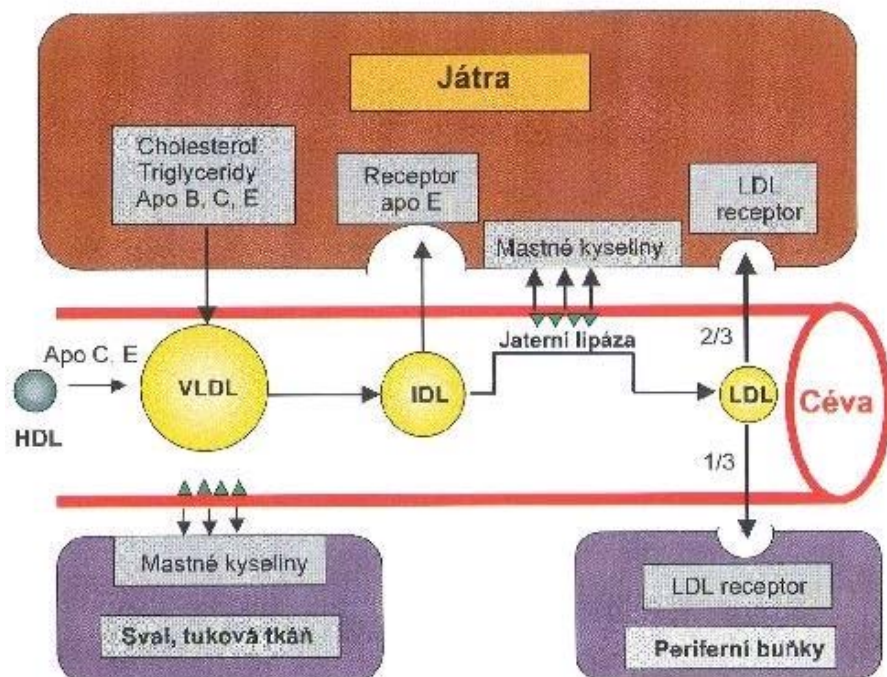
Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL - low density lipoproteins neboli beta lipoproteiny) vznikají v játrech z IDL. Jejich jádro je tvořeno především estery cholesterolu, povrch pak volným cholesterolem a apoproteinem B-100. Z celkového

množství obsahují 60-70% cholesterolu a jsou tedy jeho hlavní zdroj pro buňky periferních tkání. V nich je využíván k tvorbě buněčných membrán a k syntéze steroidních hormonů.

Na membránové receptory se LDL váží prostřednictvím apoB-100. Navázaná částice se spolu s receptorem dostává do lyzozomu. Tam je receptor uvolněn a vyslán zpět k buněčné membráně. ApoB-100 je degradován a estery cholesterolu hydrolyzovány. Cholesterol, který takto vstoupil do buňky, se může buď stát součástí buněčných membrán, nebo být reesterifikován a uložen jako zásobní cholesterol, nebo být při nadbytku vyloučen do žluči jako takový nebo po přeměně ve formě žlučových kyselin.

Při zvýšené hladině dodávají LDL zbytkový cholesterol do tkání cévní stěny, čímž vytvářejí podmínky pro vznik aterosklerózy. Proto se částice LDL běžně označují jako špatný cholesterol. Vysoký příjem cholesterolu do buňky totiž vede k inhibici klíčového enzymu syntézy cholesterolu a k následnému potlačení tvorby cholesterolu buňkou *de novo*. Navíc je potlačena i syntéza LDL receptorů, což vede k dalšímu snížení přísunu cholesterolu do buňky (4). Oba tyto procesy představují vysoké riziko rozvoje předčasné aterosklerózy. (obr. 3)

Obrázek 3 - Metabolismus VLDL – IDL – LDL
(Pace NEWS 1/2000)



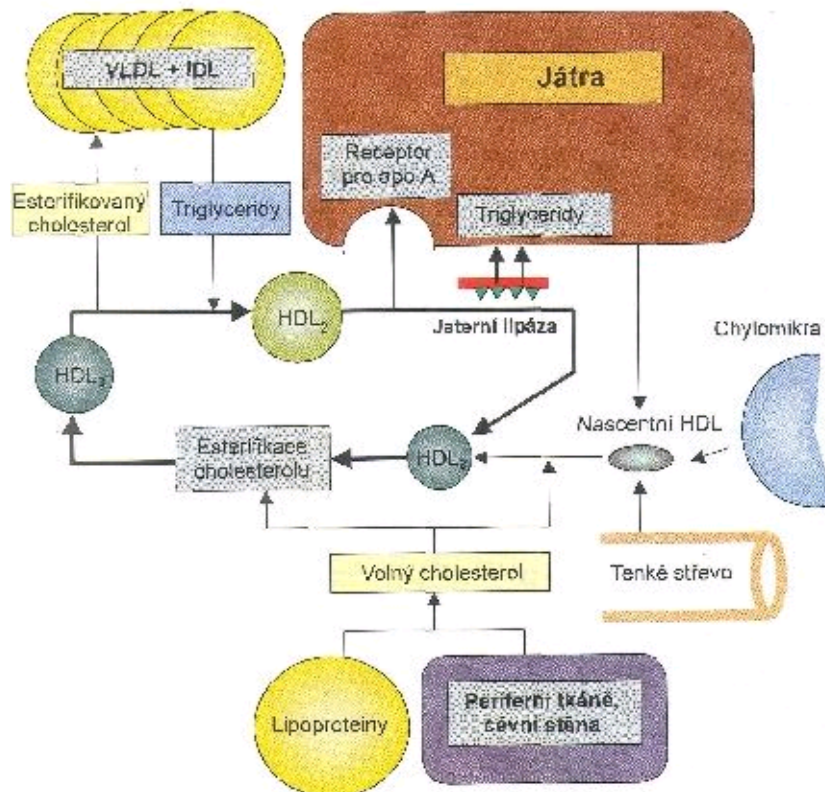
2.5 Lipoproteiny o vysoké hustotě

Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL - high density lipoproteins neboli alfa lipoproteiny) jsou částice ze všech lipoproteinů nejmenší. Často jsou označovány jako dobrý cholesterol. Slouží totiž k přenosu esterifikovaného cholesterolu z ostatních lipoproteinů, z buněk periferních tkání a hlavně z tkání cévních stěn do jater. Tam je odbourán a k vyloučení odveden do žluče.

HDL jsou nejmenší lipoproteinové částice, které vznikají ve formě tzv. nascentních HDL v játrech a tenkém střevě, odkud jsou vylučovány do krevního oběhu. Zde přebírají od jiných lipoproteinů volný cholesterol, jehož část je v HDL esterifikována účinkem enzymu lecithin-cholesterolacyltransferázy a přechází do jádra HDL. Základní bílkovinnou součástí HDL jsou apoproteiny A-I, A-II a E (5).

Předpokládá se, že částice HDL mohou být vychytávány játry a odbourávány. Cholesterol pak může být vyloučen z organismu přímo nebo po přeměně na žlučové kyseliny jako součást žluči. (obr. 4)

Obrázek 4 - Metabolismus HDL (Pace NEWS 1/2000)



Jaký je význam lipoproteinových částic z hlediska lékařského?

LDL částice ve zvýšené plazmatické koncentraci jsou považovány za nebezpečné. Snadno totiž prostupují intimou arterií, jsou špatně vychytávány LDL-receptory a hlavně snadno podléhají oxidaci, což zvyšuje jejich aterogenitu.

HDL částice hrají velkou roli při bránění hromadění cholesterolu ve stěnách cév a tedy i při vývoji aterosklerózy a jejich zvýšená koncentrace by měla znamenat snížení rizika rozvoje této nemoci. Avšak ani zvýšená hladina HDL lipoproteinů není úplně v pořádku, protože i částice HDL-2 mohou být rizikovým faktorem ICHS.

2.6 Apolipoproteiny

V poslední době je při zkoumání poruch lipidového a lipoproteinového metabolismu věnována zvýšená pozornost apolipoproteinům (apo), tedy bílkovinné části lipoproteinu.

Jak již bylo uvedeno, hlavní funkce apo v částici jsou:

- role kofaktoru enzymů účinných při lipoproteinovém metabolismu
- zprostředkování vazby lipoproteinu na specifické receptory
- tvoření struktury lipoproteinové částice
- účast na přenosu nebo výměně lipidů mezi jednotlivými částicemi.

Apolipoproteiny jsou významné i z hlediska klinického. Např. snížená koncentrace apo A-I a naopak zvýšená hladina apo B tvoří riziko ICHS. Dokonce jsou tyto hladiny v diagnostice považovány za lepší a přesnější markery než jakými jsou parametry tukového metabolismu (tedy celkový cholesterol, HDL a LDL cholesterol a TAG) (4).

2.6.1 Lipoprotein (a)

Lp(a) je lipoproteinová částice řadící se podle hustoty a struktury k lipoproteinům LDL. Má však navíc typický apolipoprotein (a), kovalentně vázaný k molekule apoB-100 jedním disulfidickým můstkem.

Důležitá je zmínka o této částici kvůli její značné homologii se strukturou základní bílkoviny fibrinolytického systému – plazminogenu. Právě ta je významná při rozvoji trombotického procesu i aterosklerotických změn. Lp(a) brání vazbě plazminogenu na fibrinogen a na monomery fibrinu, čímž inhibuje účinek tkáňového aktivátoru plazminogenu.

Lp(a) navíc podporuje dělení buněk hladkého svalstva cévní stěny, což je jedním ze základních momentů v patogenezi aterosklerózy. Proto svým výrazným antifibrinolytickým efektem a podporou proliferačních dějů v cévní stěně patří Lp(a) k důležitým rizikovým faktorům rozvoje aterosklerózy.

3. DYSLIPOPROTEINÉMIE

DLP, dyslipidémie, dříve hyperlipoproteinémie. Dyslipoproteinémie jsou skupinou metabolických chorob hromadného výskytu. Jsou charakterizovány patologicky zvýšenou nebo sníženou hladinou lipidů a lipoproteinů v plasmě. Vznikají důsledkem zvýšené syntézy nebo sníženého katabolismu lipoproteinových částic, které zajišťují plasmatický transport tukových látek (cholesterolu, triglyceridů, fosfolipidů a mastných kyselin).

Většina DLP je podmíněna dědičnou, geneticky podmíněnou poruchou metabolismu lipoproteinů. Tato skupina je proto označována jako **primární**. Na vzniku DLP se však výrazně podílejí i faktory zevního prostředí, především nevhodná dieta, nedostatek tělesného pohybu, nadměrná spotřeba alkoholu, nadváha a kouření. Klinický i laboratorní obraz DLP je tedy vždy kombinací genetických faktorů a vlivů zevního prostředí. Vzájemný podíl těchto vlivů se u jednotlivých typů DLP liší (6).

Dědičnost DLP je různá, v menšině případů monogenní (klasickým příkladem je familiární hypercholesterolemie), většinou polygenní. Z klinického hlediska má dědičný charakter DLP zásadní význam. Příbuzní pacientů s DLP jsou totiž obdobnou poruchou ohroženi podstatně více než běžná populace. Vyšetřování rodinných příslušníků pacientů s DLP představuje velmi efektivní způsob vyhledávání ohrožených osob v rámci primární prevence ICHS.

Pouze menšina DLP vzniká v důsledku jiné poruchy nebo choroby - hepatopatie, etylismus, dekompenzace diabetu mellitu, hypothyreóza, renální insuficience, nefrotický syndrom a další. Označujeme je proto jako dyslipoproteinémie **sekundární** (7).

Hlavním klinickým projevem DLP jsou klinické manifestace aterosklerózy v různých lokalizacích – především ICHS, cerebrovaskulární příhody a ICHDK. Jedná se o projevy pozdní, které jsou výsledkem dlouhodobého působení dyslipoproteinémie. DLP s výraznou hypertriglyceridemií se mohou projevit také opakovanými atakami akutní pankreatitidy.

Jinak jsou klinické projevy DLP poměrně chudé - zahrnují rozvoj arcus senilis corneae v mladším věku, xantelesmata palpebrarum a kožní a šlachové xantomy (9).

V preklinickém stadiu rozvoje aterosklerózy mohou být patrné šelesty nad velkými tepnami (především nad karotidami a stehenními tepnami) nebo oslabené periferní pulzace. Aterosklerotického postižení může být také nalezeno při neinvazivním (sonografie) nebo invazivním (angiografie) vyšetření tepenného systému.

3.1 Klasifikace dyslipoproteinémií

Příčina DLP bývá většinou komplexní. Na jejím vzniku se podílejí prakticky vždy nejméně dva faktory současně: vlivy genetické a vlivy zevního prostředí (strava, fyzická aktivita, alkohol, kouření atd.). Přidat se může i vliv jiných onemocnění, tedy sekundární DLP. Výsledkem pak může být jak změna kvantitativní (cholesterol a/nebo triglyceridy), tak i změna kvalitativní (některých lipoproteinů) (8).

DLP lze dělit podle několika hledisek:

A/ Podle příčiny:

1. primární DLP, které lze dále dělit na jednotlivé podtypy.
2. sekundární DLP, vyvolané jiným akutním či chronickým onemocněním nebo stavem.

B/ Podle laboratorního nálezu:

1. terapeutická klasifikace (jednoduchá a současné době doporučovaná pro péči o nemocné s DLP).
2. Fredricksonova klasifikace (klasifikace WHO), dnes již prakticky opuštěna (vychází ze stanovení koncentrace celkového cholesterolu, triacylglycerolů a ELFO lipoproteinů).

3.1.1 *Terapeutická klasifikace*

Jde o klasifikaci, která je doporučena Evropskou společností pro aterosklerózu z roku 1992. Převzala ji jak společná evropská doporučení odborných společností pro prevenci ICHS tak i doporučení česká. Jde do jisté míry o zjednodušenou klasifikaci, která vychází z pouhého stanovení koncentrace celkového cholesterolu a triglyceridů (9).

Podle výsledků je možné nemocného zařadit do některé z následujících skupin:

- Izolovaná hypercholesterolémie - zvýšení koncentrace celkového cholesterolu při normální koncentraci triglyceridů.
- Izolovaná hypertriglyceridémie - zvýšení koncentrace triglyceridů při normální koncentraci celkového cholesterolu.
- Smíšená hyperlipidémie - současné zvýšení koncentrace celkového cholesterolu i triglyceridů.

Hlavními výhodami této klasifikace je její snadná aplikace v praxi. Je jednoduchá a nemocného tak lze snadno zařadit do konkrétní skupiny a lze z ní vycházet při základní terapeutické rozvaze jak v léčbě nefarmakologické, tak i v případě výběru vhodného hypolipidemika.

Nevýhodou terapeutické klasifikace je to, že jde do jisté míry zjednodušení problematiky DLP. Klasifikace totiž nebere v úvahu některé důležité faktory. Nezohledňuje koncentraci HDL cholesterolu, jejíž zvýšení se může na hypercholesterolémii významně podílet. Naopak snížení HDL cholesterolu i při normální koncentraci celkového cholesterolu může znamenat zvýšené riziko. Není zohledněna ani příčina DLP, ani její různé typy, které mohou mít stejný laboratorní obraz, ale různé riziko ICHS a různý přístup k léčbě. Při této klasifikaci je tedy nutno doplnit posouzení koncentrace HDL cholesterolu, který zajišťuje tzv. reverzní transport cholesterolu z tkání do jater a má tak významný antiaterogenní efekt.

