

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd



***Sledování vlivu atorvastatinu na expresi markeru TGF-
 β 1 kaskády.***

***The study of atorvastatin effect on the expression of
TGF- β 1 cascade marker.***

Rigorózní práce

Konzultant rigorózní práce:

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Vypracoval:

Mgr. Jan Dvořáček

„Na tomto místě bych si dovolil poděkovat Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD a jeho pracovnímu týmu za pomoc, cenné rady, trefné připomínky a vřelou atmosféru během vypracování této rigorózní práce.“

OBSAH

1. Abstrakt.....	5
2. Úvod.....	7
3. Mikroskopická anatomie cév.....	8
- <i>Artérie.....</i>	<i>9</i>
- <i>Žíly.....</i>	<i>10</i>
- <i>Kapiláry.....</i>	<i>10</i>
4. Ateroskleróza.....	13
- <i>Vznik aterosklerózy.....</i>	<i>13</i>
- <i>Tukové proužky.....</i>	<i>16</i>
- <i>Pokročilé léze.....</i>	<i>17</i>
- <i>Komplikované léze.....</i>	<i>18</i>
- <i>Rizikové faktory.....</i>	<i>20</i>
5. Myší modely aterosklerózy.....	25
- <i>ApoE-deficientní myši (ApoE^{-/-}).....</i>	<i>27</i>
- <i>LDL receptor-deficientní myši (LDLr^{-/-}).....</i>	<i>28</i>
- <i>ApoE/LDL receptor-deficientní myši (ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-}).....</i>	<i>28</i>
- <i>ApoE*3Leiden (E3L) transgenní myši.....</i>	<i>29</i>
6. Význam TGF-β a členů jeho kaskády v aterogenezi.....	30
- <i>Transformující růstový faktor TGF-β.....</i>	<i>30</i>
- <i>TGF-β receptor.....</i>	<i>32</i>
- <i>Endoglin.....</i>	<i>32</i>
- <i>Smad proteiny.....</i>	<i>33</i>
7. Statiny.....	35
- <i>Mechanismus účinku statinů a jejich lipidové účinky.....</i>	<i>35</i>
- <i>Pleiotropní (extralipidové) účinky.....</i>	<i>36</i>
- <i>Atorvastatin.....</i>	<i>38</i>
8. Cíl práce.....	40
9. Experimentální část.....	41
- <i>Pokusná zvířata, předepsaná dieta.....</i>	<i>41</i>
- <i>Biochemická analýza.....</i>	<i>41</i>
- <i>Histologické barvení olejovou červení.....</i>	<i>42</i>
- <i>Imunohistochemie.....</i>	<i>42</i>
- <i>Statistická analýza.....</i>	<i>44</i>

10. Výsledky.....	45
- <i>Biochemická analýza.....</i>	45
- <i>Histologické barvení olejovou červení.....</i>	46
- <i>Imunohistochemická analýza.....</i>	48
11. Diskuze.....	50
12. Závěr.....	52
13. Seznam zkratk.....	53
14. Seznam použité literatury.....	55

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Mgr. Jan Dvořáček

Konzultant: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Název rigorózní práce: **Sledování vlivu atorvastatinu na expresi markeru TGF- β 1 kaskády.**

Cíl práce:

Cílem práce bylo zjistit a popsat expresi fosforylované formy p-Smad2 v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficientních myší a ovlivnění této exprese atorvastatinem bez hypolipidemických účinků.

Metody:

Byly využity apoE/LDL-receptor deficientní samice myší kmene C57BL/6J, u nichž byla provedena biochemická analýza vzorků krve, histologické barvení tkání olejovou červení k detekci lipidů a imunohistochemická analýza segmentů tkáně pocházejících z aorty a horní poloviny srdce. Pro detekci exprese p-Smad2 byla použita metodika avidin-biotin s detekcí pomocí DAB.

Výsledky:

Biochemickou analýzou jsme potvrdili zvýšenou hladinu celkového cholesterolu u myší, které měly ke standartní dietě přidáván atorvastatin, oproti myším krmným pouze standartní dietou. U myší léčených atorvastatinem jsme histologickým barvením olejovou červení detekovali signifikantní pokles velikosti aterosklerotických plátů ve srovnání s neléčenou skupinou. Imunohistochemickou analýzou jsme prokázali expresi p-Smad2 v aterosklerotických plátech obou skupin zvířat. Exprese byla pozorována v médiu cév, v plátu, na chlopních a částečně na cévním endotelu na povrchu plátů. Podávání atorvastatinu obecně zvýšilo expresi p-Smad2 zejména v plátu a na cévním endotelu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Závěr:

Výsledky prokázali, že podávání atorvastatinu v dávce 50 mg/kg/den vedlo ke zvýšení exprese p-SMAD2 bez hypolipidemických účinků, a též vedlo ke snížení velikosti plochy aterosklerotických plátů ve srovnání s kontrolní skupinou.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Mgr. Jan Dvořáček

Consultant: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Title of Thesis: **The study of atorvastatin effect on the expression of TGF- β 1 cascade marker.**

Background:

The aim of this thesis was to establish and describe the expression of phosphorylated form of Smad2 in the atherosclerotic lesions in apoE/LDLr-deficient mice. Moreover we evaluated the effect of atorvastatin on p-Smad-2 expression beyond its lipid lowering effects.

Methods:

Using female mice C57BL/6J strain with a double deficit of apolipoprotein E and LDL-receptor was performed biochemical analysis of blood specimens, histological staining with oil red for detection of lipids and immunohistochemical analysis of aortic sinus. Avidin-biotin method with DAB visualization was used to detect expression of p-Smad2.

Results:

Using biochemical analysis we confirmed increased levels of cholesterol in mice fed standard diet with addition of atorvastatin as compared with mice on standard diet. Histological staining with oil red showed significant decrease in atherosclerotic lesion size in mice treated by atorvastatin as compared with untreated group. We demonstrated expression of p-Smad2 in atherosclerotic plaques by immunohistochemical analysis in both group of mice. The expression was demonstrated in tunica media, in atherosclerotic plaque, in valves and partially in vascular endothelium of plaque surface. The p-Smad2 expression was primarily increased in the plaque and in vascular endothelium in atorvastatin treated mice when compared with control mice.

Conclusion:

The results showed that atorvastatin administration in dose of 50 mg/kg/day led to expression increase of p-Smad2 out of hypolipidemic effect and to atherosclerotic lesion size decrease compared to control group.

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou považována za hlavní příčinu celkové mortality, a to hlavně v průmyslově vyspělých zemích. Za nejčastější příčinu kardiovaskulární mortality je považována ischemická choroba srdeční, která bývá v mnoha případech způsobena koronární aterosklerózou (Vlček 2010).

Ateroskleróza byla kdysi považována za mechanický proces prostého ukládání tuku do cévní stěny. Počátkem devadesátých let začala být ateroskleróza chápána jako chronický proces, na kterém se podílejí prozánětlivé molekuly, cytokiny a růstové faktory. Ateroskleróza je dnes někdy označována jako „nemoc 20. století“, je jednou z hlavních příčin kardiovaskulárních onemocnění (Daubresse 2000).

Aterosklerotický proces probíhá v několika stádiích, které v případě dlouhotrvajícího působení aterogenních faktorů mohou vést až ke vzniku klinických komplikací (Keaney 2000). Často jsou aterosklerotické změny patrné na cévách již v raném dětství, ale ke klinickým projevům zpravidla dochází až mnohem později (Vojáček 2004). Začíná adhezí oxidovaných částic LDL k cévní stěně a končí - většinou asi až o několik desetiletí později - rupturou fibrózní „čepičky“ aterosklerotického plátu, vytvořením trombu a akutní cévní příhodou, infarktem myokardu, nebo ischemickou chorobou dolních končetin. Tyto orgánové komplikace jsou nejčastější příčinou předčasné invalidizace a úmrtí ve většině civilizovaných zemí a jsou jedním z významných sociálních problémů civilizace, spojených se „západním stylem života“. Díky tomuto stylu života bude mít tento zdravotní problém mnohem širší následky zejména během následných desetiletí (Keaney 2000). Arterio- nebo ateroskleróza je dnes příčinou více než poloviny všech úmrtí v západních průmyslových zemích (Silbernagel 2001).

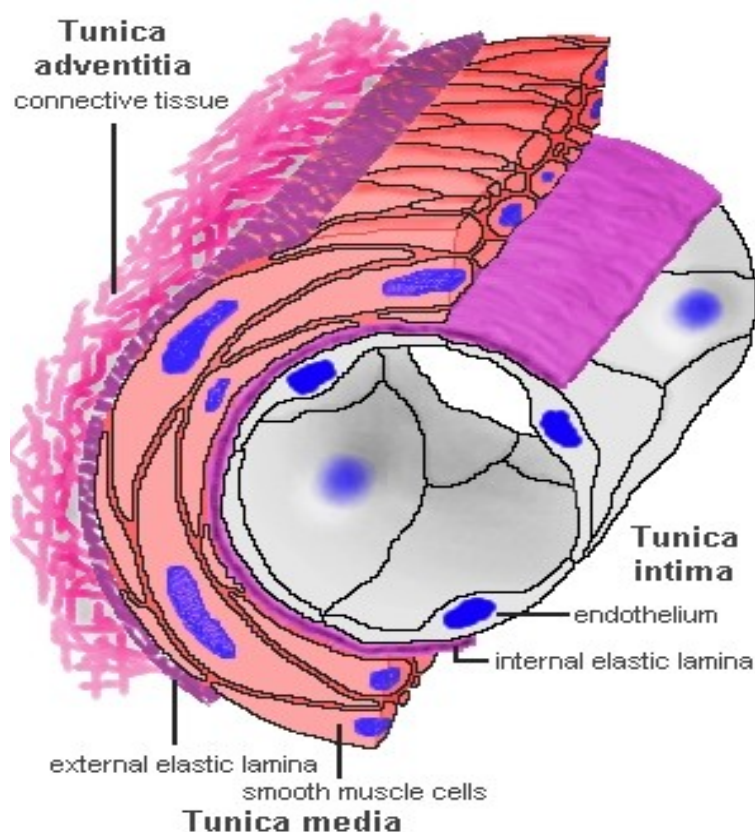
Česká republika se nachází, i přes příznivý vývoj v posledních letech, na jednom z předních míst v Evropě v úmrtnosti populace na choroby srdce a cév. Velkým problémem je stárnutí populace a s tím související zvyšování prevalence kardiovaskulárních onemocnění v populaci (Vaughan 2001).

Přesná příčina onemocnění není známa, proto ani nelze aterosklerózu vyléčit. Farmakologicky ovlivnit lze pouze následky aterosklerózy a rizikové faktory, které se podílejí na jejím vzniku (Vlček 2010). V průběhu posledního desetiletí byl zaznamenán jednoznačný posun v etiologii a patogenezi vzniku aterosklerózy, stejně jako v objasnění úlohy cholesterolu a kardiovaskulárních rizikových faktorů (Vaughan 2001).

Mikroskopická anatomie cév

Cévy jsou trubice, které v lidském těle vedou krev a lymfu. V zásadě jsou složeny z nejnvnitřnější vrstvy (intima) vystlané endotelem, střední části (medie) tvořené hladkou svalovinou a zevní částí (adventicie) (Vokurka 2004).

Obr.1: Histologie cév



http://www.siumed.edu/~dking2/crr/cvguide.htm&usg=__XeMfM_IA1NyvrQx-EtQ17Ib4Nw8=&h=400&w=300&sz=86&hl=cs&start=0&tbnid=Jjq8VdiPMUNyoM:&tbnh=149&tbnw=112&prev=/images%3Fq%3Dvessel%2Banatomy%26um%3D1%26hl%3Dcs%26biw%3D1680%26bih%3D933%26tbs%3Disch:1&um=1&itbs=1&iact=rc&ei=4QpUTJPDJcSesgbhq9ziAQ&page=1&ndsp=45&ved=1t:429,r:22,s:0&tx=64&ty=40

27.červenec 2010

Tunica intima

Je to nejnvnitřnější vrstva cévy, která se bezprostředně stýka s proudící krví (Vokurka 2004). Skládá se z jedné vrstvy endoteliálních buněk, pod níž leží subendoteliální vazivová tkáň. Ploché endotelové buňky ležící na bazální membráně jsou spolu spojeny pomocí zonulae occludentes. Buňky endotelu jsou vysoce

metabolicky aktivní a podílejí se na transportu látek skrz cévní stěnu, mají také dobrou regenerační schopnost. Syntetizují množství látek, mezi nimi i vasoaktivní látky jako je endothelin nebo oxid dusnatý, prostacykliny, cytokiny, růstové faktory, adhezní molekuly a další. Od tunica media je intima oddělena prostřednictvím membrana elastica interna (Baumhoer 2003).

Tunica media

Je to střední vrstva cév, tvořená zejména hladkou svalovinou, ležící vně od intimy (Vokurka 2004). Skládá se z hladkých svalových buněk, kolagenních a elastických vláken. Hladkosvalová vlákna jsou spirálovitě uspořádána. Buňky hladkých svalů medie nemají jen kontraktilní vlastnosti, nýbrž také metabolické a fagocytární (Baumhoer 2003). Mezi medií a adventicií lze ve velkých artériích pozorovat vrstvu membrana elastica externa (Paulsen 2004).

Tunica adventitia

Je to zevní vrstva cévy, která jí spojuje s okolní tkání (Vokurka 2004). Je také nazývaná tunica externa. Je tvořena hlavně kolagenními vlákny a jen málo hladkosvalovými vlákny. Uvnitř procházejí vasa vasorum a nervová vlákna (Baumhoer 2003). Ve vénách je to nejsilnější vrstva (Paulsen 2004).

Výživa tunica intima a vnitřní části tunica media cév s průměrem nad 1 mm je zajištěna difúzí živin z krve. Vnější vrstvy jsou pak zásobovány vlastními cévami – vasa vasorum. V cévní stěně se také nachází komplexní systém vegetativních a senzitivních vláken. Nervové plexy leží většinou mezi vrstvami cévní stěny a podílejí se na regulaci cévního tonu (Baumhoer 2003).

Krevní cévy se dále dělí podle typu a velikosti na artérie, žíly a kapiláry.

Artérie

Artérie je céva, která vede krev od srdce a to zejména ve velkém oběhu pod vysokým tlakem. Tomu odpovídá její stavba – silná svalová vrstva v medii (Vokurka 2004). Rozlišují se dva základní typy: artérie elastického typu a artérie svalového typu.

Artérie elastického typu jsou charakterizovány množstvím elastických vláken v tunica media. Typickým příkladem je aorta a její větve. Aorta má vzhledem

k vysokému mechanickému zatížení silnou intimu a vyvinutou subendoteliální vrstvou, obsahuje kolagenní a elastická vlákna a hladké svalové buňky. Media je velmi široká a je tvořena navzájem propojenými elastickými blankami. Elastické vrstvy jsou spojeny s hladkými svalovými buňkami. Elastické vlastnosti medie vedou ke vzniku odporu proti roztažení cévy a k hromadění energie v cévní stěně. Tato energie je dále využita k udržení kontinuálního toku krve. Tunica adventitia je tenká a obsahuje vlákna kolagenní i elastická (Baumhoer 2003).

Artérie svalového typu obsahují mnohem více hladkosvalových buněk. K tomuto typu patří střední a malé artérie, přičemž malé artérie přecházejí do arteriol (Baumhoer 2003, Linß 1998). Odlišuje se od artérie elastického typu menším zastoupením elastických vláken v medii, kde dominují hlavně hladké svalové buňky. Tunica adventitia odpovídá stavbou elastickým artériím (Linß 1998).

Nejmenší artérie se nazývají arterioly a skládají se z endotelu často bez subendoteliální vazivové tkáně. Media je tenká, tvořená hladkosvalovými buňkami. Tenká adventicie obsahuje kolagenní vlákna (Paulsen 2004).

Žíly

Žíla je céva vedoucí krev k srdci. Tlak v žilách je ve srovnání s tepnami velmi nízký, jejich stěna je podstatně tenčí a poddajnější (Vokurka 2004) Tunica intima má v podstatě podobnou stavbu jako artérie. Media vykazuje většinou regionální rozdíly ve stavbě. Může být tenká a chudá na hladkosvalové buňky (např. žíly v oblasti břicha a krku), naopak žíly rukou a nohou jsou silnější. V medii je obsaženo mnoho kolagenních vláken. Tunica adventitia může být tvořena longitudinální hladkou svalovinou. To platí hlavně pro žíly oblasti břicha (vena cava inferior, vena portae), u kterých je tunica adventitia nejsilnější vrstvou (Lüllmann-Rauch 2006).

Ve středně velkých a velkých žilách jsou vytvořeny žilní chlopně, což jsou výběžky intimy do lumina. Jejich funkcí je usměrňování toku krve směrem k srdci. Jako venuly jsou označovány žíly s malým průměrem pod 0,5 mm a jsou pokračováním kapilár. Žilní chlopně u nich nejsou vyvinuty (Baumhoer 2003).

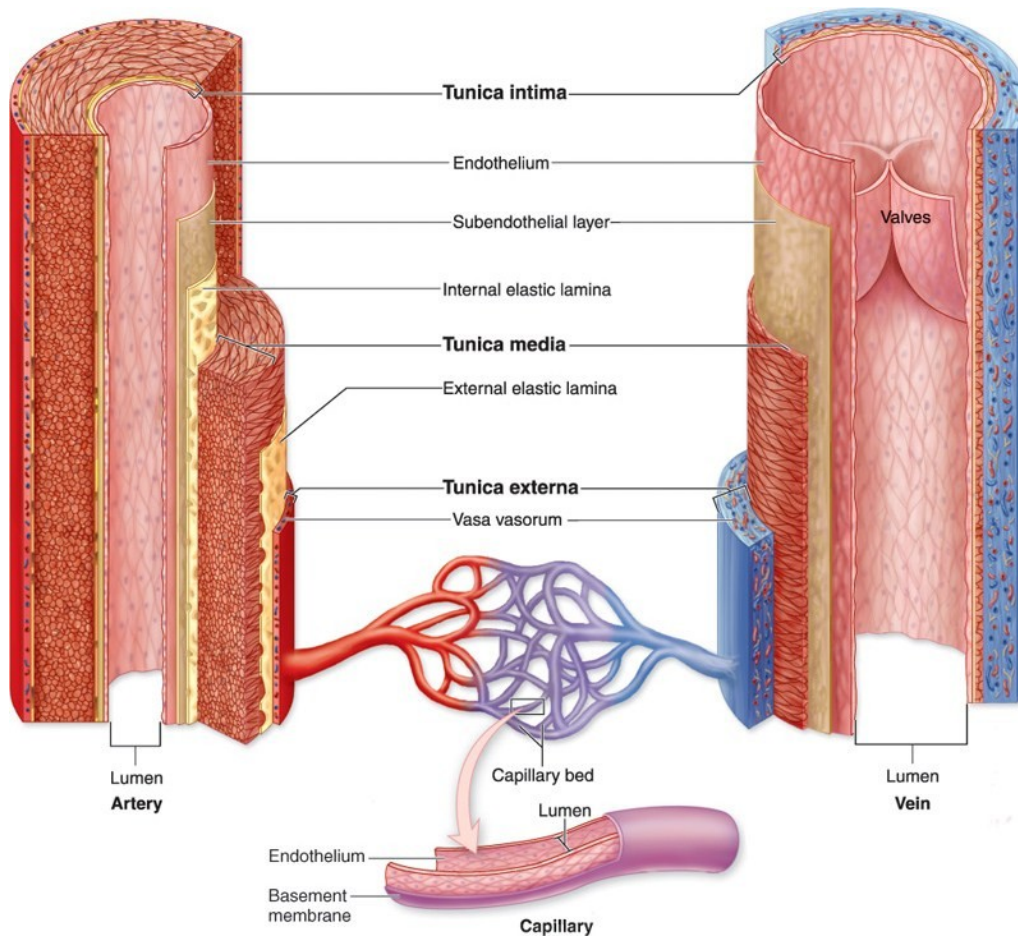
Kapiláry

Kapiláry (vlásečnice) jsou nejtenčí cévy o průměru 5-20 μ m tvořící v tkáních těla rozsáhlou síť o povrchu mnoha set metrů čtverečních, která umožňuje látkovou výměnu

(odevzdávání kyslíku a živin, odstranění oxidu uhičitého a jiných zplodin). Krev se do kapilár přivádí tepénkami - arterioly a odvádí žilkami - venulami (Vokurka 2004). V závislosti na typu jsou rozdílně propustné pro jednotlivé součásti krve. Tímto způsobem může být výměna látek a plynů optimálně přizpůsobena potřebám tkáně.

Mají specifickou úlohu, která je zprostředkována cévním endotelem. Kapiláry jsou tvořeny výhradně z endotelu a pod ním ležící bazální membrány, která odděluje cévy od okolní tkáně. Endotelové buňky jsou spojeny těsnými spoji a vykazují vysokou metabolickou aktivitu (Baumhoer 2003). Tak například inaktivují biologicky účinné látky (bradykinin, serotonin, prostaglandiny), odbourávají lipoproteiny, produkují prostacyklin a účastní se kapilárního transportu (Paulsen 2004). Rozlišuje se kontinuální endotel a diskontinuální, fenestrováný endotel (Lüllmann-Rauch 2006). Tunica media a adventitia u kapilár chybí. Na místě medie se vyskytuje nesouvislá vrstva pericytů, které mají s endoteliálními buňkami společnou bazální membránu. Pericyty jsou mezenchymatického původu a fungují jako pluripotentní buňky, které se mohou diferencovat např. na hladké svalové buňky nebo tukové buňky (Baumhoer 2003).

Obr.2: Stavba artérie, žíly, kapiláry



http://phsgirard.org/Anatomy.html&usg=__RFL5JXocOYSkErUJer2vdEG6E_0=&h=744&w=800&sz=258&hl=cs&start=0&tbnid=M84YjCpc417jQM:&tbnh=149&tbnw=160&prev=/images%3Fq%3Dvessel%2Banatomy%26hl%3Des%26sa%3DG%26biw%3D1680%26bih%3D933%26gbv%3D2%26tbs%3Disch:1&itbs=1&iact=rc&dur=463&ei=bgJUTiv2CpeQsAbS8vDhAQ&page=1&ndsp=45&ved=1t:429,r:18,s:0&tx=138&ty=94

27. červenec 2010

Ateroskleróza

Aterosklerózu lze definovat jako chronické zánětlivé onemocnění, charakterizované endoteliální dysfunkcí s následným hromaděním lipidů, leukocytů, hladkých svalových buněk a extracelulární matrix v intimě cév, což má za následek zužování cévního lumen s následnou redukcí až obstrukcí cévního průtoku (Brasen 1997).

Dlouhou dobu panovala představa, že aterosklerotické pláty jsou způsobeny pouze pasivním ukládáním lipidů do stěny artérií (Vojáček 2004). Novější výzkumy přinesly závěry, že jde spíše o aktivní děj, na němž se podílí řada faktorů a zánětlivých buněk. Toto chronické zánětlivé onemocnění pak může vyvolávat rupturu aterosklerotických plátů a akutní kardiovaskulární onemocnění (infarkt myokardu a cévní mozkové příhody) (Fruchart 2001).

Na patogenezi aterosklerózy se podílí komplex po sobě jdoucích událostí, zahrnujících rozvoj chronického zánětlivého procesu stěny arterií jako odpověď na hemodynamické poškození cévní stěny v nejvíce namáhaných místech, jejíž příčina nebyla odstraněna a proces nebyl neutralizován (Masopust 200?).

Vznik aterosklerózy

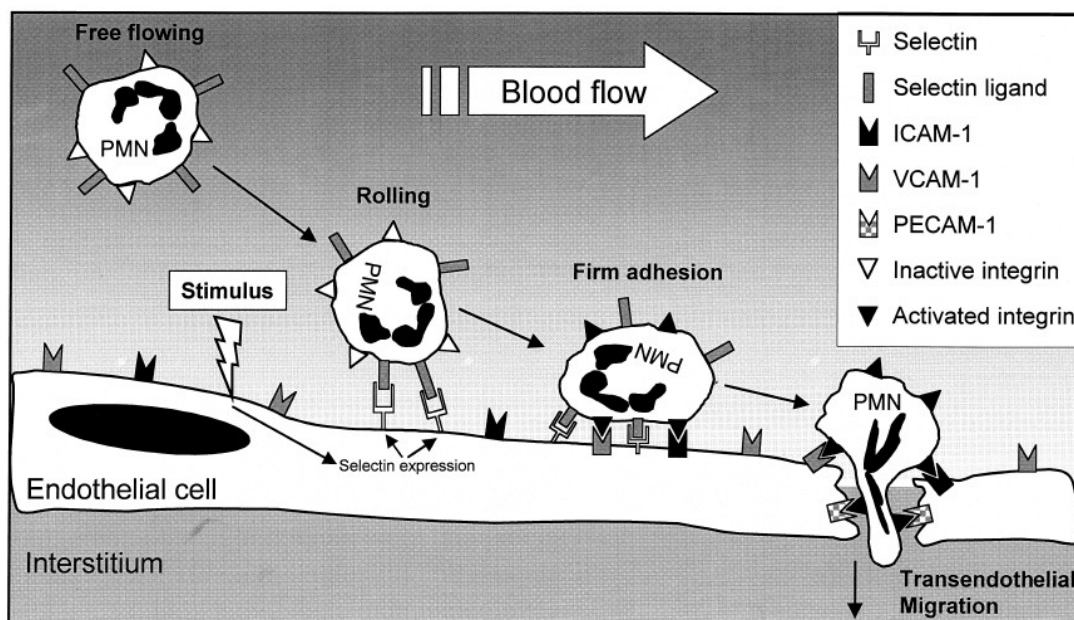
Podkladem pro vznik aterosklerózy je dysfunkce cévního endotelu. Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími, resp. stimulujícími působky (Celemajer 1997, Piřha 2001). Endoteliální dysfunkce je prvním krokem aterogenního procesu (Corsini 1995).