3.2 Dyslipidémie metabolického syndromu (diabetická dyslipoproteinémie)

Tento typ DLP je charakterizován hyperglyceridemií (obvykle mírnou) a snížením HDL cholesterolu. Koncentrace LDL cholesterolu je u této DLP často jen mírně zvýšená nebo dokonce normální. Výrazné je zde však zastoupení tzv. „small dense LDL“, které jsou vysoce aterogenní (7). Jejich aterogenita spočívá:

- ve snadnějším pronikání membránou
- v jejich špatném rozpoznávání a vychytávání cestou LDL receptorů
- ve snadnějším podléhání oxidaci, která zvyšuje jejich aterogenitu.

3.3 Diagnostika dyslipidemií

Diagnostika DLP je postavena především na laboratorním vyšetření. Pro rozhodování o léčbě nemocných má ale zásadní význam klinické vyšetření nemocného a jeho anamnéza. U nemocných v primární prevenci ICHS je nutné klinické vyšetření a podrobná anamnéza osobní i rodinná – především pro stanovení výše rizika ICHS a tím i pro rozhodování o léčbě, dále i pro diagnostiku DLP (vzorené x sekundární DLP) (9).

3.4 Vyšetřování krevních lipidů

Screeningové vyšetření lipidů v celé populaci je z ekonomického hlediska neefektivní a většinou chybí i návaznost na další péči o osoby s nalezenou DLP. Vysoce efektivní je však selektivní screening vybraných skupin osob (osoby léčící se s ICHS, ICHDK, obliterací karotid, příbuzní osob s předčasnou ICHS, hypertonici, diabetici, muži nad 45 let, ženy nad 55 let, příbuzní osob s vrozenou DLP, osoby obézní, kuřáci).

Základním orientačním vyšetřením je stanovení celkového cholesterolu. Pro běžnou péči o většinu nemocných s DLP lze pak vystačit se základním vyšetřením krevních lipidů:

- celkového cholesterol,
- triglyceridů,
- HDL cholesterolu,
- LDL cholesterolu. (tab.2)

Výjimečně může být užitečné tato vyšetření doplnit stanovením koncentrace apolipoproteinu B100 a/nebo lipoproteinů (a).

Metodami, které dnes nemají prakticky žádný význam, jsou stanovení celkových lipidů, fosfolipidů, esterů mastných kyselin a do značné míry i elektroforéza lipoproteinů (4).

Tabulka 2 - Koncentrace plazmatických lipidů považované za hranice normy

Celkový cholesterol	< 5,0 mmol/l
LDL cholesterol	< 3,0 mmol/l
Triglyceridy	< 2,0 mmol/l
HDL cholesterol	> 1,0 mmol/l

4. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza není onemocněním jen dospělého věku, ale jde o celoživotní onemocnění. Začíná se rozvíjet již v dětství. Právě proto je prevence aterosklerózy v dospělém věku již prevencí pozdní a téměř neúspěšnou.

Aterosklerózu lze definovat jako chronické onemocnění cévní intimy, provázené kumulací cholesterolu, fibrózní tkáně, některých dalších komponent krve a změnami v medii cévní stěny.

Etiopatogeneze aterosklerózy je multifaktoriální. V podstatě vzniká jako specifická reakce na nesespecifické poškození cévní stěny (10).

Příčinou aterosklerózy je ukládání tukových látek – především **cholesterolu** - do stěny cév. V časných fázích choroby se v cévách tvoří tzv. **tukové proužky**. Tyto změny jsou ještě plně vratné. Při dlouhodobě zvýšené hladině cholesterolu však dochází v cévní stěně k přestavbě stěny, která je již nevratná. Cévy tvrdnou, jejich stěna se ztlušťuje, vznikají tuhé, tukové nánosy – tzv. **aterosklerotické pláty**. Pláty zužují průsvit a brání normálnímu průtoku krve.

Ateroskleróza se rozvíjí pomalu a nenápadně. Tuky se tiše usazují do cévní stěny a zužují jejich průsvit, aniž by postižení na sobě pociťovali jakoukoliv změnu. Pokud zúžení dosáhne kritické hodnoty nebo dojde k prasknutí plátu, vzniknou nepřehlédnutelné klinické příznaky (11).

Projevy aterosklerózy jsou potom velmi rozmanité a závisí na oblasti, ve které se postižená céva vyskytuje.

Jedná-li se o postižení koronární tepny srdce, může dojít k **srdečnímu infarktu**. Při infarktu se snižuje dodávka kyslíku a živin svalovým buňkám srdce. Dochází k srdeční ischemii (nedokrvení tkáně). Následkem je postižení až odumření svalových buněk a jejich náhrada neplnohodnotnou tkání neboli jizvou. Srdeční infarkt se nejčastěji projeví náhlou bolestí na hrudi, někdy vystřelující do levé paže, pocitem dušnosti a úzkosti. Rozsah následků vždy závisí na druhu postižené srdeční tepny a na jejím průměru (11).

Pokud je nedokrvení pouze dočasné, vzniká přechodná **ischemie**, která se projeví přechodnými bolestmi na hrudi a dušností ustupujícími zpravidla po chvilkovém zklidnění nebo tabletě nitroglycerínu. Tento stav se nazývá **angina pectoris** a je zpravidla předstupněm srdečního infarktu.

Mozková mrtvice (iktus, centrální mozková příhoda) je další komplikací aterosklerózy. Postižení je lokalizováno do cévního řečiště mozku. Postihuje zejména starší pacienty. Stejně jako v případě infarktu myokardu (srdečního svalu) i zde dochází k uzávěru tepny a následné nedokrevnosti mozku. Na rozdíl od postupného uzavírání cév způsobujícího „sklerózu“, je zde příčinou uzávěr náhlý. Podle oblasti, která je zasažena uzávěrem, vznikají příslušné neurologické příznaky. Nejčastějšími příznaky jsou: ztráta vědomí, ztráta citlivosti některých částí těla, ztráta hybnosti končetin, poškození mimiky obličeje apod. Rozsah postižení je různý. Změny mohou být i nevratné. Mírnějším projevem bývá takzvaná tranzitorní ischemická ataka (TIA), která se projeví chvilkovým bezvědomím a žádnými, případně rychle se upravujícími změnami hybnosti, řeči či citění.

Ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) je onemocnění tepen dolních končetin. Zúžení průsvitu cév vede k charakteristickým příznakům. Pacienti si nejčastěji stěžují na klaudikační neboli námahovou bolest. Později se objevují i klidové bolesti dolních končetin, končetina je studená, mizí ochlupení, často se rozvíjí plísňové postižení nohou. Dlouhodobá nedokrevnost vede ke vzniku kožních defektů, které se špatně hojí. V případě úplného tepenného uzávěru je dolní končetina ohrožena tzv. **gangrénou** - odúmrtím tkáně s následnou infekcí. Tento stav často končí částečnou amputací končetiny (12).

4.1 Patogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza je podle současného konceptu považována za chronický zánět, který je výsledkem složitých interakcí mezi chemicky modifikovanými endogenními strukturami, např. lipoproteiny, nebo produkty pokročilé glykace či exogenními látkami infekčního původu, a imunitním systémem. Imunitní systém je v tomto procesu

reprezentován humorálními složkami, ale i buněčnými elementy, především makrofágy, dentritickými buňkami a T-lymfocyty. Zapojeny jsou však i další buněčné elementy, jako např. buňky endotelu, hladké svaloviny, fibroblasty, mastocyty, trombocyty a erytrocyty. Vzájemné spolupůsobení uvedených buněčných i humorálních složek, za současného přispění molekul buněčné hmoty, vede k zánětlivému procesu, který má za důsledek tvorbu komplexní léze, jinak nazývané aterosklerotický plát. Ten ovlivňuje lumen cév a jeho ruptura spolu s následnou trombózou vede k akutním klinickým komplikacím (1).

Proces aterosklerózy lze časově uměle rozdělit do tří fází: iniciační, progresivní a manifestní.

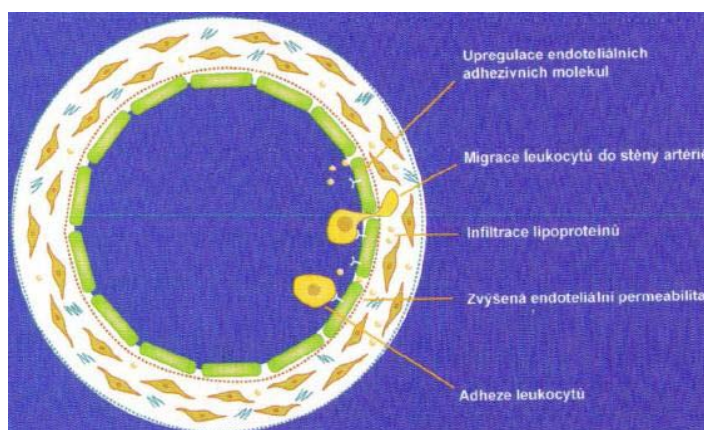
4.1.1 Iniciace aterosklerózy

Zánětlivý proces je v arteriální stěně iniciován především aktivitou buněk přirozené imunity. Ty identifikují pro ně nebezpečně struktury prostřednictvím svých receptorů označovaných jako PRP. Tato identifikace pak stimuluje buňky přirozené imunity k tvorbě prozáněťových cytokinů a mediátorů (13).

Klíčovou úlohu v tomto ději sehrávají chemicky modifikované lipoproteiny LDL. Ty jsou modifikovány buď enzymaticky, nebo oxidativně. Molekuly LDL sami o sobě významně nepronikají přes endotelovou vrstvu cév. Zdravá výstelka je pro tyto částice relativně nepropustná. Je-li však negativně ovlivněna, stává se pro ně propustnou, a to hlavně v oblastech odstupů větví cév či v místech zakřivení. Tam je totiž proudění krve narušeno a buňky tak prodělávají morfologické a funkční změny. V těchto místech je endotelová výstelka pro makromolekuly propustná.

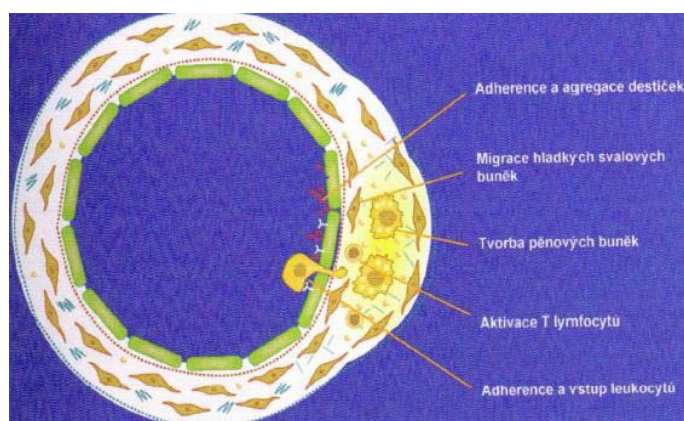
Iniciaci aterosklerotického procesu představuje akumulace LDL v intimě arterií. Zde se zachycují prostřednictvím apolipoproteinu B na proteoglykanech mezibuněčné hmoty (obr. 5).

Obrázek 5 - Iniciale aterosklerózy (Češka et al, 2006)



Jsou-li LDL částice oxidovány, podporují expresi adhezivních molekul na povrchu endotelových buněk a leukocytů (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin). Tím se zajistí adheze leukocytů na aktivovaný endotel. Adherované bílé krvinky potom dále migrují do subendotelové vrstvy (obr. 6). Jejich usměrněný pohyb je regulován prostřednictvím chemokinů, jejichž tvorba je rovněž stimulována ox-LDL. Leukocyty stimulované ox-LDL lokálně uvolňují prozánětlivé mediátory, např. leukotrieny a prostaglandiny. Navíc akumulované buňky zánětu tvoří v místě vysoce reaktivní kyslíkové mediátory, které zesilují oxidační stres a prohlubují tak intenzitu chemických modifikací vlastních struktur (14).

Obrázek 6 - Migrace buněk během iniciační fáze aterogeneze (Češka et al, 2006)



K pochopení iniciace aterosklerotického zánětového procesu přispěla i znalost působení tzv. koncových produktů glykace – AGE. Jako AGE jsou označovány neenzymaticky glykované nebo oxidované proteiny, lipidy a nukleové kyseliny, které jsou tvořeny v prostředí oxidativního stresu a hyperglykemie. K jejich tvorbě dochází ve zvýšené míře za patofyziologických okolností, jakými jsou diabetes mellitus, kouření, obezita.

AGE jsou schopny stimulovat prozánětlivé mechanismy v buňkách imunitního systému, ale i v jiných buněčných typech. Jejich prozánětlivé působení se uskutečňuje prostřednictvím specifického receptoru označovaného jako RAGE. Receptory RAGE jsou spolu s dalšími vyjádřeny na buňkách monocyto-makrofágové linie. Kromě těchto buněk jsou však vyjádřeny i na buňkách hladké svaloviny a na buňkách endotelu. Právě migrace buněk hladké svaloviny z medie do intimy, kde proliferují, je zřetelným dokladem progresu aterosklerózy (15).

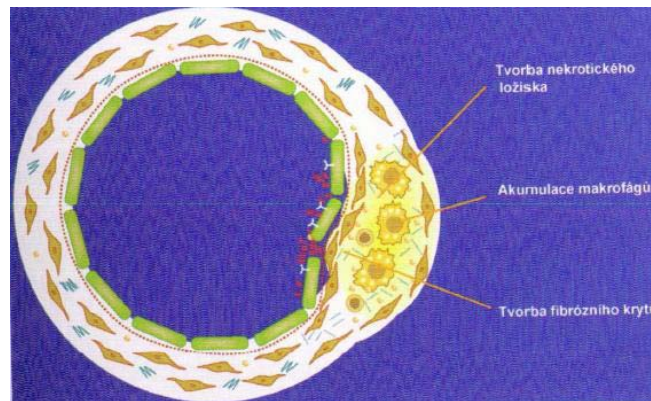
Charakteristickým rysem aterosklerotické léze je akumulace monocytových buněk, které pronikají do intimy z cévního řečiště pod vlivem chemotaktických a prozánětových cytokinů. Tyto buňky se in situ proměňují v makrofágy a vychytávají prostřednictvím povrchových receptorů enzymaticky remodelované nebo oxidované molekuly LDL. Akumulace modifikovaných lipidů v makrofázích působí jejich přeměnu v buňky pěnové. Ty postupně podléhají apoptóze působením solubilních proapoptických molekul (TNF) i prostřednictvím membránových interakcí zprostředkovaných vazbou proapoptických molekul (Apo/FasL) na receptory (Apo/Fas) (16).

Úloha apoptózy v aterogenezi je protichůdná. Zvýšená apoptóza, která prokazatelně probíhá v buňkách hladké svaloviny, prohlubuje tíži procesu. Naopak, pokud apoptózou preferenčně zmírají buňky zánětového infiltrátu, proces se zpomaluje. Výsledkem apoptózy, ale také nekrózy pěnových buněk je akumulace extracelulární buněčné drti bohaté na lipidy.