Mezi hlavní příčiny dysfunkce endotelu patří hyperlipoproteinémie (především zvýšená hladina LDL a to zejména oxidované či glykované LDL), hyperglykémie, hyperinzulinémie, hypoxie, hyperhomocysteinémie, kouření, ionizující záření, cytostatika, stárnutí, imunokomplexy a různé infekce (Bultas 1999, Češka 1999, Gregor 1999).

Oxidované (modifikované) LDL stimulují endotelové buňky k expresi buněčných adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1, E-selektin, P-selektin), k produkci chemotaktických faktorů pro monocyty (MCP-1), jakož i jejich receptorů. Kromě oxLDL a MCP-1 jsou dalšími chemoatraktanty, které indukují chemotaxi monocytů

lipoprotein (a), degradovaný kolagen a elastin a cytokiny IL-1 a TNF- α . Všechny tyto faktory aktivují cirkulující monocyty a T lymfocyty, které začnou na svém povrchu exprimovat ve větším množství sacharidové (lektínové) receptory pro chemotaktické faktory a integriny (Springer 1995). Následná aktivace leukocytů prostřednictvím mediátorů zánětu umožní vytvořit pevnou vazbu mezi integriny na povrchu leukocytů a adhezními molekulami ICAM-1 a VCAM-1 exprimovanými endotelovými buňkami. Transmigraci leukocytů do subendoteliálního prostoru umožňuje endoteliální adhezní molekula PECAM-1, která se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk. Všechny tyto děje vedou k aktivaci a prostupu monocytů a T lymfocytů do intimy cév (Vestweber 1999).

Obr.3: Schéma transmigrace monocytů skrz cévní endotel (Kriegelstein 2001).



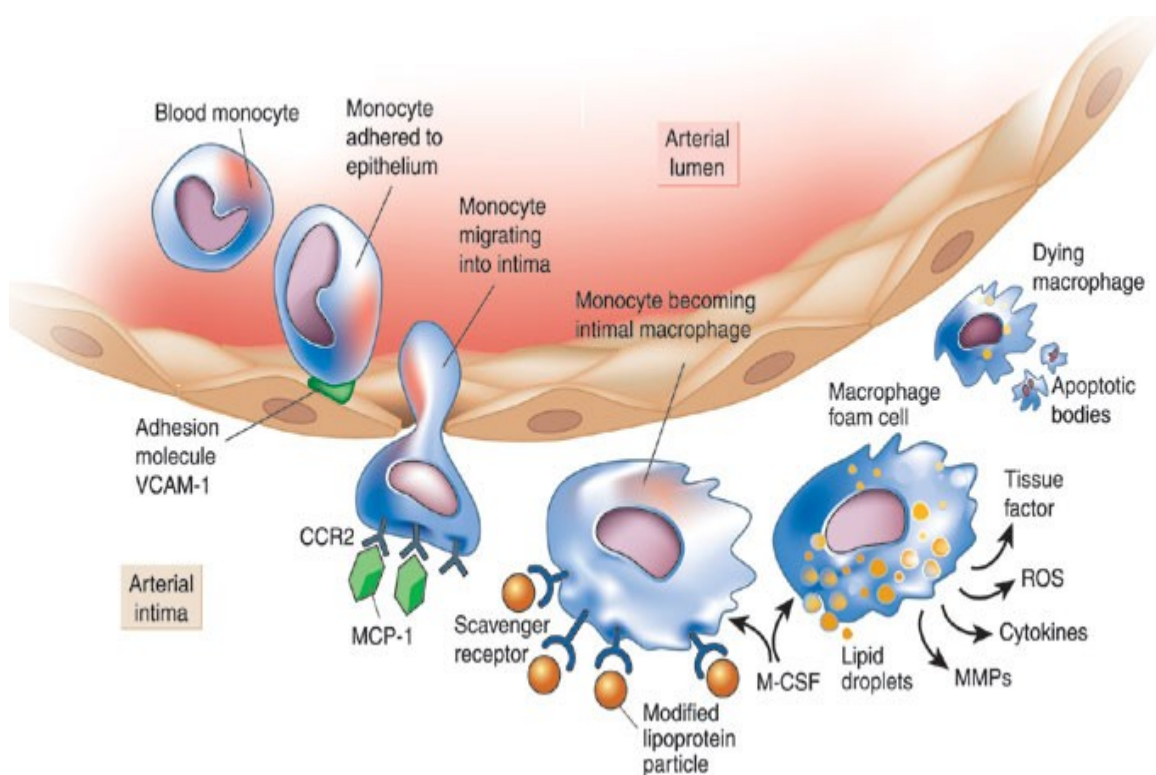
Prvními leukocyty, které se objevují v intimě cév jsou monocyty. Tyto monocyty jsou vystaveny působení růstových faktorů jako EDGF (endothelium-derived growth factor) nebo faktorům stimulujícím tvorbu kolonií jako např. M-CSF a díky nim dochází k jejich transformaci na makrofágy (Bkorkbacka 2008).

Endotelové buňky dále produkují některé působky jako PDGF, BFGF a TGF- β , které mají mitogenní účinek a indukují proliferaci vazivové tkáně (Lusis 2000).

Makrofág exprimuje na svém povrchu jednak specifické LDL-receptory, jejichž exprese je regulována intracelulární koncentrací cholesterolu, a jednak tzv. scavengerové receptory. Počet těchto receptorů nezávisí na hladině cholesterolu jako je

tomu u specifických LDL-receptorů, a proto při nadbytku LDL se zvyšuje i pohlcování těchto částic makrofágem, přičemž dochází ke kumulaci hlavně oxidovaných forem LDL (Fejfar 2002). Scavenger receptory, které se nacházejí pouze na makrofázích a hladkých svalových buňkách, mají pro modifikované (oxidované) LDL přibližně 10x vyšší afinitu než klasické receptory pro LDL (Carr 2000). Jelikož pohlcování oxLDL cestou scavengerových receptorů nepodléhá zpětnovazební regulaci jako internalizace normálními LDL receptory, dochází k intracelulární akumulaci esterů cholesterolu a vzniku tzv. pěnových buněk, jejich nahromaděním pak vzniká nejranější typ aterosklerotické léze nazvaný jako tukové proužky (Krejsek 2005).

Obr.4: Schéma přeměny monocytů v pěnové buňky (foam cells)



http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/fig_tab/nature01323_F1.html&usg=__Ktvm2tOsXQU18bs215A4jAUscnk=&h=380&w=687&sz=56&hl=cs&start=89&tbnid=DXQqyag-cTH_sM:&tbnh=103&tbnw=187&prev=/images%3Fq%3Dmcp-1%2Bcytokine%2Batherosclerosis%26hl%3Dcs%26sa%3DG%26biw%3D1680%26bih%3D933%26gbv%3D2%26tbs%3Disch:10,1700&itbs=1&iact=hc&vpx=309&vpy=583&dur=1046&hovh=167&hovw=302&tx=106&ty=172&ei=pD9UTNHAAYOqsQawy7niAQ&page=3&ndsp=45&ved=1t:429,r:38,s:89&biw=1680&bih=933

31. červenec 2010

Tukové proužky

Tukové proužky jsou nejčastější a u všech lidí přítomnou formou aterosklerózy. Vyskytují se běžně již v dětském věku a někdy je lze prokázat i u novorozenců. Jde o aterosklerotické léze, které nejsou ještě klinicky významné, to znamená, neprojeví se ischemií (Yla-Herttuala 1991). Existují dva typy tukových proužků, progredující a neprogredující, přičemž u progredujících je pozorováno více hladkých svalových buněk, extracelulární matrix, makrofágů a pěnových buněk (Stary 1994).

Makrofágy, které se podílejí na tvorbě tukových proužků, produkují množství látek, které ovlivňují další formování aterosklerotické léze. Jedním z nejvýznamnějších je chemokin MCP-1, který zesiluje chemotaxi makrofágů a T-lymfocytů a přispívá tak k jejich akumulaci v aterosklerotické lézi (Yla-Herttuala 1991).

Makrofágy dále produkují faktory zvyšující expresi adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1 nebo růstové a zánětlivé faktory, které přispívají k migraci hladkých svalových buněk z média do intimy a ke změně kontraktilního fenotypu hladkých svalových buněk na fenotyp syntetický (Schwarz 1997). Syntetický fenotyp ztrácí schopnost kontrakce a získává schopnost proliferace a produkce cytokinů, růstových faktorů a tvoří také složky extracelulární matrix (kolagen, elastin, proteoglykany). Obsahuje rovněž již zmíněné scavengerové receptory a vychytáváním modifikovaných LDL přispívá k tvorbě pěnových buněk. Navíc bylo prokázáno, že tento fenotyp exprimuje také některé buněčné adhezní molekuly jako VCAM-1 a ICAM-1. Dále bylo zjištěno, že syntetický typ hladkých svalových buněk je náchylnější k apoptóze. Proto se v místě aterosklerotických lézí nachází zvýšený počet odumřelých hladkých svalových buněk. Příčinou je i skutečnost, že syntetický fenotyp v porovnání s kontraktilním fenotypem obsahuje vyšší aktivitu kaspázy 3, klíčového enzymu v mechanismu apoptózy (Moiseeva 2001).

Různorodé cytokiny produkují i T-lymfocyty, které jsou v aterosklerotické lézi roztroušeny mezi pěnovými buňkami, a tím se rovněž aktivně podílejí na progresi aterosklerotických lézí (Esaki 1997). V tomto případě je pravděpodobně nejvýznamnější $\text{INF-}\gamma$, který se spolupodílí na tvorbě pěnových buněk. Kromě toho inhibuje proliferaci hladkých svalových buněk a způsobuje tvorbu hydrolytických enzymů (metaloproteináz), které později narušují stabilitu aterosklerotického plátu (viz. níže) (Wouters 2005).

Kromě buněčné složky se v aterosklerotických lézích nachází i složka vláknitá,

kteřá je zastoupena pŕedevším kolagenem. Ten je produkován nejen hladkými svalovými buňkami, ale z části také endoteliálními buňkami a fibroblasty. Syntéza kolagenu souvisí jak se změnou fenotypu, migrací a proliferací hladkých svalových buněk, tak s řadou lokálních i systémových činitelů (TGF- β , PDGF, endotelin-1, angiotensin II, IL-1, homocystein i mechanické napětí stimulují tvorbu kolagenu) (Lebrin 2005).

Pokročilé léze

Z výše uvedeného vyplývá, že po nahromadění makrofágů a T lymfocytů v intimě dochází v další fázi k transmigraci hladkých svalových buněk z medie do intimy a proliferaci extracelulární matrix, zejména kolagenu a vytvoření fibromuskulárního typu aterosklerotické léze.

I v tomto stádiu je ještě možná regrese a regenerace endotelových buněk v případě, že aterogenní faktor přestane působit. Výsledkem je pouze ztluštění intimy, která obsahuje jednu nebo dvě vrstvy myocytů, které se zde normálně nevyskytují. Pokud aterogenní faktor stále působí, proces se rozvíjí do dalších stádií (Linton 2003). V této fázi dochází ke zvýšenému nahromadění volného cholesterolu, zatímco v počátečních stádiích makrofágy pohlcovaly pŕedevším estery cholesterolu. Zvýšený poměr volný cholesterol/fosfolipidy zřejmě pŕispívá k odumírání makrofágů díky cytotoxickým účinkům volného cholesterolu (Wendelhag 1993).

Makrofágy, stejně tak jako hladké svalové buňky, v tomto stádiu podléhají zvýšené nekróze a apoptóze. Po odumření makrofágů dochází k extracelulárnímu nahromadění lipidů, uvolnění hydrolytických enzymů a zánětlivých látek, které vedou k vzniku nekrotického lipidového jádra. Hladké svalové buňky i nadále pokračují v migraci do intimy a v syntéze extracelulární matrix, zejména kolagenu, elastinu a proteoglykanů. Postupně tak dochází k vytvoření tzv. fibromuskulární čepičky na povrchu aterosklerotické léze. Bylo zjištěno, že v aterosklerotických lézích se nacházejí proteiny vázící vápník. Je to například osteopontin, produkovaný hladkými svalovými buňkami pod vlivem růstových faktorů, nebo osteokalcin. Tím dochází v těchto nekrotických oblastech navíc k ukládání vápníku a mineralizaci (Palinsky 2002).

Vytvořením lipidového jádra, zformováním fibromuskulární čepičky a ukládáním vápenatých iontů dochází k vytvoření pokročilé aterosklerotické léze, která se nazývá

ateromový plát.

Rozlišujeme pláty stabilní a nestabilní (Vlček 2010). Typický aterosklerotický plát obsahuje lipidové nebo nekrotické jádro překryté fibrózní čepičkou složenou ze směsi hladkých svalových buněk a extracelulární matrix. Základ léze je často tvořen množstvím pěnových buněk a T-lymfocytů. Tyto komponenty určují stabilitu plátu.

Stabilní plát bývá tvořen malým lipidovým jádrem a překrytý tlustou fibromuskulární čepičkou s mnoha hladkosvalovými buňkami a extracelulární matrix (Fan 2003). Stabilní plát má kryt zpevněn kolagenem, elastinem a proteoglykany (Vojáček 2004). Proto nemá tendenci k ruptuře s vytvořením trombózy (Badimon 1999).

Naopak *nestabilní pláty* často obsahují velké lipidové jádro a tenkou čepičku s množstvím zánětlivých buněk (Fan 2003). Často dochází k prasknutí fibromuskulární čepičky.

Zatímco stabilní pláty, které postupně „pouze“ zužují cévní lumen, způsobují vznik typických námahových stenokardií při angině pectoris, trombóza, která provází nestabilní pláty, je zodpovědná za akutní koronární syndromy, nestabilní anginu pectoris a za vznik infarktu myokardu. Závažnost aterosklerotických plátů tedy nezávisí na jejich velikosti, ale zejména na jejich složení a charakteru. Nestabilní plát představuje typickou *komplikovanou lézi* (Badimon 1999).

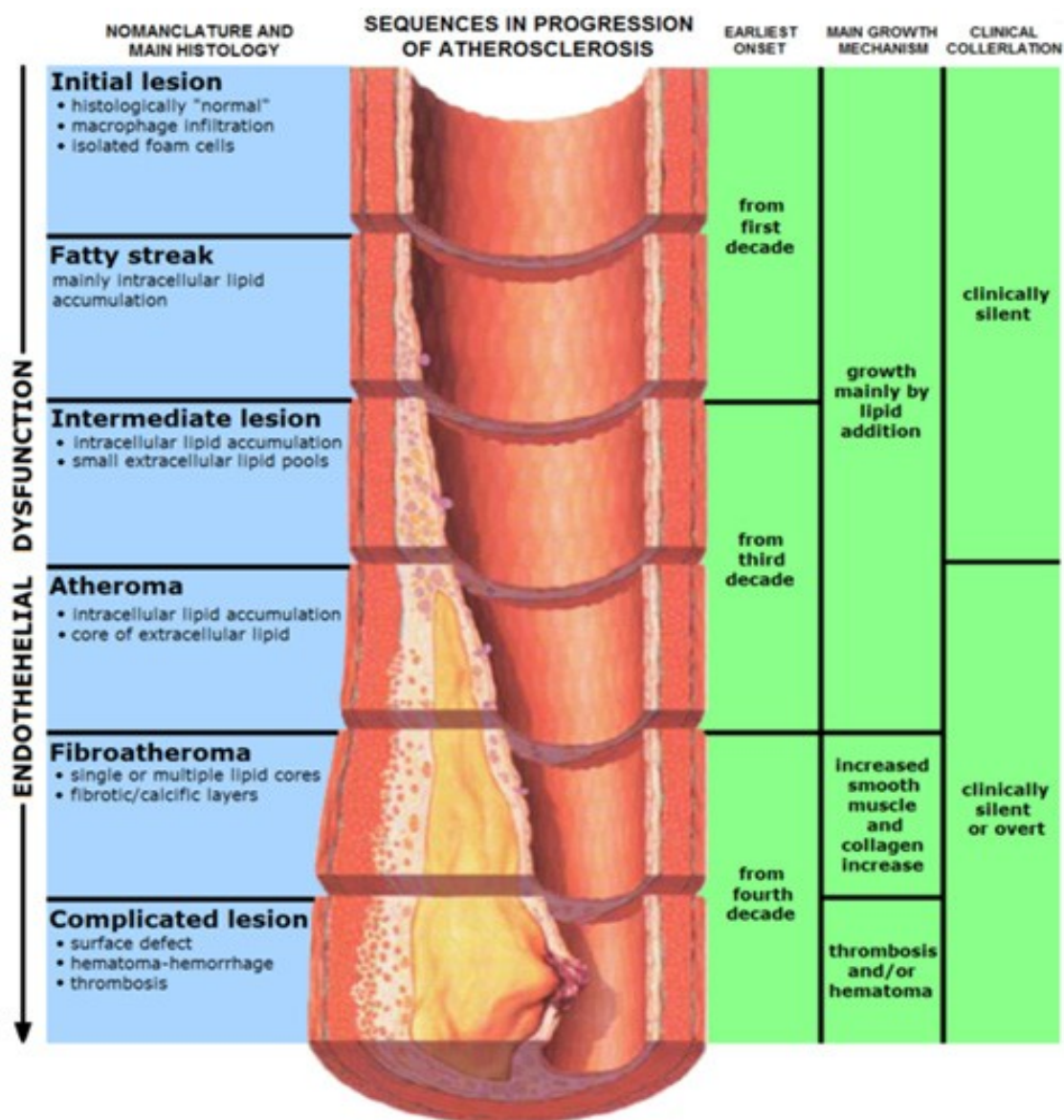
Komplikované léze

Tyto léze vznikají z ateromových plátů masivní kalcifikací a především těžkými degenerativními změnami (ulcerace, ruptura), které se pak stávají místem adherence trombocytů, agregace, trombózy a současné organizace trombu. Makroskopický vzhled komplikované léze odpovídá ateromovému plátu s následnými změnami v důsledku trombózy a přítomnosti erytrocytů (Stehbens 2002).

Ke vzniku trombu může dojít buď při rozrušení endotelu, nebo při ruptuře plátu. Malé poškození vede k odhalení kolagenu a tkáňového faktoru trombocytů a vede ke vzniku malých mikrotrombů. Ty obvykle nemají žádný klinický význam (Shah 2002). Při větším poškození endotelu dochází ke vzniku tzv. červeného trombu, který je bohatý na obsah trombocytů, erytrocytů a fibrinu. Tento trombus postupně uzavírá lumen cévy, může dojít i k jejímu úplnému uzávěru, nebo se trombus může uvolnit a způsobit embolizaci. Navíc se v místě vzniku trombu rozvíjí zánětlivá reakce s hromaděním makrofágů a T-lymfocytů (Stehbens 2002).

Ruptura ateromu je vysvětlována produkcí matrixových metaloproteináz (MMPs) makrofágy, které mohou narušovat tenkou čepičku. Sekreci metaloproteináz mohou zvyšovat některé cytokiny např. TNF- α , IL-1 či MG-CSF (Wu 2000). Činnost matrix-degradujících MMPs je nezbytná pro mnoho procesů při tvorbě aterosklerotického plátu, včetně infiltrace zánětlivých buněk, migrace hladkých svalových buněk a proliferace, stejně jako pro angiogenezi. Asi nejzávažnější důsledky činnosti MMPs jsou nepříznivé účinky na stabilitu plátu a odolnost vůči roztržení, což může vést k nestabilní angině pectoris, infarktu myokardu či cévní mozkové příhodě (Østerud 2003).

Obr.5: Vývojová stadia aterosklerózy



www.healthyfellow.com/144/vitamin-c-deficiency/

31. červenec 2010

Rizikové faktory

Udává se, že doposud bylo celkově identifikováno kolem 300 rizikových faktorů pro rozvoj aterosklerózy (Graham 2005). Můžeme je dělit podle několika hledisek, nejčastěji však na rizikové faktory ovlivnitelné a neovlivnitelné. Za hlavní ovlivnitelné faktory považujeme *kouření, arteriální hypertenzi, hyperlipoproteinémii, obezitu, diabetes mellitus, CRP, fyzickou aktivitu, homocystein, infekční agens*. Mezi hlavní neovlivnitelné faktory patří *věk, pohlaví a genetická predispozice*.

K dalším neméně důležitým rizikovým faktorům patří metabolický syndrom, zvýšená hladina triacylglycerolů, snížená hladina HDL cholesterolu, psychický stres (Hallan 2006). Někteří autoři řadí do této skupiny i *faktory rasové* (Muntner 2005).

Ovlivnitelné rizikové faktory

Kouření

Kouření je jedním z nejrozšířenějších rizikových faktorů aterosklerózy. Rizikové je nejen aktivní, ale jak bylo dokázáno na základě výsledků řady epidemiologických studií, i pasivní kouření (Hallan 2006). Jeho negativní vliv spočívá v poruše endotel-dependentní vazodilatace, případně v navození oxidačního stresu a následně endotelové dysfunkce (Pepine 1998). Kouření také snižuje HDL cholesterol, způsobuje hemodynamický stres, zvyšuje koagulační aktivitu, má proarytmogenní účinek, způsobuje relativní hypoxii (CO redukuje kapacitu Hb pro kyslík) a snižuje toleranci k fyzické zátěži. Zvyšuje tvorbu superoxidového radikálu, který inaktivuje NO a oxiduje LDL. Kouření je tedy komplexně působící agresivní rizikový faktor rozvoje aterosklerózy (Iacoviello 2001).

Arteriální hypertenze

Hypertenze způsobuje mechanické poškození endotelu. Zvýšení systolického krevního tlaku má větší vliv než zvýšení diastolického krevního tlaku. Hodnoty krevního tlaku nad 140/90 mmHg (u diabetiků 135/85 mmHg) vedou ke zvýšené koncentraci angiotenzinu II, který ovlivňuje aktivitu endotelových buněk, hladkých svalových buněk a makrofágů (Shantaram 1999). Angiotenzin II se váže na specifické receptory hladké svaloviny, což vede k aktivaci fosfolipázy C a to může vést ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a kontrakci hladké svaloviny, zvyšuje syntézu

proteinů a hypertrofii hladkých svalových buněk (Chobanian 1996). Dále angiotenzin působí na růst a kontrakci cévních hladkých svalových buněk a zvyšuje jejich lipooxygenázovou aktivitu. Zvýšení této aktivity způsobuje vyšší produkci leukotrienů a lipoperoxidů s následnou oxidací LDL a tvorbou pěnových buněk. Léčba hypertenze snižuje incidenci cévních mozkových příhod, ICHS a srdečního selhávání (Shantaram 1999).

Hyperlipoproteinémie

Především chemicky modifikované LDL částice jsou hlavní příčinou narušení endotelu a indukují expresi prozánětlivých molekul v endoteliálních buňkách (Altman 2003). LDL částice pronikají do subendoteliálního prostoru v určité míře i při fyziologických hladinách lipoproteinů. Za těchto podmínek nejsou ale výrazně oxidovány a jsou opět účinně odstraňovány z intimy. Pokud nejsou přítomny další faktory poškozující endotel, dochází k nadměrné produkci oxLDL pouze při výraznější hyperlipidémii. Při poškození endotelu dalšími faktory, např. diabetem, stoupá propustnost endotelu a oxLDL se budou kumulovat i při nižších hladinách lipidů v krvi (Štulc 2006).

Naproti tomu zvýšená hladina HDL cholesterolu je ochranným faktorem před vznikem aterosklerózy. HDL mobilizuje cholesterol z periferie do jater a žláz produkujících steroidy, navíc má i antioxidační vlastnosti a působí protizánětlivě. HDL pronikají do intimy, zajišťují reflux přebytečného cholesterolu, chrání LDL před oxidací, stimulují syntézu NO, inhibují adhezi monocytů, agregaci trombocytů, snižují krevní viskozitu a tlumí aktivitu t-PA a PAI-1. Proto je někdy označován jako „dobrý cholesterol“ (Muntner 2005). Zvýšení HDL cholesterolu o 1 % snižuje riziko koronárních příhod o 2 – 3 %. Optimální hladina HDL cholesterolu je > 1,0 mmol/l. Zvýšení HDL cholesterolu nad 1,6 mmol/l je tzv. negativním rizikovým faktorem, který snižuje kardiovaskulární riziko (Coniglio 1997).