4.1.2 *Fáze progresu*

Vytvoření aterosklerotického plátu je charakteristické pro fázi progresu aterosklerózy. Jeho tvorba je výsledkem komplexních interakcí buněčných a nebuněčných složek zánětu. (obr. 7)

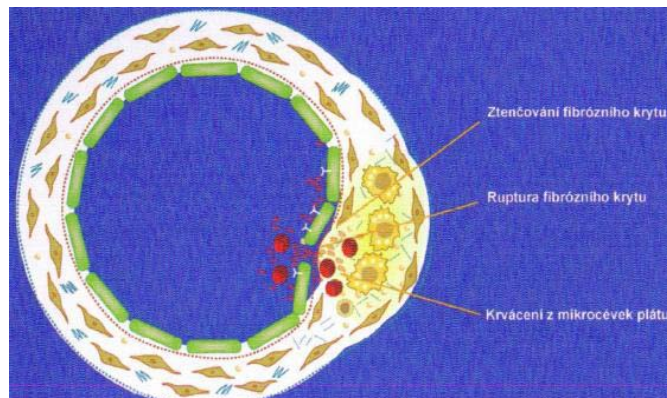
Obrázek 7 - Fáze aterosklerotické progresu (Češka et al, 2006)



4.1.3 *Terminální fáze aterosklerózy*

Aterosklerotický plak, který vzniká léta či desetiletí, postupně zužuje průsvit cévy, což může vést až k ischemii postiženého orgánu. Dalšími následky jsou ztuhnutí cévní stěny a vznik trombů, které uzavírají zbylý arteriální průsvit a mohou způsobit embolizaci v periferním řečišti. Dalším následkem může být krvácení do plátů a do cévní stěny (17). (obr. 8)

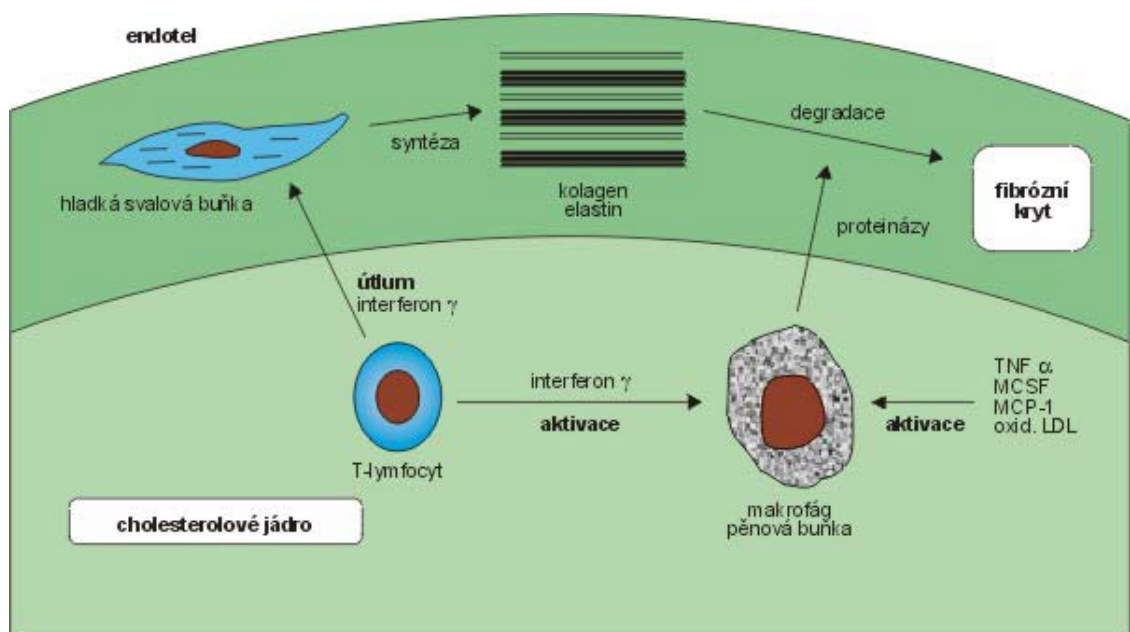
Obrázek 8 - Terminální fáze aterosklerózy (Češka et al, 2006)



4.2 Struktura aterosklerotického plátu

Aterosklerotický plát se sestává z lipidového protrombogenního jádra, pokrytého směrem k cévnímu lumen fibrózním krytem. Ten odděluje lipidové jádro od endotelu a lumen cévy. Fibrózní kryt obsahuje hladké svalové buňky a zánětlivé buňky, především makrofágy. Aktivita makrofágů je udržována především pohlcováním oxidovaných LDL částic cestou scavengerových receptorů. Takto aktivované makrofágy produkují cytokiny a růstové faktory. Ty přitahují do intimy buňky hladké svaloviny, které jako jediné mohou syntetizovat kolagenní matrix a vytvářet fibrózní kryt plátu, který izoluje jeho trombogenní lipidové jádro od cirkulující krve (obr. 9). Aktivované makrofágy naopak produkují enzymy, degradující fibrózní kryt (18).

Obrázek 9 - Zjednodušené schéma tvorby a degradace fibrózního krytu (Jindřich Špinar, Jiří Vítkovec a kol., 2003)



Typický zralý aterosklerotický plát sestává ze dvou hlavních komponent: měkkého jádra bohatého na lipidy a tvrdé, na kolagen bohaté sklerotické tkáně, která odděluje lipidové jádro od endoteliálních buněk. Obě složky mají v různých plátech různé zastoupení.

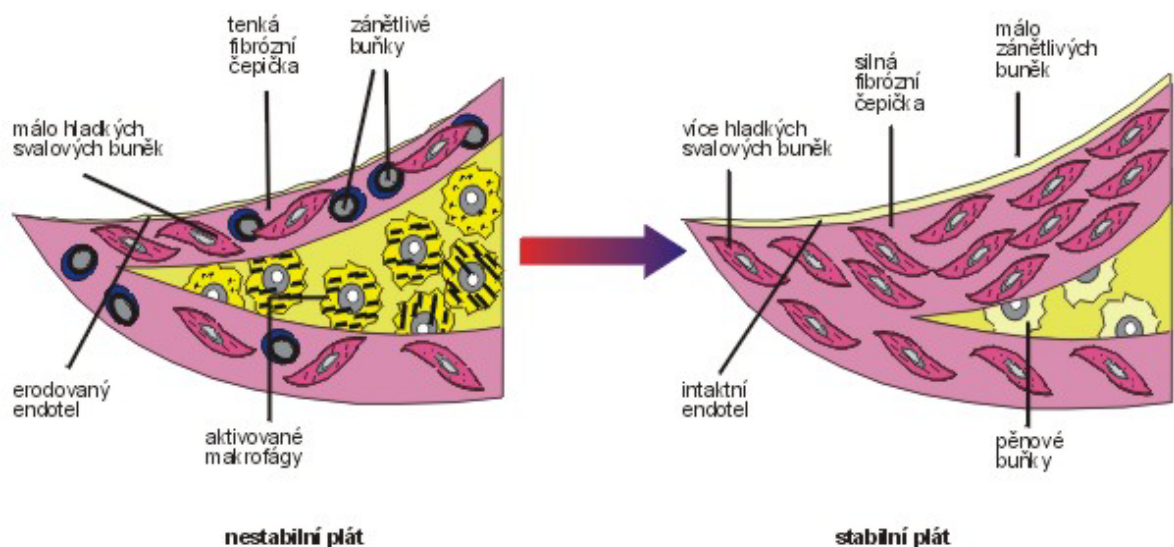
4.3 Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát

Pokud se aterosklerotický plát vyklenuje do cévního lumen, může to mít hemodynamické důsledky na průtok krve za zúžením. O jeho stabilitě však nerozhoduje jeho velikost, ale jeho složení (obr. 10).

Stabilní aterosklerotický plát obsahuje větší množství hladkých svalových buněk a velké množství kolagenu ve fibrózní čepičce, malé lipidové jádro a malé množství zánětlivých buněk (makrofágy, lymfocyty). Fibrózní kryt je poměrně silný a neporušený, tvořený kolagenními a elastickými vlákny a hladkou svalovinou. Její povrch je tuhý. Stabilní pláty bývají většinou starší, často ovlivňují hemodynamiku krevního řečiště a jsou řadu let stálé.

Nestabilní aterosklerotický plát bývá měkký, mívá velké lipidové jádro, složené převážně z esterů cholesterolu, pěnových buněk a T-lymfocytů. Obsahuje velké množství zánětlivých buněk, tenký fibrózní kryt s malým množstvím kolagenu a málo hladkých svalových buněk. Ačkoli nestabilní neboli vulnerabilní pláty tvoří jen malou část aterosklerotických plátů v koronárních arteriích, jsou zodpovědné za většinu akutních koronárních syndromů. Nestabilní pláty bývají „mladé“, hemodynamicky nevýznamné a při angiografickém vyšetření v podstatě nezjistitelné (19).

obrázek 10 - Schéma stabilního a nestabilního aterosklerotického plátu (Jindřich Špinar, Jiří Vítkovec a kol., 2003)



4.4 Stupně vývoje aterosklerózy

Z hlediska morfologického lze rozlišit 6 stupňů rozvoje aterosklerotické léze (tab.2) (20).

➤ Typ I – izolované pěnové buňky

V intimě jsou přítomny skupiny makrofágů, obsahujících v cytoplazmě kapénky lipidů. V intimě koronárních arterií je lze nalézt již v dětském věku.

➤ Typ II – tukové proužky (fatty streaks)

Jde o vrstvu makrofágů změněných v pěnové buňky. Také hladké svalové buňky intimy obsahují kapénky lipidů. Mohou být přítomny i ojedinělé T-lymfocyty (CD4, CD8). Lipidy jsou nahromaděné především intracelulárně (hlavně v makrofázích), ale ojediněle jsou přítomny i intracelulární tukové kapénky. Nejčastěji jde o estery cholesterolu s kyselinou olejovou a linolenovou.

Tukové proužky jsou dvojího typu: IIa, které většinou progredují, a IIb, které neprogredují, progredují velmi pomalu nebo pouze u osob se zvýšenou koncentrací lipoproteinů v krvi. Typ IIa obsahuje více hladkých svalových buněk, extracelulární matrix, makrofágů a pěnových buněk s akumulací lipoproteinů. Tukové kapénky jsou lokalizovány hlouběji v intimě.

99% dětí ve věku 2 – 15 let má v ascendentní aortě tukové proužky. V období puberty jsou již přítomny i v koronárních arteriích.

➤ Typ III

Na rozdíl od typu II je zde přítomen separovaný pool extracelulárně uložených lipidů pod proužky makrofágů a pěnových buněk, který rozštěpuje strukturu hladkých svalových buněk v intimě. Tyto lipidy obsahují více volného cholesterolu, mastných kyselin, sfingomyelinu, lysofosfatidylcholinu a triacylglycerolů než typ II (20).

➤ Typ IV - aterom

Jde o dále vyvinuté stadium III s hustým nahromaděním extracelulárních lipidů, nazývaným lipidové jádro, vzniklé pravděpodobně rozpadem pěnových buněk. Obsahuje krystalky cholesterolu a depozity kalcia. Mezi endotelem a lipidovým jádrem jsou v intimě makrofágy a hladké svalové buňky s kapénkami tuků. Makrofágy jsou spíše v centru, zatímco hladké svalové buňky a lymfocyty spíše na okraji léze. Tento typ léze je často přítomen ve věku kolem 30 let. Ve středně velkých arteriích neovlivňuje významně průtok krve a je proto klinicky němý. V případě fisury a trombózy se ale může projevit klinickými symptomy (20).

➤ Typ V

Tyto léze obsahují vystupující pojivovou tkáň. Obsahují zvýšený obsah kolagenu a hladkých svalových buněk bohatých na endoplazmatické retikulum. Na okrajích lipidového jádra a někdy i v nové pojivové tkáni jsou kapiláry.

Léze typu V může být rozdělena na další podtypy:

- typ Va odpovídá předchozímu popisu, někdy obsahuje i několik lipidových jader, oddělených fibrózní pojivou tkání,
- typ Vb obsahuje kalcifikace v lipidovém jádře nebo v jiné části léze,
- typu Vc chybí lipidové jádro a je jen minimálním depem lipidů.

➤ Typ VI

Jde o lézi typu IV nebo V, která je modifikována disrupcí povrchu, hematodem, hemoragií nebo trombózou, která může vést k uzavěru cévy. Trombóza, nasedající na aterosklerotickou lézi, je v naprosté většině případů příčinou akutních koronárních symptomů: infarktu myokardu, nestabilní anginy pectoris nebo náhlé smrti. Dojde-li k ruptuře aterosklerotické léze, jsou krevním složkám vystaveny subendoteliální struktury, což ovlivňuje koagulační kaskádu a agregaci trombocytů s tvorbou trombu. Některé

tromby neuzavírají arterii a jsou inkorporovány do aterosklerotické léze. Pokud ale trombus narůstá a uzavírá průsvit arterie, dochází k rozvoji ischemie (9).

Tabulka 3 - Podrobná klasifikací dle American Heart Association (Češka et al, 2006)

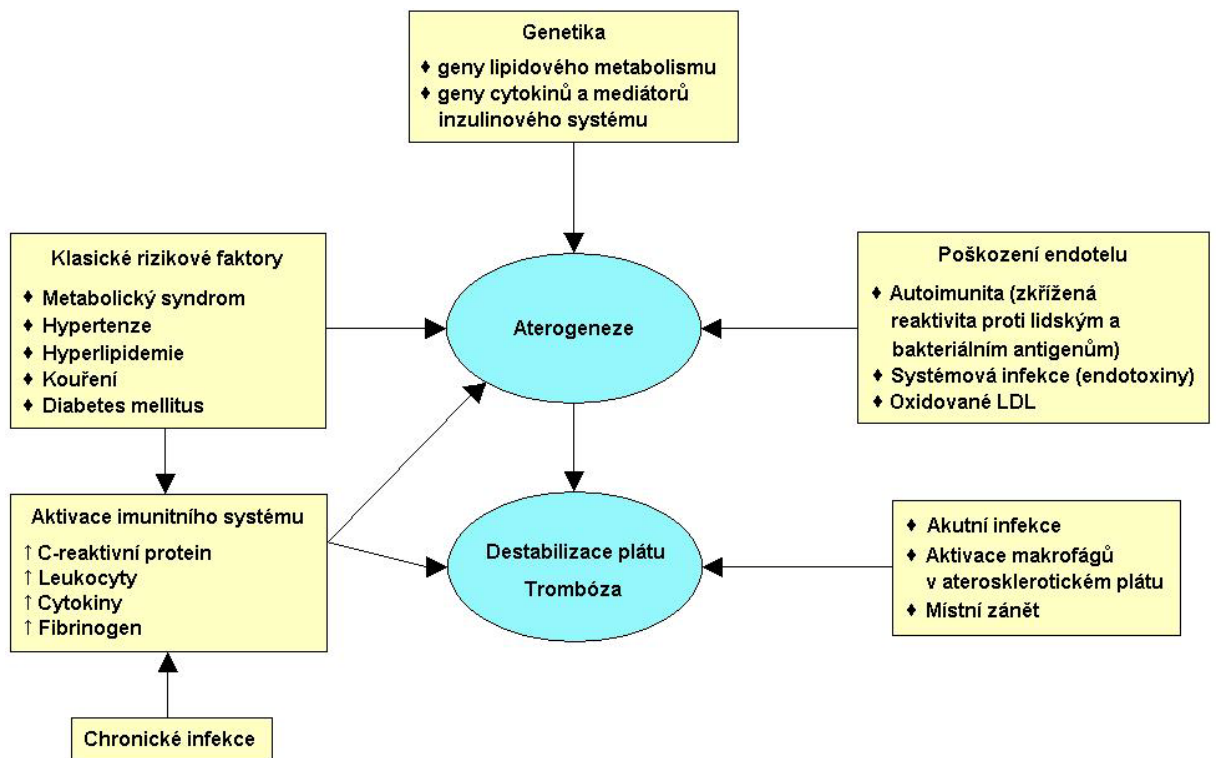
Nomenklatura a histologie	Typy lézí	Hlavní mechanismy růstu	Předčasný nástup	Klinická korelace
Typ I (iniciální): izolované pěnové buňky z makrofágů Typ II (tukové proužky): intracelulární akumulace lipidů Typ III (přechodné): změny typické pro typ II, malá extracelulární depozita tuků Typ IV (aterom): změny typické pro typ II, extracelulární lipidové jádro Typ V (fibroaterom): lipidové jádro a pojivová vrstva, nebo vicenásobná lipidová jádra a pojivové vrstvy, nebo převážně kalcifikace, nebo převážně pojivo Typ VI (komplikované): defekt povrchu, hematom - hemoragie, trombus		akumulace tuků nárůst hladké svaloviny a kolagenu trombóza, hematom	první dekáda třetí dekáda čtvrtá dekáda	Klinicky němé Klinicky němé nebo manifestní

4.5 Rizikové faktory aterosklerózy

Na vzniku aterosklerózy se podílí řada faktorů (obr. 11). Již mnoho let se hovoří o zvýšené koncentraci cholesterolu a triacylglycerolů v krevní plazmě, o diabetu typu II, inzulinové rezistenci, vysokém krevním tlaku, obezitě, kouření, nízké fyzické aktivitě, genetických predispozicích, pohlaví apod. Tyto faktory ovlivňují výskyt ischemické choroby srdeční, cévních mozkových příhod a ischemické choroby dolních končetin. Podle všeho by tedy neměl být problém určit na základě těchto rizikových faktorů riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

Toto určování je však mnohem složitější. V praxi je nacházena ateroskleróza i u lidí, jejichž riziko je podle skórových tabulek vypočteno jako velice nízké. Je pravděpodobné, že všechny možné příčiny rozvoje tohoto onemocnění ještě nejsou známy nebo že ještě není zcela známo jejich vzájemné působení (12).

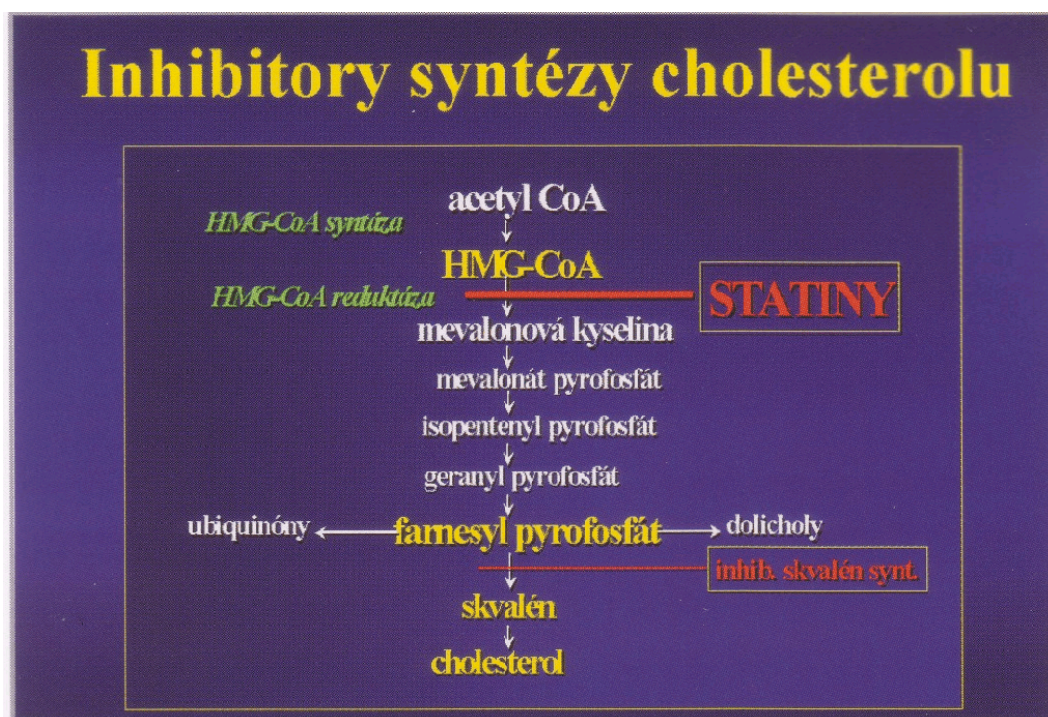
Obrázek 11 - Rizikové faktory rozvoje aterosklerózy a jejich vzájemné působení



5. FARMAKOTERAPIE

Nejúčinnější cestou, jak ovlivnit nepříznivé hodnoty lipidového spektra, zejména hladinu LDL cholesterolu, je blokáda syntézy cholesterolového jádra. Zabrzdit syntézu je nutné již v časných fázích steroidogeneze tak, aby nedošlo k nežádoucímu hromadění prekursoru. V praxi jsou užívány inhibitory hydroxymethylglutaryl-koenzym A reduktázy - statiny a ve vývoji jsou inhibitory skvalénsyntázy, inhibující poslední větev syntézy cholesterolu a neovlivňující tvorbu ostatních produktů řetězce steroidogeneze (21). (obr. 12)

Obrázek 12 - Schéma působení statinů jako inhibitorů syntézy cholesterolu (Pace NEWS 3/2004)



5.1 Hypolipidemika

Hypolipidemika lze rozdělit podle vlivu na jednotlivé složky lipidového metabolismu (9).

1. Léky snižující hladinu cholesterolu:

- statiny
 - 1. generace (přírozené): lovastatin, pravastatin, simvastatin
 - 2. generace (syntetický ramecát): fluvastatin
 - 3. generace (syntetické): atrovastatin
- pryskyřice
- cholestyramin, colestipol
- probucol.

2. Léky ovlivňující jak cholesterol, tak i triacylglyceroly:

- fibráty
- benzařibrát, ciprořibrát, fenofibrát, gemřibrořil
- kyselina nikotinová a její deriváty
- acipimox.

5.2 Statiny

Statiny jsou inhibitory hydroxymethylglutaryl-koenzym A reduktázy.

Blokováním reduktázy HMG-koenzymu A v hepatocytech dochází k útlumu syntézy cholesterolu a tím k indukci tvorby LDL-receptorů. Zvýšením exprese LDL-receptorů na povrchu hepatocytů dochází ke zvýšení vychytávání lipoproteinů LDL z krve a tím ke snížení LDL cholesterolu.

Statiny také mírně snižují TAG (v závislosti na jejich dávce) a mírně zvyšují HDL cholesterol (nezávisle na dávce) (22).

Statiny jsou velmi účinná a dobře tolerovaná hypolipidemika především ke snížení LDL cholesterolu. Výsledky intervenčních studií prokázaly, že v sekundární prevenci ICHS u nemocných s izolovanou hypercholesterolemií snižují kardiovaskulární i celkovou mortalitu, riziko cévních mozkových příhod a klaudikačních potíží a navozují regresí koronární aterosklerózy.

V primární prevenci ICHS:

- u mužů s vysokým rizikem ICHS ve věku 45–64 let s izolovanou hypercholesterolemií snižují kardiovaskulární i celkovou mortalitu,
- u mužů (45–73 let) i žen (55–73 let) ve vysokém riziku ICHS se zvýšením LDL cholesterolu a snížením HDL cholesterolu snižují riziko dalších koronárních příhod (4).

5.2.1 Mechanismus účinku

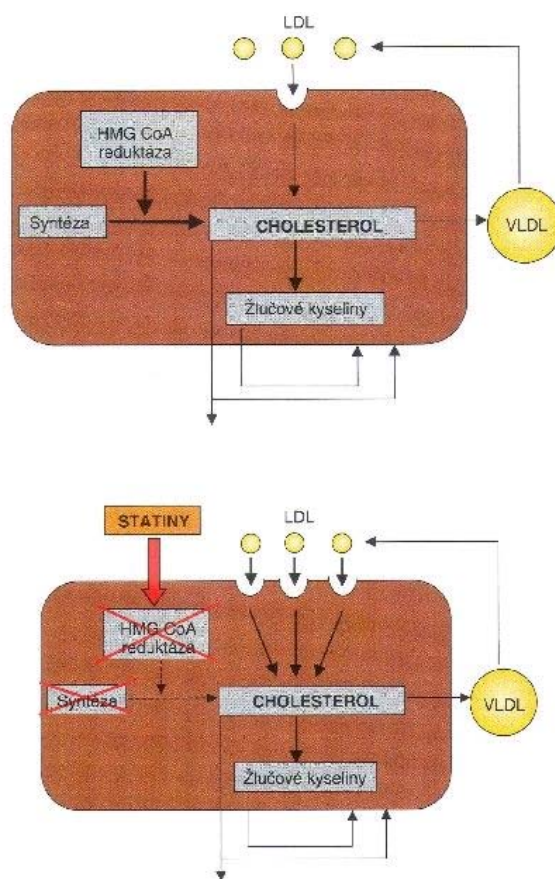
Statiny tlumí syntézu cholesterolu v buňce „*de novo*“ inhibicí klíčového enzymu v syntéze cholesterolu. (obr. 13)

Cílovým orgánem statinů jsou játra. Inhibice syntézy cholesterolu vede ke zvýšené expresi LDL receptorů a tím ke zvýšenému vychytávání LDL z krve. To vede k poklesu LDL cholesterolu, v důsledku deplece cholesterolu v hepatocytu pravděpodobně mírně klesá i syntéza VLDL a je zvýšená clearance částic bohatých na triglyceridy cestou apoB/E receptorů (23).

Tabulka 4 - Účinek statinů na lipidové spektrum

Krevní lipidy	Změna
Celkový cholesterol	↓ 20 – 30%
LDL cholesterol	↓ 20 – 40%
HDL cholesterol	↓ 5 – 10%
Triacylglyceroly	↓ 5 – 20%

Obrázek 13 - Mechanismus účinku statinů (Suržin, Ledvina, 2002)



Dominantním účinkem statinů je snížení LDL cholesterolu a tím i celkového cholesterolu. Současně mírně klesají triglyceridy a mírně se zvyšuje HDL cholesterol. (tab. 4)

Účinek na krevní lipidy se liší podle druhu a dávky použitého statinu a podle typu DLP před zahájením léčby. Významně klesá koncentrace apolipoproteinu B100, mírně se zvyšuje apolipoprotein A I. Vliv na omezení tvorby malých LDL je menší, než u fibrátů.

5.2.2 Pleiotropní (nelipidové) účinky statinů

Podle současných znalostí mají statiny kromě účinků na krevní lipidy i další příznivé efekty, které se mohou podílet na zlepšení prognózy nemocných s DLP a s aterosklerózou.

Tlumí zánětlivou a imunitní reakci v aterosklerotickém ložisku a ovlivňují v něm proliferaci hladkých svalových buněk a extracelulární matrix (19). To přispívá ke stabilizaci aterosklerotického plátu, i když pro stabilizaci plátu je nepochybně zásadní snížení LDL cholesterolu v krvi a v aterosklerotickém ložisku. Některé statiny omezují i riziko trombogeneze – tlumí syntézu PAI-1, trombomodulinu a tromboxanu B2 (24).

Zlepšují funkci cévního endotelu, zvyšují syntézu oxidu dusnatého (NO) a zlepšují vazodilataci závislou na kyslíčnicku dusnatém. Na těchto efektech se do jisté míry může podílet také samotný pokles LDL cholesterolu, nicméně v experimentech byl prokázán i přímý vliv statinů bez zprostředkování snížením LDL cholesterolu.

V poslední době byl prokázán příznivý vliv statinů na kostní denzitu a snížení rizika fraktur. U transplantací oddalují rejekci a zlepšují přežívání graftu. Diskutován je i jejich antineoplastický efekt (25).

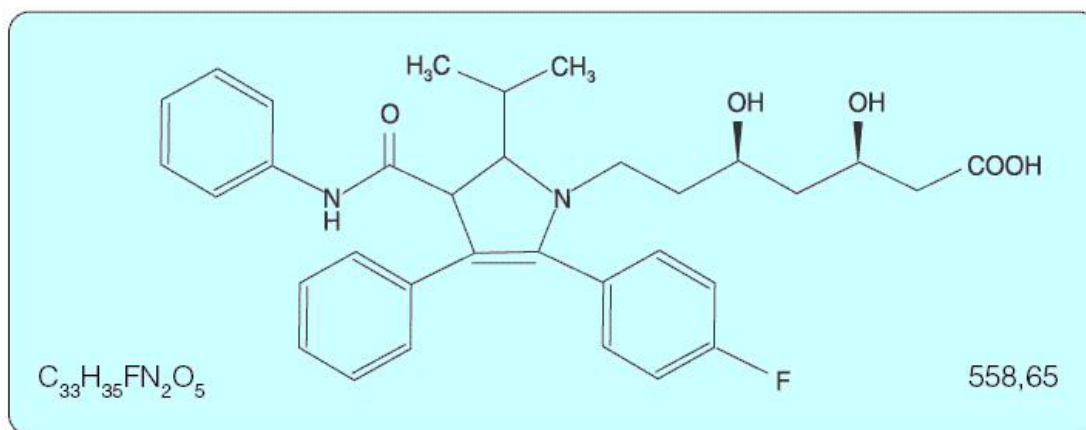
Pleitropních účinků statinů je celá řada, nejen ty výše vyjmenované, nejsou ale všem statinům společné a jednotlivé preparáty se v nich liší. Z hlediska prevence kardiovaskulárních komplikací a léčby DLP je však zásadním a nejdůležitějším účinkem statinů snížení koncentrace LDL cholesterolu.

5.3 Atorvastatin

Atorvastatin se poprvé podařilo připravit v srpnu 1985 výzkumníkům firmy Warner Lambert. Do té doby byla statinovou velmocí firma Merck (lovastatin, simvastatin). V roce 1987 podala firma Warner Lambert první patent syntézy atorvastatinu vápenatého a tento nový statin byl posléze formulován do pevné lékové formy a v roce 1997 uveden na trh pod názvem Lipitor 4 (26).

V současné době existuje několik způsobů výroby hemivápenaté soli atorvastatinu, jejich jednotlivých meziproduktů, ale i jiných solí, které se však v praxi nevyužívají.

Obrázek 14 - Strukturální vzorec atorvastatinu
(Doc. MUDr. Richard Češka, CSc., MUDr. Karel Urbánek, Ph.D., 2004)



5.3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Atorvastatin je chemicky 7-[3-fenyl-4-fenylkarbamoyl-2-fluorfenyl-5-(2-propyl)pyrrol-1-yl]-(2R,4R)-2,4-dihydroxyheptanová kyselina.

Strukturální vzorec: $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ (atorvastatin – obr. 14)

$C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10} \cdot 3H_2O$ (atorvastatinum calcicum trihydricum).

Molekulová hmotnost: 558,65 (atorvastatin)

1209,41 (atorvastatinum calcicum trihydricum).

V přípravku je atorvastatin obsažen ve formě trihydrátu vápenaté soli, přibližně 10,824 mg atorvastatinum calcicum trihydricum odpovídá 10,0 mg volné kyseliny atorvastatinu.

Trihydrát vápenaté soli atorvastatinu je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, nerozpustný ve vodě při pH 4 a nižším, velmi těžce rozpustný v destilované vodě (s neutrální reakcí), ve fosfátovém pufru o pH 7,4 a v acetonitrilu, těžce rozpustný v ethanolu, snadno rozpustný v methanolu.

5.3.2 *Mechanismus účinku*

V lidském organismu je cholesterol nezbytnou součástí buněčných membrán a plní důležité fyziologické funkce.