Diabetes mellitus

Riziko ICHS je u diabetiků 2 – 4x vyšší než u nediabetické populace (Bonfont-Rousselot 2004). Není jasné, zdali hraje větší roli proces glykace proteinů (včetně LDL) a zvýšená tvorba vasokonstrikčních prostaglandinů, nebo doprovodná dyslipidémie, hypertenze a obezita.

Hyperglykémie podporuje glykaci proteinů, včetně lipoproteinů LDL (za vzniku

tzv. AGEs). Tyto glykované LDL snáze podléhají oxidaci a jsou rozpoznávány i scavengerovými receptory makrofágů, mohou aktivovat leukocyty a endoteliální buňky a navodit zánětlivý proces (Shantaram 1999). V důsledku zvýšeného oxidačního stresu endotelové buňky zvyšují expresi adhezních molekul jako je E-selektin, VCAM-1 a ICAM-1. Diabetici mají také sníženou endotel-dependentní vazodilataci, hyperkoagulabilitu, zvýšenou hladinu PAI-1 v cévní stěně s poruchou fibrinolýzy, sníženou NO-syntázu a zvýšenou hladinu endotelinu-1 (Pandolfi 2001).

Inzulinová rezistence zvyšuje koncentraci VLDL, snižuje koncentraci HDL cholesterolu a zvyšuje výskyt arteriální hypertenze. Inzulin působí na cévní stěnu stimulací tvorby růstových faktorů, proliferací buněk hladkého svalstva, stimulací produkce pojivové tkáně, zvýšenou aktivitou LDL cholesterolu, zvýšenou tvorbou cholesterolu, zvýšenou tvorbou a sníženou regresí tukových proužků a zvýšením hladin plazmatického endotelinu-1 a inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) (Shantaram 1999).

Obezita

Je obecně známo, že obezita zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. Je to způsobeno zvýšenou hladinou CRP u těchto osob, která odráží vyšší množství cytokinů (Visser 1999, Soriano-Guillen 2008)

Obezita představuje jeden z nejdéle známých a základních rizikových faktorů aterosklerózy. V poslední době přibývají přesvědčivé důkazy o tom, že rozhodujícím rizikovým faktorem není obezita jako taková, ale typ obezity. Zvýšené riziko aterosklerózy představuje intraabdominální kumulace tuku. Dobrým parametrem určujícím rozsah intraabdominální obezity je obvod pasu (normální hodnoty obvodu pasu: muž < 102 cm, žena < 88 cm). Intraabdominálně uložené tukové buňky se vyznačují oproti jinde uloženým tukovým buňkám zvýšenou lipolytickou aktivitou, sníženou produkcí adiponektinu a zvýšenou produkcí řady prozánětlivých (TNF- α , IL6, CRP) a prokoagulačních faktorů (PAI-1). Není tak překvapením, že intraabdominální obezita je spojena s řadou proaterogenních jevů, jako je prozánětlivý stav, prokoagulační stav, hypertriglyceridémie a inzulínová rezistence s rozvojem hyperglykémie (Hallan 2006).

C-reaktivní protein

Jedná se o nespecifický, ale velmi citlivý marker zánětlivé reakce. Spolupodílí se

na rozvoji aterosklerózy díky poškození fyziologické funkce endotelu, posílení prozánětlivého a prokoagulačního stavu (Egorova 2002). CRP je výborným predikčním ukazatelem, lepším než jiné markery zánětu (IL-6, TNF-alfa aj.)

V kardiologii se využívá metoda ultrasenzitivního měření CRP, tzv. hs-CRP (High sensitivity CRP) kde CRP slouží jako ukazatel rizika aterosklerózy (Hosseinsabet 2008).

Fyzická aktivita

Studie prokázaly, že pravidelná fyzická aktivita snižuje riziko ICHS, kardiovaskulární i celkové mortality u mužů i u žen (Mehta 1998).

Homocystein

Homocystein je esenciální aminokyselina obsahující síru, která vystupuje v metabolismu methioninu (Brustolin 2010). Hyperhomocysteinémie je pozorována přibližně u 5% z celkové populace, a je spojována se zvýšeným rizikem vzniku některých poruch, např. cévní a neurodegenerativní onemocnění, autoimunitní onemocnění, vrozené vady, diabetes, onemocnění ledvin, osteoporóza, neuropsychiatrické poruchy a rakovina (Ross 1999). Zvýšená hladina homocysteinu v lidské plazmě může být buď vrozená či získaná. Mechanismus, kterým působí homocystein jako rizikový faktor pro cévní onemocnění dosud nebyl plně objasněn, ale předpokládá se zapojení endoteliální dysfunkce a lipoperoxidace. Léčba hyperhomocysteinémie spočívá v podávání kyseliny listové a vitamínů B6 a B12 (Delsing 2003).

Infekční agens

Uvažuje se o některých bakteriálních a virových patogenech - Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, Herpes simplex virus, Cytomegalovirus. Teoreticky mohou infekční agens ovlivnit vznik aterosklerózy řadou způsobů, jak lze demonstrovat na dopadu infekce gramnegativními bakteriemi - ovlivněním lipidového spektra (vzestup hladin triglyceridů, VLDL, pokles HDL), indukci tvorby volných radikálů v cévní stěně (oxidace LDL, další poškození cévní stěny), indukci prozánětlivých a prokoagulačních dějů (Laurila 1997).

Neovlivnitelné rizikové faktory

Věk

Ateroskleróza je dlouhodobý proces, není proto divu, že pravděpodobnost jeho manifestace vzrůstá s věkem. Řada epidemiologických studií prokázala korelaci mezi vzrůstajícím věkem a vznikem aterosklerózy. Proto byla ateroskleróza považována za nemoc stáří. Za rizikový považujeme z hlediska ICHS věk 45 let a vyšší u muže a 55 let a vyšší u ženy (D'agostino 2004).

Pohlaví

Hlavní příčinou většího výskytu aterosklerózy u mužů je rozdílné hormonální pozadí. Ženy jsou v premenopauzálním období chráněny estrogeny. Tyto ženské hormony mají vliv na složení lipidového spektra (nižší hladiny LDL a naopak vyšší hladiny HDL cholesterolu), dále ovlivňují inzulínovou rezistenci, hladinu cytokinů a funkci endotelu. V postmenopauzálním období takto tedy dochází ke zvýšenému výskytu kardiovaskulárních rizikových faktorů (Muntner 2005).

Genetická predispozice

Rozdílná četnost výskytu aterosklerotických tepenných změn byla potvrzena v 60. letech 20. století patologickou studií (International Atherosclerosis Project). Rovněž řada dalších studií prokázala „rodinný“ výskyt ICHS. Genetici analyzují celou řadu kandidátních genů pro rizikové faktory aterosklerózy, ale samozřejmě jednoduché vysvětlení není možné (Stolba 1992).

Za genetickou predispozici se považuje přítomnost předčasné klinické manifestace aterosklerózy u příbuzných prvního stupně u mužů < 55let a u žen < 65 let (Vlček 2010).

Myší modely aterosklerózy

Po mnoho let se myší modely při studiu aterosklerózy nepoužívaly. Do roku 1992 se většina výzkumu aterosklerózy soustředila na pokusy na králících, poté také v menší míře na prasatech a primátech. Používání těchto zvířecích modelů nám umožnilo neocenitelné poznání. Použití prasečích modelů s tímto onemocněním nám jako první odkrylo, že infiltrace monocytů je jeden z počátečních buněčných pochodů během aterosklerotického procesu (Gerrity 1981). Studie s primáty a králíky byly zase pívotní v definování buněčných pochodů při tvorbě aterosklerotické léze (Faggiotto 1984, Rosenfeld 1987).

Vědci se domnívali, že u myši se spontánně léze netvoří, že nejsou schopny přežívat na vysoce aterogenní tukové dietě, léze nejsou reprodukovatelné, a také že jejich patologie není podobná lidské. Nakonec se problém přežívání vyřešil použitím diety s nižším obsahem tuků, problém reprodukovatelnosti byl vyřešen využitím inbredních linií namísto náhodně vybíraných, ke snadné tvorbě aterosklerotických lézí došlo použitím tzv. rodově zatížených myších kmenů a tvorbu fibromuskulární čepičky umožnilo prodloužení experimentálního času (Shih 1995).

Myší model pomohl díky své velikosti překonat množství problémů a nedostatků spojených s používáním větších zvířat a rovněž zdolat potíže s genetickou reprodukovatelností. Je vhodný také díky možnosti relativně velkého počtu experimentálních jedinců ve studiích zaměřených na léčbu. V současnosti jde o nejpoužívanější, nejekonomičtější a nejvhodnější model pro studium aterosklerózy a objasnění efektivního způsobu její léčby (Zadelaar 2007).

Využití myších modelů ve studiu aterosklerózy přináší řadu dalších výhod. Snadné a hospodárné je zejména jejich získávání a udržování druhu. Jejich reprodukční období je krátké (přibližně 9 týdnů - 3 týdny trvá období březosti a přibližně 6 týdnů dozrání do pohlavní dospělosti), proto je snadné odchovat velké skupiny pro experimentální studie. Klasická genetika je v myším organismu obzvlášť stabilní a tento fakt je ještě podpořen možností získat stovky inbredních linií (Jawien 2004).

Naopak hlavní nevýhodou myších modelů je jejich malá velikost, způsobující potíže při výkonu chirurgických manipulací a zobrazování *in vivo*.

Je také důležité si uvědomit hlavní rozdíly mezi myším a lidským organismem. Průměrná délka lidského života je okolo 75 let, zatímco u myši jsou to pouze 2 roky. Hmotnost myši je samozřejmě mnohem menší, v dospělosti kolem 30 gramů. Obecně

jsou myši poměrně rezistentní k rozvoji aterosklerózy, což vyplývá z jejich vysokých plazmatických hladin antiaterogenního HDL a nízkých hladin proaterogenního LDL a VLDL (Zadelaar 2007). U člověka je naopak většina plazmatického cholesterolu (až 75 %) obsažena v LDL. Myši totiž nemají plazmatický cholesteryl ester transfer protein (CETP) (Moghadasian 2001) a většina cholesterolu je tedy ve formě HDL (Jawien 2004).

HDL cholesterol, jak je známo, představuje v lidském organismu ochranný faktor před vznikem aterosklerózy. Z tohoto důvodu u myši krmených normální nízkotučnou dietou se nevyvíjí ateroskleróza. Výhodou myších modelů, stejně tak jako všech ostatních zvířecích modelů, je možnost měnit vnější podmínky a dietu. U člověka to vzhledem k délce jeho života není možné. Při studiích s myšími modely jsou navíc možné různé genetické experimenty, zahrnující křížení a genetické inženýrství.

Jak je uvedeno výše, myši jsou vysoce rezistentní vůči vzniku aterosklerózy a to díky vysoké hladině antiaterogenního HDL cholesterolu a nízkým hladinám proaterogenního LDL a VLDL cholesterolu. Jedinou výjimkou je kmen C57BL/6, který při krmení stravou bohatou na cholesterol a cholesterolem vytváří sice léze, ale odlišné od lidských co se týká histologie a lokalizace (Jawien 2004). Všechny současné modely pro aterosklerózu jsou založeny na porušení metabolismu lipoproteinů díky genetické manipulaci (Zadelaar 2007).

Vůbec první myší model aterosklerózy byl použit během 60. let 20. století ve Wisslerově laboratoři. První použitá dieta vedoucí k rozvoji aterosklerózy u myši C57BL/6J obsahovala 30 % tuků, 5 % cholesterolu a 2 % žlučových kyselin. Bohužel se ukázalo, že je poměrně „drastická“, myši ubývaly na váze a často onemocněly smrtelnými respiračními infekcemi.

Vzhledem k toxicitě předchozí diety byla vytvořena tzv. „Paigenova dieta“, která obsahovala 15 % tuků, 1,25 % cholesterolu a 0,5 % kyseliny cholové (Paigen 1987). I když se tato dieta často používala, nebyla ideální. Aterosklerotické léze, které se u nich posléze vyvinuly, byly poměrně malé (200 - 1000 μm^2), byly omezeny převážně na aortální oblouk a nacházely se ve stádiu pěnových buněk s malým zastoupením hladkých svalových buněk. Na rozdíl od lidských lézí, zůstávaly v tomto případě léze ve stádiu tukových proužků a nedocházelo k jejich další progresi. Tato dieta rovněž není fyziologická s ohledem na extrémně vysoký podíl cholesterolu a přítomnost kyseliny cholové (Nishina 1993).