Atorvastatin je kompetitivním inhibítozem 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, enzymu katalyzujícího přeměnu HMG-CoA na mevalonovou kyselinu. Tato reakce limituje rychlost syntézy endogenního cholesterolu v lidských hepatocytech. Důsledkem takto vyvolaného poklesu intracelulární koncentrace cholesterolu v hepatocytech je zvýšená exprese LDL receptorů na jejich povrchu, které následně intenzivně vychytávají částice LDL cholesterolu z plazmy. Zpomalení intrahepatální syntézy cholesterolu je také spojeno se snížením rychlosti produkce VLDL a LDL lipoproteinů v játrech.

5.3.3 *Farmakodynamické vlastnosti*

Podávání atorvastatinu u člověka vede k poklesu plazmatických hladin LDL cholesterolu, VLDL cholesterolu, triglyceridů a apolipoproteinu B (27).

Protože HMG-CoA nehraje roli v regulaci hladin triglyceridů, pravděpodobnou příčinou poklesu jejich plazmatických hladin je jednak nedostatek cholesterolu pro syntézu lipoproteinů bohatých na triglyceridy (VLDL), a jednak vychytávání VLDL lipoproteinů zmnoženými LDL receptory při relativním nedostatku LDL částic. V klinických studiích i experimentálně byla také prokázána zvýšená clearance chylomikronových zbytků postprandiálně.

U pacientů s homozygotní familiární hypercholesterolémií s absencí funkčních LDL receptorů je příčinou poklesu plazmatických hladin LDL cholesterolu přímo inhibice syntézy cholesterolu atorvastatinem. Vyšší hypolipidemická účinnost atorvastatinu ve srovnání se staršími statiny je spíše připisována delšímu inhibičnímu působení vůči HMG-CoA reduktáze než síle inhibičního účinku. Snížení celkových hladin LDL cholesterolu je u osob s hypercholesterolémií doprovázeno příznivě působícím posunem

v plazmatickém spektru LDL subfrakcí směrem k větším částicím. Aktivní metabolity atorvastatinu také snižují patologicky zvýšenou oxidabilitu LDL lipoproteinů.

Kromě hlavního hypolipidemického účinku jsou známy i jiné účinky atorvastatinu, které se mohou podílet na jeho příznivém ovlivnění kardiovaskulární morbidity a mortality. Jedná se především o zlepšení funkčních schopností endotelu, které bývají u pacientů s hypercholesterolémií defektní. Endoteliální dysfunkce je dnes považována za významnou úvodní fázi aterosklerózy a její závažnost predikuje následné akutní příhody u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Dysfunkce endotelu je v těsném vztahu s lokálním nedostatkem oxidu dusnatého (NO) uvolňovaného endotelem a zvýšenou produkcí superoxidových aniontů, které degradují NO, dříve než dosáhne cílových buněk cévní hladké svaloviny (21).

V experimentech bylo prokázáno, že atorvastatin zvyšuje produkci NO přibližně dvojnásobným zvýšením aktivity endoteliální NO syntázy, čímž zesiluje relaxaci cévní stěny zprostředkovanou oxidem dusnatým. Pravděpodobně navíc příznivě ovlivňuje endoteliální dysfunkci snížením tvorby volných kyslíkových radikálů.

Význam pro antiaterogenní účinky atorvastatinu má i stabilizace ateromových plátů. Je známo, že v procesu ruptury nestabilního ateromového plátu, který je příčinou akutních příhod u pacientů s ICHS, hraje zásadní roli jeho infiltrace zánětlivými buňkami. Atorvastatin inhibuje infiltraci ateromového plátu zánětlivými buňkami a také tlumí migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny cév. Redukuje též akumulaci cholesterolu v makrofázích, čímž zabraňuje jejich aktivaci.

Zvýšení aktivity NO syntázy trombocytů atorvastatinem vede ke snížení jejich agregability. Tento antiagregační účinek přetrvává i po vysazení atorvastatinu, kdy hypolipidemický účinek už není zřetelný (28).

Dlouhodobé podávání atorvastatinu také zlepšuje významně deformabilitu erytrocytů, a tím zlepšuje reologické vlastnosti krve léčených pacientů. Atorvastatin ovlivňuje i koagulační mechanismy, především snižuje aktivitu faktoru VII a zvyšuje celkovou fibrinolytickou aktivitu plazmy.

Byly také prokázány jeho pozitivní účinky na nelipidové rizikové faktory ischemické choroby srdeční, především snížení plazmatické hladiny CRP, lipoproteinu (a) a pravděpodobně i fibrinogenu.

6. ZVÍŘECÍ MODEL Y ATEROSKLERÓZY

Mnozí výzkumní pracovníci, zabývající se zkoumáním krevních cév, pracují na identifikaci důležitých buněk a molekul, vyskytujících se při jednotlivých stádiích aterosklerózy, stejně jako na faktorech vnějšího prostředí a genetických změnách, jež vytvoření poškození napomáhají. Tyto otázky jsou velmi komplexní a vyžadují proto modely *in vivo* napodobující lidské onemocnění. Pouze experimentální postupy, které se široce odklánějí od onemocnění u člověka, nebo ty, které velmi závisí na *in vitro* systémech, by mohly vést k nesprávným závěrům.

Donedávna měla být aterogeneze studována především na primátech a LDL-receptor-deficientních králících. Bohužel v těchto systémech není možné zajistit dostatečně rozsáhlé počty zvířat. Navíc se ani nehodí ke genetickým analýzám (29).

6.1 Pojmy

Zvíře laboratorní - zvíře známých genetických vlastností, rozmnožované jen pro laboratorní účely.

Zvířecí model - živý organismus, jehož studium dle určitých pravidel dovoluje reprodukovat a analogicky odvozovat chování a vlastnosti organismu člověka nebo jiných živočišných druhů. Jde o modely určené pro studium fyziologických i patologických procesů a zákonitostí.

Zvířecí model nemoci - živý organismus s vrozenou, přirozeně či uměle získanou vadou, poruchou, patologickým procesem, nebo dispozicemi k onemocnění, jehož studium dle přesně vymezených pravidel dovoluje reprodukovat či analogicky odvozovat patologické chování nebo vlastnosti jiného objektu.

6.2 Využití myších modelů při studiu aterosklerózy

Myší modely aterosklerózy mohou poskytovat náhledy na patogenezi lézí, na genetické modifikace a ovlivnění prostředím, hormony či léky při rozvoji tohoto onemocnění. Ačkoli je práce s těmito modely v podstatě na svém počátku, studie vypadají slibně a vydávají uspokojivá data.

Pohled na patogenezi lézí je nyní studovaný na molekulární úrovni. Do studia jsou zahrnuty monocyty i endoteliární buňky, monocytární migrace do subendoteliárního prostoru, pěnové buňky pod vnitřní vrstvou cévní stěny, nekrotizující pěnové buňky, proliferace fibroblastů, stejně jako cytokiny produkované buňkami imunitního systému a jejich receptory, podstatné při progresi poškození.

Tyto studie mohou přinášet důležité informace o molekulách a buňkách typicky se prezentujících při aterosklerotickém poškození. Při dalším křížení myších kmenů mohou být vytvářeny další specifické defekty určitých molekul nebo buněk, stejně jako může být zaznamenáno potlačení či naopak rozšíření aterosklerotického fenotypu (30).

6.3 Vývoj myších modelů

Asi před deseti lety se některé laboratoře pokusily vytvořit aterosklerózu cílenou modifikací identifikovatelných genů.

Myši, jakožto využitelné laboratorní organismy, byly vůči ateroskleróze velmi rezistentní. Při dietě s nízkým obsahem cholesterolu a tukových částic (low-cholesterol, low-fat diet) měli cholesterol na úrovni pod 2,6 mmol/l, převážně obsažený v LDL-frakci a byli bez známek rozvinutí lézí. Nicméně při krmení vysokými dávkami cholesterolu v dietě s vysokým obsahem tuku a s obsahem cholových kyselin (very high cholesterol, high-fat diet containing cholic acid), vystoupil jejich cholesterol k faktoru od 2 do 3, s převahou cholesterolu v non-HDL frakci. Po mnoha měsících této diety se u některých kmenů myši dědila určitá tendence vytvářet zvláštní mateřské pěnové buňky v oblasti

aortálního sinu, jako např. u kmene C57BL/6 (obr. 15), zatímco u jiných kmenů tato tendence chyběla (31).

Obrázek 15 - Myší model C57BL/6 (převzato z www.slaccas.com, 2008)



Křížení citlivých a rezistentních kmenů bylo využito pro určení vnímavého místa v genomu. Velmi bedlivým zkoumáním těchto míst – *ath1* – byl zmapován v chromozomu 1 gen, který sekundárně v největší míře kóduje HDL-apolipoprotein, tedy Apo-AII.

Ačkoli byl zpočátku tento model velmi slibný, měl dvě negativa. První spočívalo v odlišnosti poškození od lidských lézí. Ty se nachází především ve větvích velkých cév a postupně se vyvíjí až do stádia fibrózních plátů. Na rozdíl od myších lézí, které byly malé, vyskytovaly se pouze v oblasti aortálního sinu a dále se již nerozšiřovaly. Druhým problémem byla dieta, nutná k rozvoji poškození. Ta totiž nebyla fyziologická, neboť obsahovala 10-20x více cholesterolu než tzv. Western type diety (skládající se z 0,15% cholesterolu a 21% tuku, odvozeného především z tuku mléka) a navíc nepřirozenou krmnou složku - cholové kyseliny. Tato dieta podporovala vznik a rozvoj chronického zánětlivého stavu u ateroskleroticky citlivě reagujícího kmene C57BL/6, ale ne u kmenů ateroskleroticky rezistentních. To zvyšovalo možnost rozlišení mezi větším sklonem k ateroskleróze jako takové a dietou vyvolaným zánětem. Dietou indukovaný zánětlivý proces by mohl navíc ovlivňovat buňky i cytokiny zapojené do aterosklerotického poškozování cév, i když zatím neznámým způsobem.

V roce 1992 použily dvě laboratoře technologie knock-outování genů k vytvoření ApoE-deficientních myší (32).

Apolipoprotein E, který je primárně vytvářen v játrech, je povrchovou složkou lipoproteinové částice a ligandem pro rozpoznávání lipoproteinů a odstraňování lipoproteinových receptorů.

ApoE-deficientní myši mají tedy zpožděné odstraňování lipoproteinů. Proto i při low-cholesterol, low-fat diet dosahují jejich hladiny cholesterolu k 10,4 – 15,6 mmol/l a to především následkem hromadění chylomikronů a VLDL zbytků obohacených o esterifikovaný a volný cholesterol. Pozoruhodné je i to, že se u těchto myši vytvářejí nejen tukové proužky ve stěnách cév, ale dále se rozšiřují až ve fibrózní plaky a to i v místech typicky zasažených při lidské formě aterosklerózy. Do postižených oblastí začínají být v 5.-6. týdnu přitahovány monocyty z krevního řečiště, které dále migrují skrz endotel. Tukové proužky se objevují po 10. týdnu. Střední stádium, obsahující pěnové buňky a buňky hladkého svalstva se objevuje po 15. týdnech. Fibrózní plaky bývají zaznamenány po 20 týdnech. Skládají se z nekrotického jádra pokrytého fibrinovými vlákny a buňkami hladkého svalstva s elastickými vlákny a kolagenem. U starších myši dochází k výraznému rozvoji fibrózních plaků. Některé pokročilé léze bývají částečně rozloženy na základní buňky s občasným aneurysmatickým uspořádáním a u dalších nastává kalcifikace fibrózní tkáně. Rozsáhlá fibroproliferace může zužovat lumen cévy nebo její průsvit úplně uzavřít. Komplikované léze charakterizované trombózou u těchto myší nebyly pozorovány (32).

Když byly tyto myši krmeny typem diety Western, vystoupila jejich hladina cholesterolu 3-4x a zvýšila se jak rychlost progresu aterosklerotických lézí, tak i jejich velikost.

Další myši modely aterosklerózy byly vytvořeny zavedením dalších mutací do genetické výbavy, čímž opět došlo ke změně v lipoproteinovém profilu.

Povrchové buněčné LDL receptory rozpoznávají apolipoprotein B (apoB) na LDL částicích a apoE na IDL částicích a odstraňují je z krevního oběhu. Tyto částice mají totiž blízký vztah ke vzniku a rozvoji aterosklerotického procesu.

LDL-receptor-deficientní myši mají genetickou změnou navozené vysoké plazmatické hladiny aterogenních lipoproteinů. Při nízkotukové dietě měly tyto myši normální hladiny cholesterolu v plazmě, ale se zvýšenými IDL a LDL frakcemi. Tato odchylka v lipoproteinovém systému je však sama o sobě nedostatečnou příčinou vzniku aterosklerózy. Nicméně pokud byly LDL-receptor-deficientní myši krmeny potravou s vysokým obsahem cholesterolu, obsahující navíc i cholové kyseliny, jejich hladiny cholesterolu se zvýšily nad 39 mmol/l a byla pozorována masivní přítomnost tukových

proužků. Léze, skládající se z tukem vyplněného nekrotického jádra obaleného pěnovými buňkami, byly také pozorovány, ale fibrózní plaky již viděny nebyly. LDL-receptor knock-outované myši, které byly kmeny Western typem diety, měly plazmatické hladiny cholesterolu nad 31 mg/dl a jejich léze tvořily především tukové proužky (30).

LDL-receptor-deficientní myši zajišťují zajímavou alternativu k apoE-deficientnímu kmenu jako k modelu aterosklerózy. Narozdíl od apoE-deficientního kmenu, se u LDL-receptor-deficientních myši nevytváří léze při nízkotukové stravě s nízkým obsahem cholesterolu. Počáteční závislost na velmi vysokých hladinách cholesterolu a přítomnosti cholových kyselin v potravě je právě pro tvorbu lézí problematická, stejně jako neurčitost progresu fibrózních plaků a stupně jejich rozvoje. Pozitivní je, že u LDL-receptor-deficientních myši dochází k aterosklerotickému poškození při Western typu diety a navíc je možné, že při dlouhé době krmení budou tyto myši tvořit plaky, které jsou normálně přítomny při ateroskleróze u lidí.

6.4 ApoE-deficientní a LDL-receptor-deficientní myší modely aterosklerózy

Apolipoprotein ApoE je molekula, jejíž přítomnost na lipoproteinové částici je předpokladem pro odstraňování lipoproteinů pomocí vazby na 2 typy receptorů – na receptory LDL částic a receptory chylomikronových zbytků (33).

K testování této hypotézy byly použity myší modely, u kterých byly homozygotně cíleně narušeny geny buď pro ApoE, LDLr a nebo pro obě molekuly současně.

Tabulka 5 - Výsledky po podávání normální stravy

	ApoE- DEFICIENTNÍ MYŠI	LDL - RECEPTOR DEFICIENTNÍ MYŠI	ApoE- LDLr- DEFICIENTNÍ MYŠI
HLADINY CHOLESTEROLU V KRVÍ	zvýšená hladina	nižší hladina	zvýšená hladina (srovnatelná s ApoE def.)
DISTRIBUCE CHOLESTEROLU	VLDL, chylomikronové remnanty	LDL	VLDL, chylomikronové remnanty

Z tohoto pozorování je možné závěrem říci, že při současné deficienci apoE a LDL receptoru (apoE-LDLr-deficientní double homozygot), se projevuje stejná forma hypercholesterolémie jako u samotné apoE deficiencie (34).

Genetická blokáce katabolismu na cholesterol bohatých lipoproteinů je důležitou příčinou hypercholesterolémie a aterosklerózy u lidí. Prototypem těchto onemocnění je familiární hypercholesterolémie, která je zapříčiněna defektem LDL receptoru, a familiární hyperlipoproteinémie, jejíž příčinou je defekt jednoho z ligandů pro apoE receptor.