S nástupem molekulární genetiky je nyní možné začlenit do myšího genomu

vnější geny, to je možné i u mnoha jiných živočišných druhů. Ale speciálně u myši, je rovněž možné vyřadit z funkce (knokautovat) nebo přemístit vnitřní geny, což je jedna z hlavních výhod práce s myšími modely. Všechny současně užívané myší modely pro studium aterosklerózy jsou založené na porušení lipoproteinového metabolismu spojením aterogenní diety a genetických manipulací (Jawien 2004).

ApoE–deficientní myši (ApoE^{-/-})

Jde o homozygotní myši kmen C57BL/6J bez genu pro apolipoprotein E (ApoE^{-/-}) zavedený v roce 1992. Apo E je glykoprotein syntetizovaný v játrech, v mozku a dalších tkáních, který má několik antiaterogenních funkcí. Je součástí všech lipoproteinů s výjimkou LDL a slouží jako ligand pro LDL-receptor a receptor pro zbytky chylomikronů, čímž dochází k vychytávání těchto aterogenních částic v oběhu. Deficit v apoE vede ke zpomalení clearance lipoproteinů. Tyto myši vyvíjejí spontánní hypercholesterolemii po podávání standardní diety, přičemž hladiny cholesterolu jsou 4-5 vyšší než u normálního kmene (Zhang 1992), zvyšuje se hladina celkového cholesterolu, dochází k nárůstu hladin zejména VLDL částic, chylomikronových zbytků a IDL částic. Po podání diety s obsahem cholesterolu dochází ještě k výraznějším nárůstu hladin těchto částic (Ishibashi 1994).

Kromě toho se objevuje řada důkazů o tom, že apoE apolipoprotein má i další antiaterogenní vlastnosti. Uvažuje se například o tom, že apoE lipoprotein má také antioxidační, antiproliferativní, protizánětlivé, antiagregační vlastnosti, což souvisí s jeho potenciací sekrece NO (Ali 2005, Davignon 2005, Grainger 2004).

Tyto myši vytváří spontánně aterosklerotické léze a to i při standardní dietě obsahující malé množství tuku a žádný cholesterol. Tyto léze jsou srovnatelné s lidskými a jsou vytvářeny v plném rozsahu od tukových proužků až ke komplikovaným lézím. Typicky se skládají z nekrotického jádra, proliferujících hladkých svalových buněk a extracelulární matrix. U starších myši se nacházejí i kalcifikovaná ložiska. Již kolem 4. až 5. týdne se na místech predisponovaných k ateroskleróze zvyšuje exprese adhezních molekul. Léze typu tukových proužků se začínají objevovat kolem 6. až 8. týdne věku a pokročilejší léze se objevují kolem 15. týdne života především v aortálním oblouku, karotidách a odstupech z aorty.

Tvorbu aterosklerotických lézí lze značně urychlit dietou bohatou na cholesterol. Výhodná je „western-type“ dieta, jejíž složení je podobné průměrné americké stravě

a obsahuje 21% tuku a 0,15% cholesterolu (Jawien 2004, Zadelaar 2007).

LDL receptor–deficientní myši (LDLr^{-/-})

Další geneticky modifikovaný kmen je model LDL receptor–deficientních myši zavedený v roce 1993. Mutace v genu pro LDL receptor u lidí se projevuje jako familiární hypercholesterolemie (Ishibashi 1993). Zastoupení lipoproteinových částic je u LDL receptor-deficientních myši podobné jako u člověka, tzn. většina cholesterolu je ve formě LDL a VLDL frakce. U myši, kterým chybí gen pro LDL receptor se objevuje po podání standardní diety mírně zvýšená hladina cholesterolu, a to zejména ve formě LDL částic a ateroskleróza se rozvíjí pozvolna. Avšak po podání diety s obsahem cholesterolu a tuku dojde k velkému nárůstu hladiny cholesterolu a k tvorbě detekovatelných lézí podobných jako u apoE-deficientních myši (Veniant 1998). Po podání diety s obsahem cholesterolu dochází k výraznému hromadění velkých lipoproteinových částic – chylomikronových zbytků, VLDL a IDL částic (Ishibashi 1994).

ApoE/LDL receptor-deficientní myši (ApoE^{-/-}/ LDLr^{-/-})

Jedná se o nový model myši vytvářející aterosklerotické léze rychleji a ve větší míře než předchozí modely (Bonthon 1997). Jsou to myši vytvořené genetickou manipulací, tzv. dvojnásobně knokautované apoE/LDL receptor-deficientní myši. Tyto myši reprezentují zajímavý model, u kterého se vyskytuje kombinovaný defekt apoE lipoproteinu a LDL receptoru. Tento model je schopen rozvinout závažnou hyperlipidémii a aterosklerózu. Bylo zjištěno, že u apoE/LDL receptor-deficientních myších dokonce i běžná strava vede k výraznější progresi aterosklerózy než u myši, které mají poruchu jen v apoE. Lipoproteinové spektrum je u těchto myši podobné jako u apoE modelu, zvýšená hladina VLDL částic a chylomikronových zbytků, ale také navíc LDL. Po podání diety s obsahem cholesterolu, dochází ještě k vyšší akumulaci těchto částic (Ishibashi 1994). Aterosklerotické léze jsou pozorovatelné již po 15 týdnech na normální dietě (Witting 1999). Z toho důvodu je ApoE^{-/-}/ LDLr^{-/-} myši model vhodný pro studium antiaterosklerotického účinku jednotlivých látek bez nutnosti krmit zvířata aterogenní dietou.

ApoE*3Leiden (E3L) transgenní myši

ApoE*3-Leiden mutace je vzácná mutace v lidském genu *APOE3*, je spojována s familiární dysbetalipoproteinémií u lidí. ApoE*3Leiden (E3L) transgenní myši byly vytvořené vložením lidského *APOE*3-Leiden* segmentu do C57Bl/6 myši (Zadelaar 2007).

U E3L myši se po podání diety s vysokým obsahem cholesterolu vyvíjejí aterosklerotické léze se všemi charakteristikami jako u člověka, od tukových proužků k závažným lézím. Ateroskleróza se vyvíjí nejprve v oblasti aortálního oblouku a pak se rozšiřuje na celý arteriální strom (Lutgens 1999).

Avšak E3L myši vykazují i po podání normální diety významně zvýšené hladiny plazmatického cholesterolu a triacylglycerolů. Podání diety obsahující tuk nebo cholesterol vede u těchto myši k silnému nárůstu hladin plazmatického cholesterolu a triglyceridů, přičemž je významný zejména nárůst VLDL a LDL lipoproteinové frakce (Groot 1996).

Význam TGF- β a členů jeho kaskády v aterogenezi

Transformující růstový faktor TGF- β

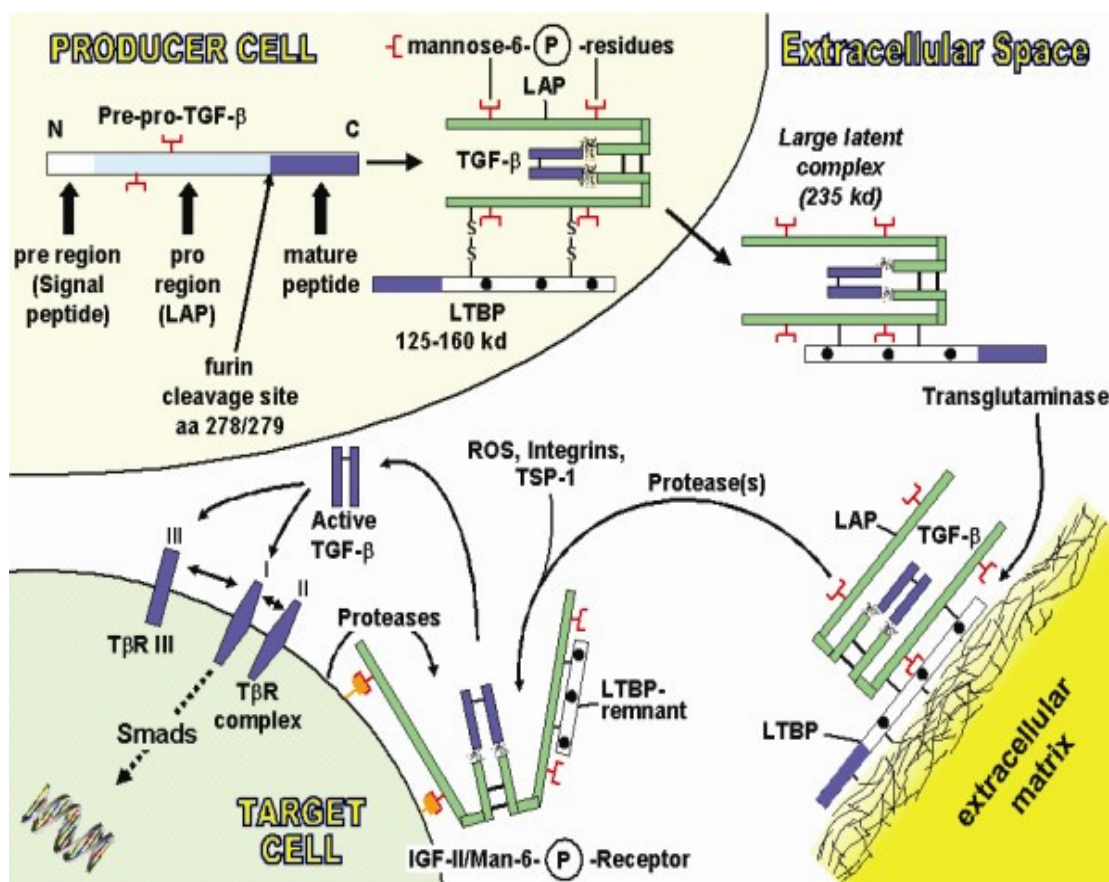
Nadrodina transformujícího růstového faktoru- β (TGF- β) zahrnuje více než 40 zástupců, např. TGF- β , diferenciační růstový faktor, BMP a další. Všechny jsou multifunkčními regulátory buněčného dělení, diferenciace, migrace, adheze, buněčné smrti, podporují tvorbu extracelulární matrix, tkáňovou homeostázu a embryogenezi (Ruiz-Ortega 2007).

Existují 3 izoformy TGF- β a to TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3. Pro kardiovaskulární systém je nejdůležitější TGF- β 1, který je přítomný v endoteliálních buňkách, cévních hladkých svalových buňkách, makrofázích a dalších krevních elementech. TGF- β 2 se nachází v epitelových a nervových buňkách a TGF- β 3 pak v buňkách mezenchymu (Blobe 2000). TGF- β 1 je silně protizánětlivý, imunosupresivní a profibrózní cytokin. Grainger a spol. jako první prokázal, že hladiny TGF- β jsou významně sníženy u pacientů s pokročilou aterosklerózou (Grainger 1995). Při nadprodukcii TGF- β bylo prokázáno snížení aterogeneze u pokusných zvířat, naopak snížení TGF- β 1 vede k proaterogenním změnám. Při použití anti-TGF- β 1 protilátek je pozorováno zvýšení zánětu, depozice lipidů a destabilizace aterosklerotického plátu (Mallat 2001).

TGF- β je syntetizován jako neaktivní protein, nazývaný latentní TGF- β , který se skládá z hlavní části („mature peptide“) a latentního asociovaného peptidu (LAP). Dále následuje tvorba disulfidických můstků mezi zbytky cysteinu LAP a specifického proteinu vázajícího latentní TGF- β (LTBP) (Annes 2003). Tím vzniká velký latentní komplex.

Aktivace TGF- β může probíhat proteolytickým štěpením, trombospondinem-1, plasminem, kyselým prostředím a některými matrixovými metalloproteinázami a β 6-integrinem (Ruiz-Ortega 2007). V hladkých svalových buňkách stimuluje AII expresi TGF- β a podporuje jeho konverzi na aktivní formu (Weigert 2002).

Obr.6: Aktivace TGF- β



http://www.comparative-hepatology.com/content/6/1/7/figure/F6&usg=__6Z18ZIGEiYI2mkCB-tyO5GxmbtU=&h=422&w=600&sz=88&hl=cs&start=0&tbnid=qhYvDS2USrvjNM:&tbnh=133&tbnw=189&prev=/images%3Fq%3DTGF-%25CE%25B2%2Bsynthesis%26hl%3Dcs%26biw%3D1680%26bih%3D933%26bv%3D2%26tbs%3Disch:1&itbs=1&iact=hc&vpx=528&vpy=119&dur=936&hovh=188&hovw=268&tx=153&ty=123&ei=2HRVTOX0AoansQb9h4jiAQ&page=1&ndsp=42&ved=1t:429,r:2,s:0

30.srpen 2010

Důležitými charakteristikami TGF- β jsou jeho protizánětlivé a profibrotické vlastnosti. TGF- β je považován v procesu aterosklerózy za protektivní cytokin. Hraje důležitou roli v udržování normální struktury cévní stěny a kontrole rovnováhy mezi zánětem a tvorbou extracelulární matrix. Ztráta tohoto protektivního vlivu může být spojena s poruchou TGF- β receptorů (Ruiz-Ortega 2007).