K vytvoření myších modelů těchto lidských onemocnění byla použita technika homologní rekombinace embryonálních kmenových buněk, pomocí čehož byla umožněna produkce druhu myší s chyběním apoE lipoproteinu.

Tabulka 6 - Výsledky po podávání stravy vyvolávající hypercholesterolémii

	ApoE- DEFICIENTNÍ MYŠI	LDL - RECEPTOR DEFICIENTNÍ MYŠI	ApoE- LDLr- DEFICIENTNÍ MYŠI
PLAZMATICKÉ HLADINY CHOLESTEROLU	15,6 mmol/l	Nižší hladina	52 mmol/l
DISTRIBUCE CHOLESTEROLU	Chylomikronové remnanty, VLDL, IDL	LDL	Chylomikronové remnanty, VLDL, IDL

Rozdíly výsledků mezi dvěma geneticky modifikovanými kmeny myši vypovídají jasně o tom, že se role apoE a LDLr v metabolismu na cholesterol bohatých částic významně liší (35). Tyto lipoproteiny přechází do oběhu buď ze střeva (chylomikrony) nebo z jater (VLDL). Lipoproteinovou lipázou jsou pak částečně metabolizovány a vznikají tzv. remnanty, nebo také IDL částice. Množství těchto IDL částic je pak vychytáno játry prostřednictvím LDL receptorů. Pokud jsou však LDL receptory poškozeny, např. jako u familiární cholesterolémie homozygotního typu, IDL remnanty jsou v cirkulaci přestavěny na LDL lipoproteiny s receptory pro LDL typickými. Jsou jimi apoE, jež mají k vazbám vysokou afinitu, a apoB-100, jejichž afinita je nižší. To dokazuje, že je apolipoprotein apoE pro odstraňování IDL velmi důležitý, a proto se u lidí s defektem apoE IDL částice shromažďují v cirkulaci i navzdory tomu, že je hladina apoB-100 normální. Naopak lidé s defektem apoB-100 shromažďují ve svém oběhu LDL lipoproteiny, nikoli však IDL (4).

Odstraňování chylomikronových remnantů je tedy procesem velmi komplexním a komplikovaným. Jde totiž o částice obsahující apolipoproteiny apoB-48, které mají nedostatek C-terminálních polovin, což jim znemožňuje vazbu na LDL receptory. Právě proto je odstraňování chylomikronových remnantů závislé téměř výhradně na apolipoproteinu apoE.

Pomocí LDL receptorů je z oběhu odstraňováno jen málo chylomikronových zbytků. Ty se však ani při familiární hypercholesterolémii nehromadí, neboť játra mají zálohový systém, který je schopný tyto částice odstranit, i když LDL receptory chybí. Tento zálohový systém spoléhá na apoE. Důkazem je i to, že k hromadění chylomikronových remnantů dochází u pacientů s III. typem hypercholesterolémie, který je způsobený defektem právě receptoru apoE. Částečné odstraňování remnantů může zprostředkovat LDL receptoru podobný lipoprotein – LRP, který vychytává o apoE obohacené zbytky. LRP však smí pracovat jen v souladu s proteoglykany na povrchu hepatocytů.

Vzhledem k tomu, že se apoE spojuje stejně dobře s LDLr i s LRP, je hladina apoB-48 vyšší u apoE-deficientních myši než u myši s LDLr deficiencí. Naproti tomu mají LDLr-deficientní myši izolovaně zvýšenou hladinu apoB-100. U zvířat, u nichž je současně deficience jak apoE, tak i LDLr, se současně hromadí apoB-48 i apoB-100 (35).

Tabulka 7

	ApoE- DEFICIENTNÍ MYŠI	LDL - RECEPTOR DEFICIENTNÍ MYŠI	ApoE- LDLr- DEFICIENTNÍ MYŠI
APOLIPOPOTEINY	výrazně ↑ apoB-48 mírně ↑ apoB-100	výrazně ↑ apoB-100 mírně ↑ apoB-48	výrazné ↑ apoB-48 i apoB-100

7. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo popsat změny biochemických hodnot lipoproteinů u různých myších modelů aterosklerózy. Dále byly popsány změny parametrů lipidového spektra po podávání atorvastatinu u apoE-deficientních myší a apoE/LDLr-deficientních myší.

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Zvířecí modely

Samice kmene C57BL/6J byly krmeny standardní dietou po dobu 8 týdnů. Tato skupina sloužila jako kontrolní skupina pro stanovení základních hladin lipoproteinů.

8.1.1 Samice apoE-deficientní myši:

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.

8.1.2 Samice ApoE/LDLr-deficientní myši:

I zde 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.

8.2 Předepsaná dieta

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

Všechny 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.

8.3 Vyšetření základního spektra krevních lipidů

U sledovaných zvířecích modelů byly stanoveny hladiny cholesterolu a triacylglycerolů v krevním séru i ve všech lipoproteinových frakcích po provedení ultracentrifugace.

8.3.1 Ultracentrifugace

Metoda separace lipoproteinů pomocí ultracentrifugační techniky je založena na separaci lipoproteinových částic krevního séra na základě jejich rozdílné hustoty. Při postupném použití roztoků solí o různých koncentracích a tedy i hustotách, je možné získat: very-low-density-lipoprotein (VLDL), intermediate-density-lipoprotein (IDL), low-density-lipoprotein (LDL) a high-density-lipoprotein (HDL).

Použitá metodika je zpracovaná pro využití ultracentrifugy OptimaTM MAX-XP od firmy Beckman Coulter®.

Obrázek 16 - Ultracentrifuga Optima™ MAX-XP (převzato z www.beckmancoulter.com, 2008)



8.3.1.1 Zpracování materiálu

Přístrojové vybavení: centrifuga Mini Spin^{plus} (firma Eppendorf, Germany)

ultracentrifuga Optima™ MAX-XP (firma Beckman Coulter®, California).

Roztoky: 0,9% NaCl s 0,01% EDTA
16,7% NaCl s 0,01% EDTA.

Postup: Krev laboratorních myší, sloužících jako model aterosklerózy, se do Eppendorfových zkumavek odebírá jako nesrážlivá.

Po příjmu v laboratoři se krve zcentrifugují na centrifuze Mini Spin^{plus} (1300 x g , 10 minut) a pro další práci se použije jen krevní sérum.

Do polykarbonátové zkumavky se napipetuje 60 – 100 ul séra (dle množství získaného vzorku). K němu se přidá stejné množství 0,9% roztoku chloridu sodného s 0,01% EDTA (poměr 1:1 je vždy nutno zachovat). Zkumavky se pak vloží do vhodného rotoru (velmi nutné je jeho správné vyvážení) a ten následně do ultracentrifugy.

Podmínky ultracentrifugace:

- 1 hodina 30 minut
- 90000 otáček
- 10 °C.

Po zastavení centrifugy se rotor opatrně vyjme, zkumavky se z rotoru vyndají pomocí peanu a pipetou Microliter™ Syringes (firma Hamilton) se ze spodní zkumavky odebere polovina původního objemu směsi. Ta se přenesení do nové centrifugační zkumavky. Ke vzorku se přidá stejná objemová jednotka 16,7% roztoku chloridu sodného s 0,01% EDTA a centrifuguje se za stejných podmínek.

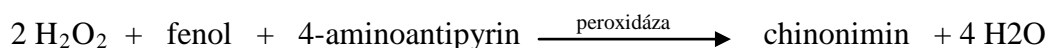
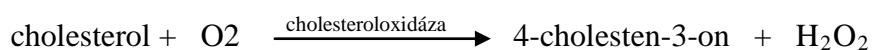
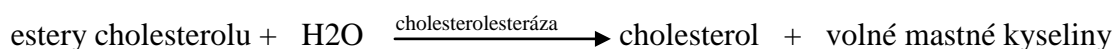
První vrstva, která po první centrifugaci zůstane v centrifugační zkumavce, obsahuje částice VLDL ($d < 1,006 \text{ g/l}$). Po druhé ultracentrifugaci tvoří ve zkumavce spodní část HDL lipoproteiny ($d < 1,063 \text{ g/l}$) a vrchní část lipoproteiny LDL ($d > 1,063 \text{ g/l}$).

V jednotlivých frakcích se následně stanoví požadované parametry, v našem případě koncentrace cholesterolu a TAG.

8.4 Enzymatické stanovení koncentrace cholesterolu v krevním séru

Stanovení koncentrace cholesterolu v krevním séru laboratorních myší bylo prováděno pomocí komerčního setu CHOLESTEROL LIQUID 500 od firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.

Princip metody:



⇒ intenzita vzniklého růžovočerveného zbarvení je úměrná koncentraci cholesterolu

⇒ měření se provádí při vlnové délce 500nm

Přístrojové vybavení: Thermoblok (Shepreth Cambridgeshire SG8 6GB, England)

Minitřepačka Lab Dancer (firma IKA-WORKS, INC., Germany)

UV-VIS SPEKTOFOTOMETR PharmaSpec UV-1700
(firma SCHIMADZU, Japan)

Činidla:

- R1 činidlo (Goodův pufr o pH 6,7 - 50 mmol/l, fenol 5 mmol/l, 4-aminoantipyrin - 0,3 mmol/l, cholesterolesterasa $\geq 3,33 \mu\text{kat/l}$, cholesteroloxidas a $\geq 0,83 \mu\text{kat/l}$, peroxidasa $\geq 50 \mu\text{kat/l}$)
- Kalibrátor – lyofilizované sérum

Postup měření:

	Blank	Standard	Vzorek
Činidlo 1	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Vzorek	-	-	0,01 ml
Kalibrátor	-	0,01 ml	-
Destilovaná voda	0,01 ml	-	-

Po promíchání se inkubuje 10 minut při 37°C. Po té je nutno během 60 minut změřit absorpanci vzorku (A_{vz}) a standardu (A_{st}) proti blanku činidla (A_{bl}).

Výpočet:
$$\text{cholesterol}(\text{mmol/l}) = \frac{A_{vz} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times c_{st}$$

Charakteristiky metody:

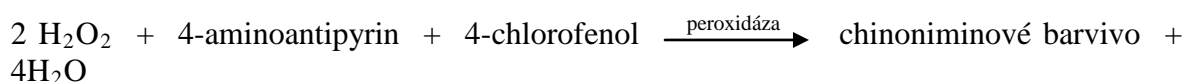
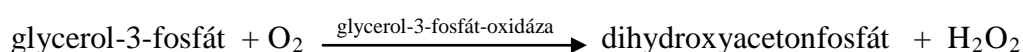
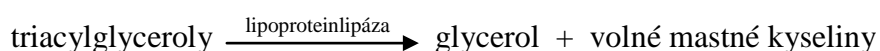
- linearita: do 19,5 mmol/l
- mez detekce: 0,04 mmol/l
- dolní mez stanovitelnosti: 0,14 mmol/l
- pracovní rozsah: 0,14 – 19,5 mmol/l

Interference: kyselina askorbová (do 0,28 mmol/l), bilirubin (do 342 mmol/l), TAG (do 22 mmol/l), hemoglobin (do 2 g/l)

8.5 Enzymatické stanovení koncentrace triacylglycerolů v krevním séru

Stanovení koncentrace triacylglycerolů v krevním séru laboratorních myší bylo prováděno pomocí komerčního setu TRIACYLGLYCEROLY LIQUID 250 S od firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.

Princip metody:



⇒ intenzita růžovooranžového zbarvení je úměrná koncentraci triacylglycerolů v séru

⇒ měření se provádí při vlnové délce 500 nm.

Přístrojové vybavení: Thermoblok (Shepreth Cambridgeshire SG8 6GB, England)

Minitřepačka Lab Dancer (firma IKA-WORKS, INC., Germany)

UV-VIS SPEKTOFOTOMETR PharmaSpec UV-1700
(firma SCHIMADZU, Japan)

Činidla:

- R1 činidlo (Goodův pufr o pH 7,2 - 50 mmol/l, 4-chlorofenol - 4 mmol/l, Mg^{2+} - 15 mmol/l, ATP - 2 mmol/l, glycerolkinasa $\geq 6,7 \mu\text{kat/l}$, peroxidasa $\geq 33 \mu\text{kat/l}$, lipoproteinlipasa $\geq 33 \mu\text{kat/l}$, glycerol-3-fosfát-oxidasa $\geq 8,3 \mu\text{kat/l}$, 4-aminoantipyrin 0,5 mmol/l)
- R2 standard – triacylglyceroly $c = 2,3 \text{ mmol/l}$

Postup měření:

	Blank	Standard	Vzorek
Činidlo R1	1,00 ml	1,00 ml	1,00
Vzorek	-	-	0,01 ml
Kalibrátor R2	-	0,01 ml	-
Destilovaná voda	0,01 ml	-	-

Po promíchání se reakční směs nechá 10 minut inkubovat při 37°C. Po té je nutno během 60 minut změřit absorbanci vzorku (A_{vz}) a standardu (A_{st}) proti blanku činidla (A_{bl}).

Výpočet: $triacylglyceroly (mmol/l) = \frac{A_{vz} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times c_{st}$

Charakteristiky metody:

- linearita: do 11,4 mmol/l
- mez detekce: 0,03 mmol/l
- dolní mez stanovitelnosti: 0,1 mmol/l
- pracovní rozsah: 0,1 – 11,4 mmol/l

Interference: kyselina askorbová (do 0,34 mmol/l), bilirubin (do 684 mmol/l),
hemoglobin (do 2,5 g/l)

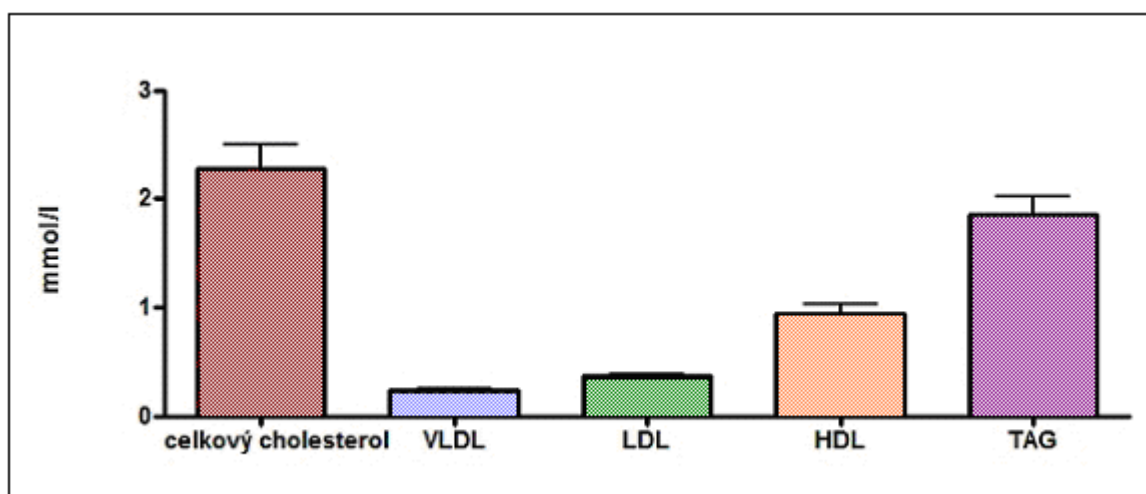
9. STATICKÁ ANALÝZA

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u atorvastatinové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha = 0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 4.0).

9.1 Biochemická analýza u C57BL/6J myši krměných standardní dietou

Biochemická analýza cholesterolu a lipoproteinů ukázala nízké hladiny jednotlivých frakcí cholesterolu. Navíc byl potvrzen literárně známý fakt, že hlavním lipoproteinem u myši je protektivně působící HDL lipoprotein.

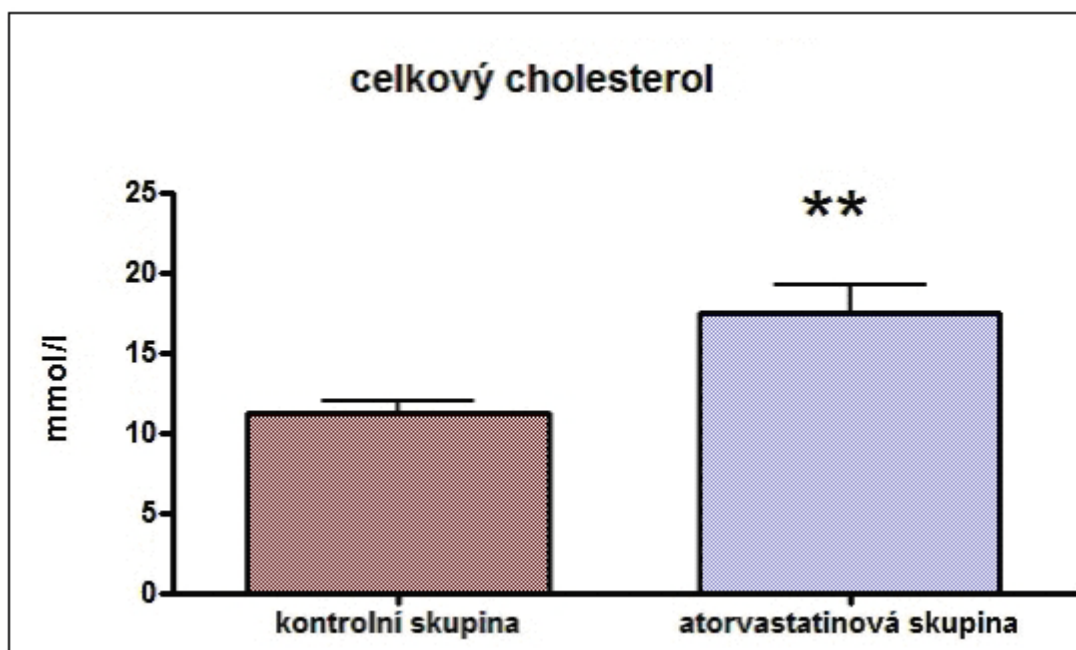
Graf 1 – Hladiny lipoproteinů a triacylglycerolů C57BL/6J – výsledky ukazují na rozložení cholesterolu v jednotlivých frakcích



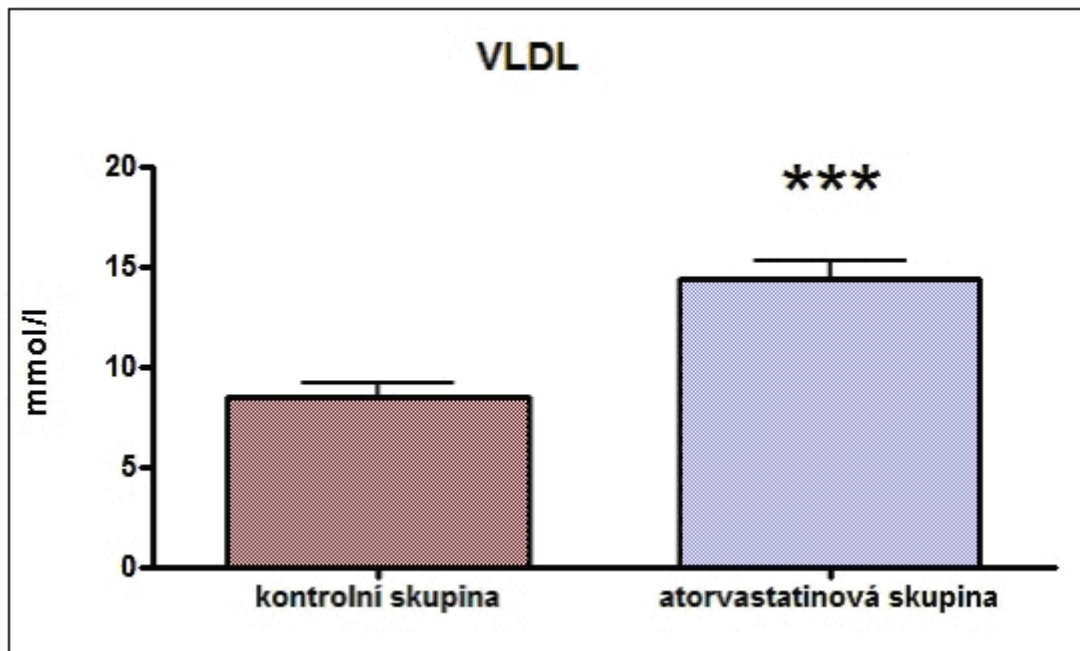
9.2 Biochemická analýza u apoE-deficientních myší:

Podávání vysokotukové diety a ApoE-deficientních myší vedlo k výraznému nárůstu všech frakcí cholesterolu, kromě HDL cholesterolu, který byl snížen. Podávání atorvastatinu překvapivě vedlo k hypercholesterolemickému efektu. 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 zvýšilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL a HDL (viz. graf 2, 3, 4, 6). Pouze triacylglyceroly nebyly podáváním atorvastatinu ovlivněny (viz. graf 5).

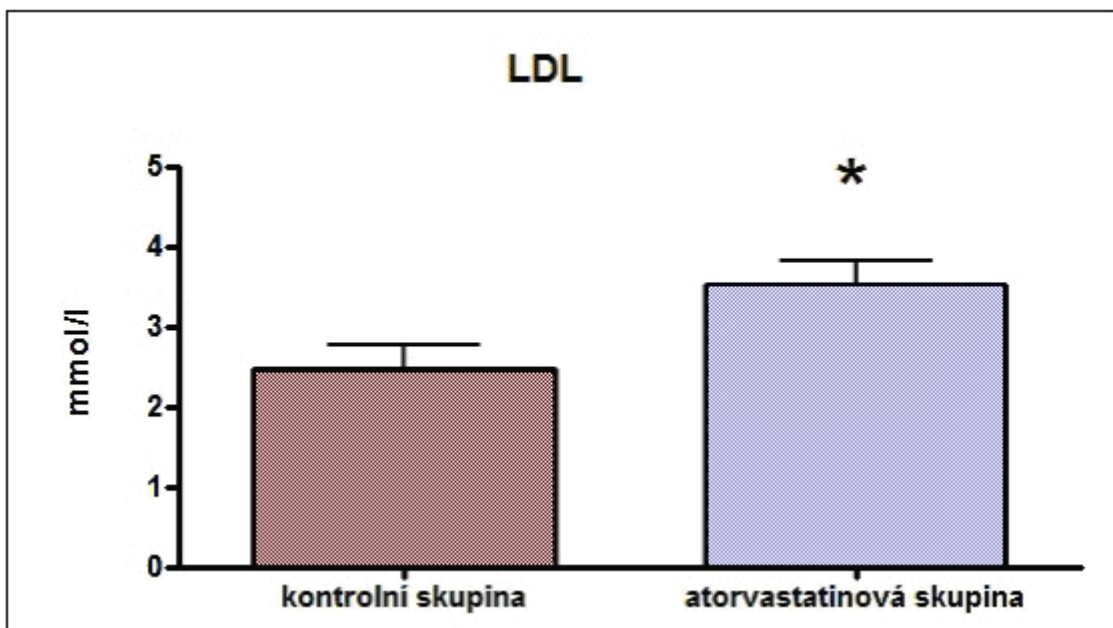
Graf 2 - Hladiny celkového cholesterolu u apoE-deficientních myší. Osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (P<0,01).**



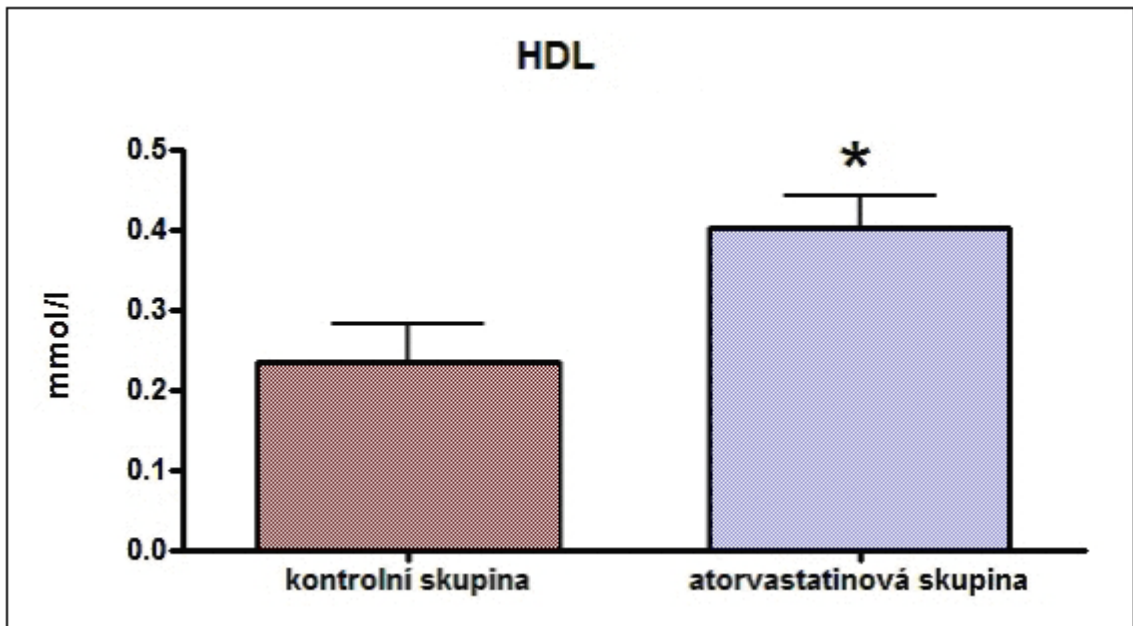
Graf 3 - Hladiny VLDL cholesterolu u apoE-deficientních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (** $P \leq 0,001$).



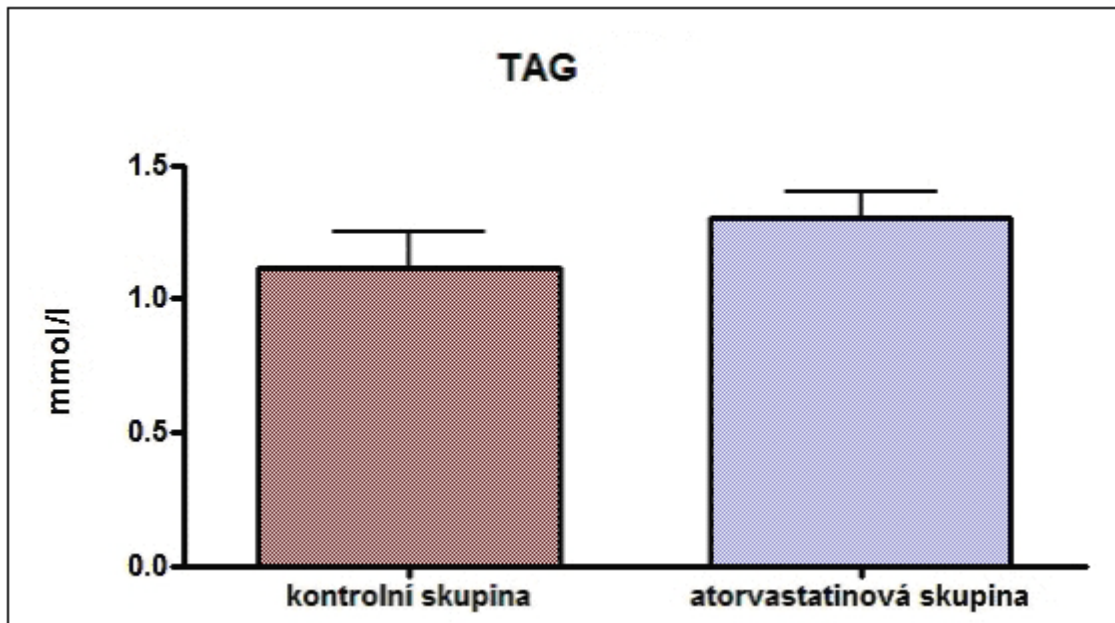
Graf 4 - Hladiny LDL cholesterolu u apoE-deficientních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (* $P \leq 0,001$).



Graf 5 - Hladiny HDL cholesterolu u apoE-deficientních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny HDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (* $P \leq 0,05$).



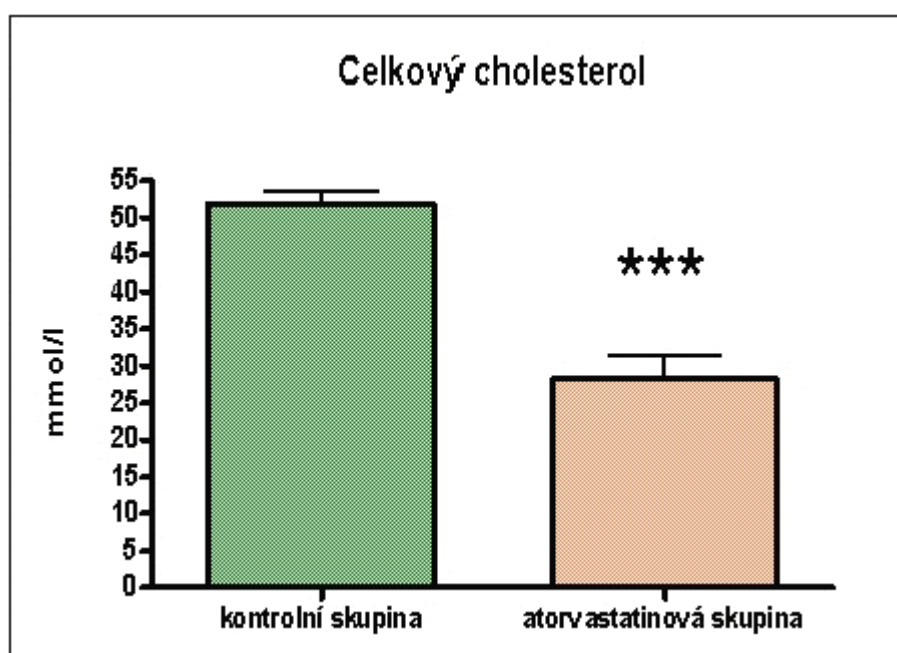
Graf 6 - Hladiny triacylglycerolů u apoE-deficientních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu nevedlo k signifikantní změně hladin TAG.