V nemocných cévách převažuje TGF- β receptor typu 1, který zvyšuje tvorbu extracelulární matrix a může podmiňovat brzkou tvorbu tukových proužků (Grainger 2004). TGF- β působí především na endotelové buňky, hladké svalové buňky, makrofágy

a T-lymfocyty, tedy buňky účastníci se na tvorbě aterosklerotických lézí. Protože TGF- β stimuluje chemotaxi leukocytů (Ashcroft 1999) a produkci proteoglykanu hladkými svalovými buňkami, tak je pravděpodobné, že TGF- β přispívá k migraci makrofágů a akumulaci lipidů v nemocných cévách. Hladké svalové buňky stabilních lézí produkují TGF- β ve větším množství než hladké svalové buňky nestabilních lézí (Cipollone 2004). TGF- β může také stimulovat hladké svalové buňky k produkci kolagenu, čímž přispívá ke stabilizaci aterosklerotických plátů (Ruiz-Ortega 2007).

TGF- β receptory

Existují 2 základní typy TGF- β receptorů, receptor pro TGF- β typu I (TGF- β R1) a receptor pro TGF- β typu II (TGF- β R2). Jejich celková stavba je podobná. Jsou složeny z malé extracelulární části bohaté na cystein, jednoduché transmembránové oblasti a intracelulární části, která obsahuje serin / threonin kinázovou doménu (Lebrin 2005).

TGF- β se na buněčném povrchu váže na receptor pro TGF- β typu II, dochází k fosforylaci – aktivaci receptoru pro TGF- β typu I. Tento aktivovaný komplex fosforyluje – aktivuje nitrobuněčné posly tzv. Smad proteiny, jejichž prostřednictvím je informace přenesena až do jádra, kde dochází k ovlivnění transkripce.

TGF- β R1 je znám také jako „activin receptor-like“ kináza (ALK). U savců bylo popsáno 7 typů ALK. V souvislosti s tím může jeden ligand vyvolat více různých odpovědí v závislosti na expresi konkrétního typu ALK danou buňkou (Grainger 2007). V krevních cévách se nejčastěji vyskytují ALK1 a ALK5, přičemž ALK1 nacházíme spíše v buňkách endotelu, zatímco ALK5 je detekovatelná v tunica media a adventitia krevních cév (Ruiz-Ortega 2007). ALK1 aktivuje Smad 1/5 a ALK5 naopak Smad 2/3. To hraje důležitou roli v kontrole proliferace a migrace endoteliálních buněk během angiogeneze. Zatímco ALK1 stimuluje proliferaci a migraci endoteliálních buněk, ALK5 tento proces inhibuje (Lebrin 2005).

Endoglin

Endoglin, někdy označován jako receptor pro TGF- β typu III, nemá vnitřní kinázovou aktivitu, ale ovlivňuje TGF- β signalizaci. Vyskytuje se ve dvou izoformách jako L- a S-endoglin lišících se v počtu aminokyselin v jejich cytoplazmatické části receptoru. Ve vysokém množství je exprimován na povrchu endoteliálních buněk, méně pak na monocytech, erytroidních prekurzorech aj. (Chang 2002). Narozdíl od

betaglykanu nemůže endoglin vázat TGF- β bez účasti TGF- β RII (Bertolino 2005). Není ještě zcela úplně jasné jak, ale je prokázáno, že endoglin se váže na TGF- β 1 a TGF- β 3, ne však na TGF- β 2 (Cheifetz 1992, Bellon 1993).

Zvýšená exprese endoglinu v myších fibroblastech byla spojována se sníženou migrací a pozměněnou morfologií buněk (Guerrero-Esteo 1999). V L6E9 myoblastech zvýšená exprese endoglinu snížila citlivost buněk na TGF- β 1, což způsobilo inhibici růstu těchto buněk (Letamendia 1998). Tyto a další výsledky (Lastres 1996) naznačují, že endoglin ovlivňuje odpověď buněk na TGF- β 1, přičemž se předpokládá, že usnadňuje vazbu TGF- β 1 na receptory.

Endoglin *in vitro* zvyšuje expresi endoteliální NO syntázy (eNOS) ovlivněním hladiny Smad 2 (Santibanez 2007). Oxid dusnatý odvozený od endoteliální NO syntázy je důležitý endogenní vazodilatační faktor, který reguluje tonus v krevním řečišti a udržuje anti-trombotické, anti-proliferativní a anti-apoptotické prostředí v stěně cév (Sessa 2004).

Smad proteiny

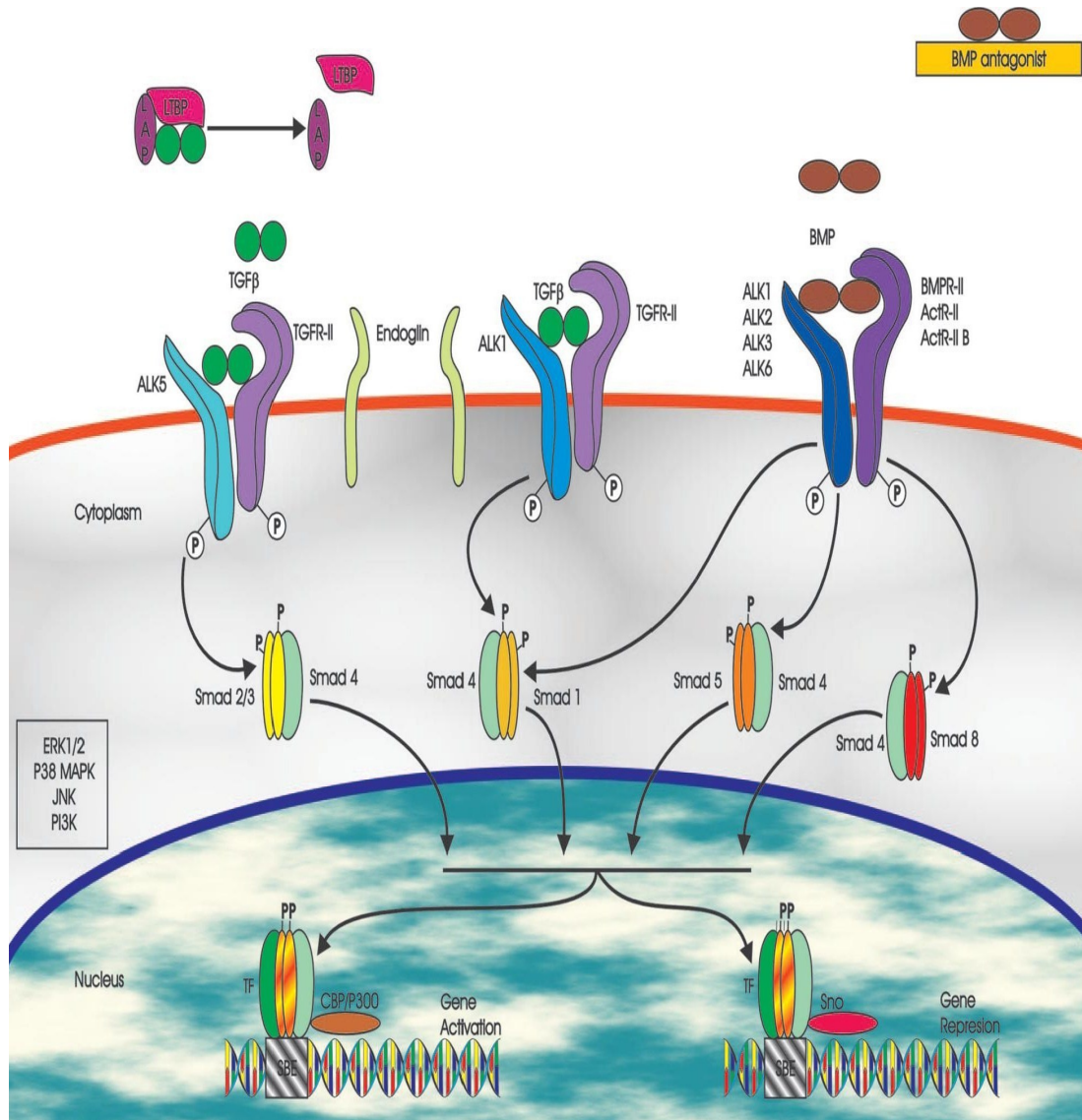
Smad proteiny fungují jako intracelulární poslové, kteří přenášejí signál vyvolaný TGF- β do jádra buněk. Smad proteiny byly objeveny pomocí genetických studií prováděných na *Drosophila* a *Caenorhabditis elegans*. Rodina Smad proteinů může být dále rozdělena na 3 podskupiny. Jedná se o receptory-regulované Smads (R-Smads), „common-partner“ Smads (Co-Smads), které vytvářejí komplexy s R-Smads, a inhibitory Smads (I-Smads).

Aktivovaný TGF- β RI interaguje a fosforyluje R-Smads (jsou to Smad-1,-2,-3,-5 a -8). Takto aktivované R-Smads se poté spojují s Co-Smads (Smad-4) do trimerních komplexů, které pronikají do jádra. Tam se váží na DNA buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím dalších bílkovin a regulují transkripci cílových genů přes transkripční faktory (TF), koaktivátory či korepresory (Hotta 1999, Bobik 2006). I-smads (Smad-6,-7) interagují s aktivovaným TGF- β RI a kompetují s R-Smads v přístupu k tomuto receptoru. Hlavním inhibítozem TGF- β je Smad7.

Výzkumy poukazují i na možnou existenci TGF- β signalizace nezávislé na Smad a naopak Smad proteiny mohou být aktivovány jinými faktory než jen TGF- β , např. ERK1/2, p38MAPK, JNK, and fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K). (Ruiz-Ortega 2007, Bobik 2006).

Podle studií *in vitro* se zdá, že protizánětlivé účinky TGF-β1 jsou zprostředkované především proteiny Smad 3 a Smad 2 (Feinberg 2005).

Obr.7: TGF-β a BMP signalizace v cévní buňce (Bobik 2006)



Statiny

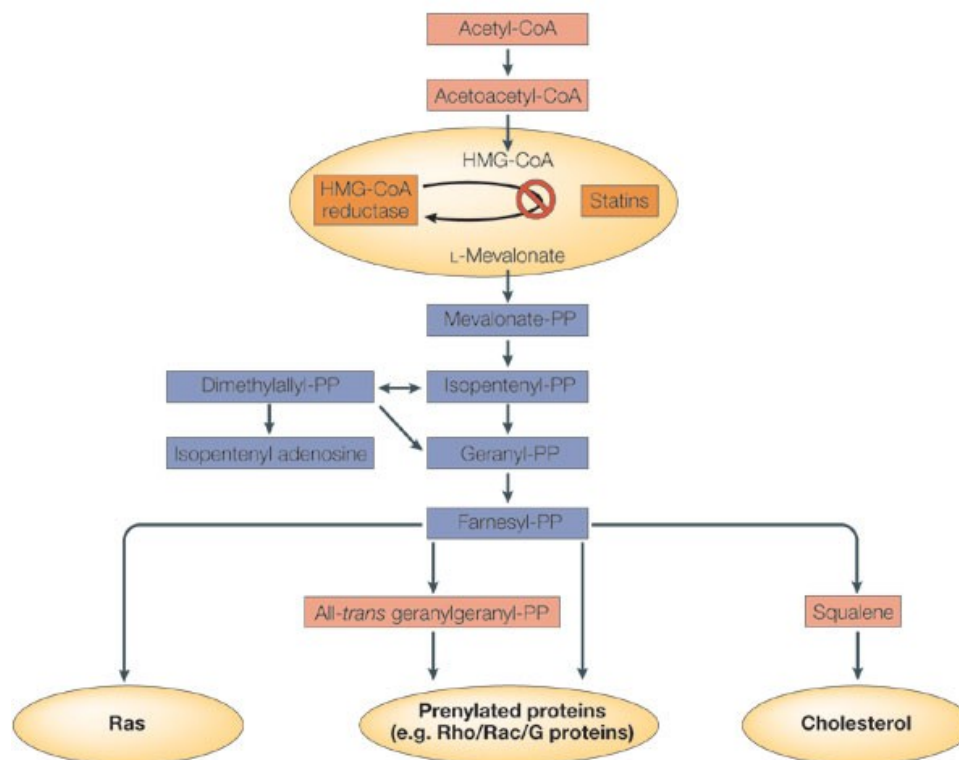
Tyto látky jsou někde uváděny také pod názvem vastatiny a jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypocholesterolemika (Lincová 2002). Patří mezi celosvětově nejpoužívanější hypolipidemika s příznivými účinky nejen na hladiny sérových lipidů, ale i na kardiovaskulární a celkovou mortalitu (Vaughan 2000). Randomizované klinické studie prokázaly, že léčba statiny snižuje výskyt infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhody v primární i sekundární prevenci u pacientů s různě závažnou hypercholesterolémií.