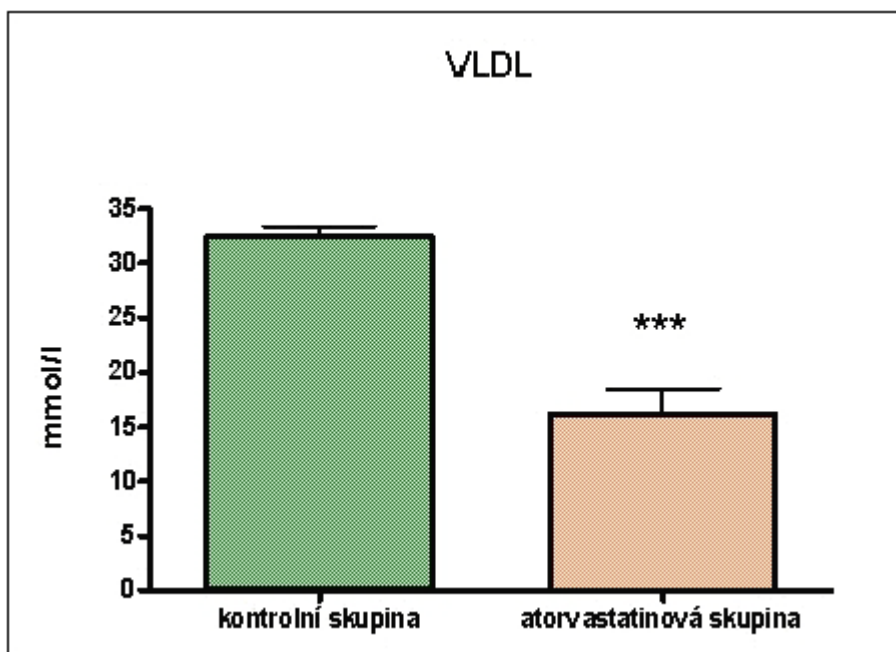
9.3 Biochemická analýza u apoE/LDLr-deficientních myší:

Podávání vysokotukové diety a ApoE/LDLr-deficientních myší vedlo k výraznému nárůstu všech frakcí cholesterolu, kromě HDL cholesterolu, který byl snížen. Podávání atorvastatinu vedlo k výraznému hypolipidemickému účinku. Byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolů. Výsledky prokázaly, že osmítýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL a TAG (viz. graf 7, 8, 9, 11). Navíc bylo zjištěno, že atorvastatin také zvýšil hladiny HDL cholesterolu (viz. graf 10).

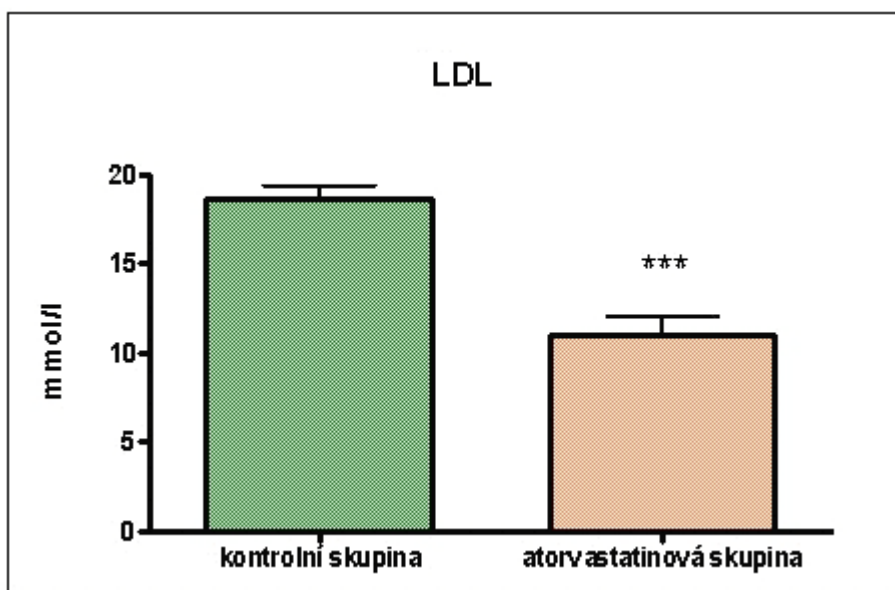
Graf 7 - Hladiny celkového cholesterolu u apoE/LDLr-deficientních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (*) $P \leq 0,001$).**



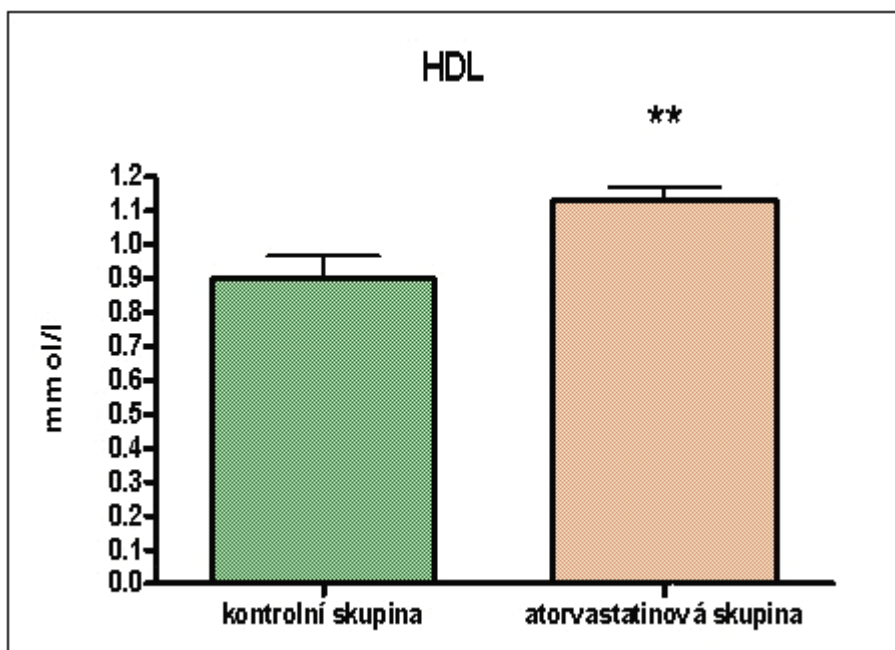
Graf 8 - Hladiny VLDL cholesterolu u apoE/LDLr-deficientních myší. Osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (P≤0,001).**



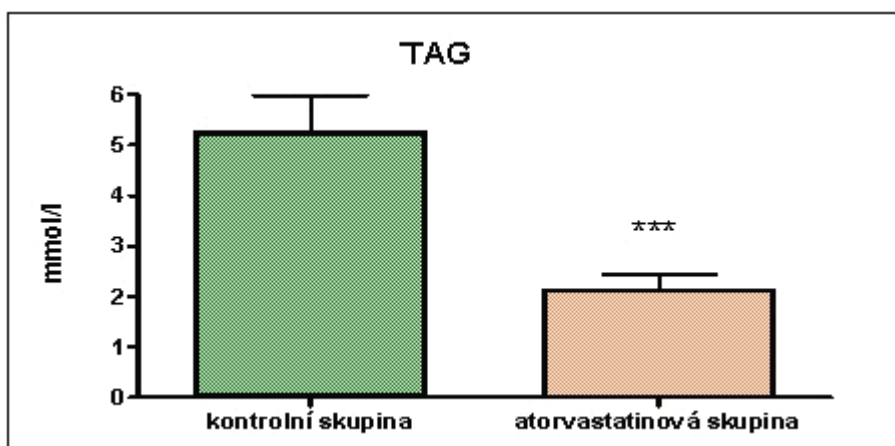
Graf 9 - Hladiny LDL cholesterolu u apoE/LDLr-deficientních myší. Osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (P≤0,001).**



Graf 10 - Hladiny HDL cholesterolu u apoE/LDLr-deficientních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny HDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou (**P≤0,05).



Graf 11 - Hladiny triacylglycerolů u apoE/LDLr-deficientních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou (**P≤0,001).



10. DISKUZE

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. (22). 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 totiž obvykle vůči ateroskleróze vysoce rezistentní. 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 (36).

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. Navíc tato strava vyvolá chronický zánět pouze u citlivých

kmenů myší, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohadů, 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 (37). ApoE jsou tvořeny primárně v játrech a mají je 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 (38).

ApoE/LDL receptor deficientní myši vyvíjejí výraznou spontánní hypercholesterolemii 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 (34).

My jsme se v této diplomové práci zaměřili na sledování vlivu podávání atorvastatinu právě u dvou výše zmiňovaných experimentálních modelů aterosklerózy, apoE-deficientních myší a apoE/LDLr/deficientních myší.

Bylo prokázáno, že genetická modifikace a zároveň aterogenní dieta vedou k nárůstu hladin cholesterolu a změně zastoupení lipoproteinů směrem k výrazně aterogennímu profilu, který je dán zejména zvýšením VLDL cholesterolu a snížením HDL cholesterolu, což je plně se souladu s literárními údaji (29).

Podávání statinů těmto dvěma různým myším modelů aterosklerózy však mělo velmi rozdílné účinky na hladiny cholesterolů. Podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg vedlo k výraznému hyperlipidemickému efektu u apoE-deficientních myší ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky jsou v souladu s některými dalšími literárními údaji u těchto myší, kde 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 (39). Na druhou stranu ale někteří autoři prokázali u tohoto modelu aterosklerózy opačný vliv při podávání statinů. Wang et al. a Bea et al. prokázali hyperlipidemický účinek simvastatinu, který byl navíc doprovázen progresí aterogenních změn u těchto myší (40). Tento efekt statinů apoE-deficientních myší byl později vysvětlován tím, že statiny u těchto myší způsobují tvorbu specifických VLDL lipoproteinů bohatých na cholesterol (41). Výše uvedené výsledky tedy naznačují, že tento kmen není příliš vhodný ke studiu účinku statinů.

Podávání atorvastatinu apoE/LDLr-deficientním myším vedlo k velmi rozdílným výsledkům. 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. Tento efekt podávání statinů u myší je zcela ojedinělý a v literatuře dosud nepopsaný. Navíc další analýza prokázala také výrazné protizánětlivé účinky podávání atorvastatinu u těchto myší (42).

Tyto výsledky tedy naznačují, že apoE/LDLr-deficientní myši by mohly být dobrým modelem pro studium dalších účinků a mechanismů působení statinů.

11. ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na sledování vlivu podávaného atorvastatinu na parametry lipidového spektra u dvou experimentálních modelů aterosklerózy.

Biochemická analýza krve apoE-deficientních myší ukázala, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL a HDL cholesterolu.

Biochemická analýza krve apoE/LDLr-deficientních myší ukázala, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL, TAG a navíc bylo zjištěno, že atorvastatin také zvýšil hladiny HDL cholesterolu.

Tyto výsledky potvrzují do jisté míry některé práce jiných autorů a poukazují na rozdílný efekt podávaných statinů u myších modelů aterosklerózy.

Tyto výsledky tedy naznačují, že apoE/LDLr-deficientní myši by mohly být dobrým modelem pro studium dalších účinků a mechanismů působení statinů.

12. ZKRATKY

AGE	Advanced Glycation End Product
Apo	apolipoprotein
Apo E	apolipoprotein E
Apo/Fas	proapoptotickou molekulou Apo/Fas
Apo/FasL	proapoptotickou molekulou Apo/Fas ligand
CD4, CD8 buněk)	cluster of differentiation (označení antigenů na povrchu
DLP	dyslipoproteinémie
ELFO	elektroforéza
HDL	high density lipoproteins
HMG-coA	hydroxymethylglutaryl-koenzym A
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IDL	intermediate density lipoproteins
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
LDL	low density lipoproteins
LDLr	LDL receptor
Lp(a)	lipoprotein (a)
LRP	LDL receptoru podobný lipoprotein
Ox-LDL	oxidované low density lipoproteins
PAI-1	inhibitor aktivátoru plasminogenu
PRP	Pattern Recognition Receptors
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Product
TAG	triacylglyceroly
Th1 T lymfocyty	pomocné T lymfocyty
TNF	tumor nekrotizující faktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoproteins
WHO	Světová zdravotnická organizace

13. LITERATURA

1. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26, 1999.
2. Lind L: Lipids and endothelium-dependent vasodilation--a review. *Lipids* 37: 1-15, 2002.
3. Hussain MM, Kedeas MH, Singh K, Athar H and Jamali NZ: Signposts in the assembly of chylomicrons. *Front Biosci* 6: D320-31, 2001.
4. Soška V: Poruchy metabolismu lipidů. Grada Publishing, Praha, 2001.
5. Lund-Katz S, Liu L, Thuahnai ST and Phillips MC: High density lipoprotein structure. *Front Biosci* 8: d1044-54, 2003.
6. Ikeda Y and Takagi A: [Genetic disorder causing dyslipoproteinemia]. *Nippon Rinsho* 65 Suppl 7: 128-35, 2007.
7. Geiss HC and Parhofer K: [Diabetic dyslipoproteinemia]. *MMW Fortschr Med* 148: 30-3, 2006.
8. Chan DC, Barrett HP and Watts GF: Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy. *Am J Cardiovasc Drugs* 4: 227-46, 2004.
9. Češka R: Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií. Triton, Praha, 2005, p. 343.
10. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG and Faraci FM: Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2333-40, 1997.
11. Goubergrits L, Affeld K, Fernandez-Britto J and Falcon L: Atherosclerosis and flow in carotid arteries with authentic geometries. *Biorheology* 39: 519-24, 2002.
12. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR and Coresh J: 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: 529-38, 2005.
13. Keaney JF, Jr.: Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 21: 99-166, 2000.

14. Mangge H, Hubmann H, Pilz S, Schauenstein K, Renner W and Marz W: Beyond cholesterol--inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 42: 467-74, 2004.
15. Davignon J and Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: III27-32, 2004.
16. Cybulsky MI, Won D and Haidari M: Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol* 20 Suppl B: 24B-8B, 2004.
17. Najemnik C, Sinzinger H and Kritz H: Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca* 26: 148-53, 1999.
18. Vanhoutte PM: [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 90 Spec No 6: 9-19, 1997.
19. Auer J, Berent R, Weber T and Eber B: Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem* 9: 1831-50, 2002.
20. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1512-31, 1995.
21. Duriez P: [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie* 58: 5-14, 2003.
22. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr. and Basson CT: The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 35: 1-10, 2000.
23. Ikeda U and Shimada K: Pleiotropic effects of statins on the vascular tissue. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 1: 51-8, 2001.
24. Mori S and Saito Y: [Pleiotropic effects of statins]. *Nippon Rinsho* 60: 875-81, 2002.
25. Laufs U and Liao JK: Isoprenoid metabolism and the pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep* 5: 372-8, 2003.
26. Gotto Jr AM, Jr. and Farmer JA: Pleiotropic effects of statins: do they matter? *Curr Opin Lipidol* 12: 391-4, 2001.
27. Emanuele E and Geroldi D: A novel mechanism of action of atorvastatin against cardiovascular risk: a commentary on "decreased plasma soluble RAGE in patients with hypercholesterolemia: effects of statins". *Free Radic Biol Med* 43: 1231-2, 2007.

28. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G and Egido J: Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 147: 253-61, 1999.
29. Breslow JL: Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-8, 1996.
30. Jawien J, Nastalek P and Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-17, 2004.
31. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM and Kooistra T: Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1706-21, 2007.
32. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA and Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-71, 1992.
33. Jawien J, Csanyi G, Gajda M, Mateuszuk L, Lomnicka M, Korbut R and Chlopicki S: Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Eur J Pharmacol* 556: 129-35, 2007.
34. Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L, Olszanecki R, Jakubowski A, Szlachcic A, Korabiowska M and Korbut R: Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 56: 483-9, 2005.
35. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW and Stocker R: Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb J* 13: 667-75, 1999.
36. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D and Williams RA: Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68: 231-40, 1987.
37. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL and Ross R: ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 133-40, 1994.
38. Hofker MH and Breuer M: Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 110: 63-78, 1998.
39. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang PR, Zhang D, Peterson L, Detmers PA, Chao YS

- and Wright SD: Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 115-21, 2001.
40. Bea F, Blessing E, Bennett B, Levitz M, Wallace EP and Rosenfeld ME: Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1832-7, 2002.
 41. Fu T and Borensztajn J: Simvastatin causes the formation of cholesterol-rich remnants in mice lacking apoE. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1172-6, 2006.
 42. Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S and Semecky V: Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci* 82: 708-17, 2008.