Statiny snižují především hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu. Řada experimentálních i klinických studií ukazuje, že prospěch z užívání statinů je dán nejen jejich schopností snižovat hladiny plazmatických lipidů, ale i jejich četnými extralipidovými účinky, které jsou na snížení plazmatických lipidů nezávislé (Arnaud 2005).

Mechanismus účinku statinů a jejich lipidové účinky

Statiny inhibují klíčový enzym syntézy cholesterolu. Limitující reakcí endogenní biosyntézy cholesterolu je převedení aktivované kyseliny 3-hydroxy-3-methylglutarové (HMG-CoA) na kyselinu mevalonovou (viz. Obr.8). Tuto reakci katalyzuje HMG-CoA-reduktáza lokalizovaná v hladkém endoplazmatickém retikulu jaterních buněk, dá se však prokázat i v jiných tkáních. Statiny obsahují ve své molekule skupiny strukturálně podobné substrátu, proto mohou tento enzym kompetitivně inhibovat. Jeho inhibicí dochází ke snížení nitrobuněčné syntézy cholesterolu a buňka se dostává do situace deficitu cholesterolu. Ten pak vede ke zvýšené transkripci LDL receptorového genu a zvýšené expresi LDL receptorů na buněčné membráně všech buněk, především však hepatocytů. Zvýšená syntéza a zvýšení aktivity LDL receptorů vedou k urychlenému vychytávání LDL z plazmy (Tonolo 2003). Snížení LDL cholesterolu může dosáhnout až 40 %. Navíc dochází obvykle k mírnému zvýšení HDL cholesterolu (až o 15 %) a snížení koncentrace triacylglycerolů až o 25 %. Tento mechanismus není zcela znám. Předpokládá se snížení syntézy VLDL v játrech. Dalším možným mechanismem je zvýšení clearance a odbourávání VLDL cestou LDL receptorů. To je umožněno přítomností apolipoproteinu E na částicích VLDL, který je schopen se vázat na LDL receptor. Nepřímo jsou tak ovlivněny i hladiny HDL (Duriez 2003).

Obr.8: Biosyntéza cholesterolu



www.nature.com/nrn/journal/v6/n4/fig_tab/nrn1652_F1.html&usg=__74wgz82KX5MeaUtA11xfE5a9oPw=&h=523&w=600&sz=38&hl=cs&start=0&zoom=1&tbnid=tPiaiaiYxfZCHM:&tbnh=133&tbnw=153&prev=/images%3Fq%3Dbiosynt%25C3%25A9za%2Bcholesterolu%26um%3D1%26hl%3Dcs%26sa%3DN%26biw%3D1680%26bih%3D890%26tbs%3Disch:10,400&um=1&itbs=1&iact=hc&vpx=340&vpy=156&dur=698&hovh=133&hovw=153&tx=162&ty=77&ei=zUd0TOSaMY6VswaH_5TLCA&oei=zUd0TOSaMY6VswaH_5TLCA&esq=1&page=1&ndsp=43&ved=1t:429,r:28,s:0&biw=1680&bih=890

30. srpen 2010

Pleiotropní (extralipidové) účinky statinů

Kromě příznivého účinku na hladiny krevních lipidů mají statiny další, na lipidech zcela nezávislé vlastnosti, které se podílejí na snižování kardiovaskulárního rizika. Jsou označovány jako tzv. pleiotropní účinky (Vaughan 2000). Pleiotropní účinky vyplývají z inhibice HMG-CoA-reduktázy. Kyselina mevalonová je prekurzorem nejen cholesterolu, ale i množství nesteroidních isoprenoidních sloučenin, které se účastní procesů buněčného metabolismu a mezibuněčné komunikace. Mezi nejdůležitější pleiotropní účinky statinů patří zlepšení endoteliální funkce, antitrombogenní, protizánětlivé a antioxidační účinky (Mehta 2003).

Vliv na endoteliální dysfunkci

Charakteristickým příznakem endoteliální dysfunkce je poškozená syntéza, uvolňování NO z endotelu a také jeho aktivita. Statiny zlepšují endoteliální dysfunkci zčásti snížením LDL cholesterolu, specifičtěji však působí na expresi a aktivitu endoteliální NO syntázy (eNOS), enzymu, který katalyzuje vznik NO z L-argininu, čímž zvyšují dostupnost NO. Předpokládá se, že statiny takto kompenzují nedostatečnou tvorbu NO v aterosklerotických lézích a působí tak proti progresi aterosklerózy (Vaughan 2000). Tlumí i uvolňování a aktivitu vazokonstrikčních látek (například endotelinu a angiotenzinu II) (Auer 2002).

Antitrombogenní účinky

Antitrombotické působení statinů spočívá v příznivém ovlivnění agregace destiček, krevní viskozity, hladin tkáňového faktoru a jeho přirozeného inhibitoru, fibrinogenu, tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA) a jeho přirozeného inhibitoru (PAI-1) a rovněž lipoproteinu (a). Dochází k inhibici buněčné exprese tkáňového faktoru v mikrofázích, k normalizaci tvorby trombinu u pacientů s hypercholesterolémií (Palinski 2002). Dále má snížení agregace destiček pravděpodobně vztah k redukcii obsahu cholesterolu v jejich buněčných membránách (Laufs 2003).

Statiny přispívají také ke stabilizaci aterosklerotického plátu. Snižují hladiny oxidovaného LDL cholesterolu a jeho vychytávání makrofágy, inhibují matrixové metaloproteinázy, které se podílejí na destabilizaci aterosklerotických plátů, zvyšují obsah kolagenu v plátech (Comparato 2001).

Protizánětlivé účinky

Statiny mají též protizánětlivé účinky, snižují hladinu C-reaktivního proteinu, jehož hladina je zvýšená i při rozvoji aterosklerózy. Významné je i snižování exprese mnoha adhezních a chemotaktických molekul a inhibice aktivity integrity (Arnaud 2005).

Antioxidační účinky

Uvažuje se minimálně o 4 mechanismech antioxidačního působení: 1) jelikož dochází ke snížení koncentrace LDL cholesterolu, vzniká tím pádem i méně oxLDL, 2) inhibicí NADH oxidáz dochází ke snížení tvorby vaskulárních a endoteliálních superoxidů; vzniku oxLDL brání i udržování aktivity vnitřních antioxidačních systémů

(například superoxid dismutázy), 3) přímou vazbou statinů na fosfolipidy lipoproteinové částice dochází k ochraně lipidového jádra před volnými radikály, 4) silná antioxidační aktivita statinových metabolitů (např. u atorvastatinu a fluvastatinu) rovněž přispívá k ochraně před oxidačními procesy (Calabro 2005).

Další účinky statinů

Výzkumy potvrdily, že statiny inhibují růst nádorových buněk. Bylo zjištěno, že většina nádorových buněk vykazuje zvýšenou aktivitu HMG-CoA reduktázy, proto se předpokládá, že selektivní inhibice tohoto enzymu by mohla vést k novým možnostem léčby rakoviny.

Statiny se uplatňují i v kostním metabolismu. Dochází ke snížení aktivity osteoklastů a snížení kostní resorpce, naopak se zvyšuje novotvorba kostní hmoty. Pravděpodobně proto je podávání statinů spojené se sníženým rizikem vzniku kostních zlomenin u pacientů starších 50 let (Wierzbicki 2003).

I když je působení pleiotropních účinků jistě významné, je třeba zdůraznit, že jejich role je ve srovnání s hypolipidemickým efektem pravděpodobně méně důležitá. Za převážnou většinu pozitivních kardiovaskulárních účinků statinů stojí jejich vliv na LDL-cholesterol.

Atorvastatin

Atorvastatin patří v současné době k nejvíce užívaným statinům. Je podáván ve formě aktivní látky. Po perorálním podání se snadno a rychle vstřebává, maximálních plazmatických koncentrací je dosaženo přibližně za 2,5 hodiny. Z důvodu vysokého first-pass metabolismu v játrech je biologická dostupnost atorvastatinu pouze 12 %. Přibližně z 98 % se váže na plasmatické bílkoviny. Je metabolizován cytochromem P450 3A4 na biologicky aktivní metabolity, které přispívají k inhibici HMG-CoA reduktázy asi ze 70 %. Po hepatální a extrahepatální metabolizaci jsou atorvastatin a jeho metabolity primárně eliminovány žlučí, přičemž nedochází k enterohepatální cirkulaci. Jeho eliminační poločas je v průměru 14 hodin, ale díky přítomnosti aktivních metabolitů přetrvává inhibiční účinek na HMG-CoA reduktázu asi 24 hodin (Regazzi 1994).

Nežádoucí účinky atorvastatinu jsou mírné a mají přechodný charakter, lék je obecně dobře snášen. Nejčastěji se vyskytují zažívací potíže, bolesti hlavy a svalů, kopřivka nebo ospalost. Stejně tak jako u jiných statinů, i po podání atorvastatinu bylo

popsáno zvýšení hladin jaterních transamináz. Výskyt závažné rabdomyolýzy spojované s léčbou statinů, která může vést až k ledvinnému selhání, však zatím u atorvastatinu nebyl prokázán.

I když studie na zvířatech nepotvrdily teratogenní účinky atorvastatinu, všechny statiny jsou kontraindikovány v těhotenství a u kojících matek (Sinzinger 2002).

Cíl práce

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit a popsat expresi fosforylované formy p-Smad2 jako jednoho z členů kaskády pro transformující růstový faktor beta (TGF- β) v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficientní skupiny myši s ohledem na podávání atorvastatinu za použití imunohistochemických metod. Cílem bylo prokázat, zda atorvastatin ovlivňuje expresi p-Smad2 bez hypolipidemických účinků.

Experimentální část

Samice myši kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru o hmotnosti 15–20 gramů, byly zakoupeny ve společnosti Taconic Europe (Dánsko). Všechny myši byly ustájeny ve zvířinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Pokusná zvířata, předepsaná dieta

U všech myši byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní skupinu tvořily myši, kterým byla podávána pouze standardní dieta. Druhou (léčenou, atorvastatinovou) skupinu zase myši, kterým byla podávána standardní dieta obohacena o 50 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně (50mg/1kg/den).

Obě skupiny byly krmeny experimentálními dietami po dobu 8 týdnů. Každá z myši byla chována v samostatné kleci, obdržela denně 6 g potravy (speciálně upravené granule) a měla volný přístup k vodě po celou dobu této studie. Během experimentu nebyly pozorovány žádné signifikantní změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a jako typ usmrčení jsme zvolili předávkování v parách éteru. Zvířatům jsme odebrali ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika) a následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v mrazničce při teplotě minus 80°C.

Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla zaslána a prováděna na gerontologickou a metabolickou kliniku Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu v krvi byly stanoveny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm a triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

Histologické barvení olejovou červení

Barvení olejovou červení se používá k detekci lipidů ve tkáních. Tuto metodiku jsme v tomto experimentu využili pro stanovení množství lipidů v aterosklerotických lézích.

Postup při barvení Oil Red O:

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

Zásobní roztok Oil Red O je připravován rozpuštěním 0,5 g Oil Red O ve 100 ml isopropanolu. Pracovní roztok se připravuje v čas potřeby z 60 ml zásobního roztoku, který se smíchá s 40 ml destilované vody a filtruje se přes papírový filtr.

Imunohistochemie

Všechna imunohistochemická barvení byla provedena na cévách, které byly získané z geneticky modifikovaného kmene myší. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru o hmotnosti 15-20 gramů.

Vypreparované segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly poté ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v mrazničce při teplotě minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v aortálním sinu o délce 1 cm a v části aortálního oblouku. Pro experimentální hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese p-Smad2 byla použita metodika avidin-biotin s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Primární protilátky

Pro detekci exprese p-Smad2 v cévní stěně jsme použili pro světelnou mikroskopii polyklonální protilátku: **Rabbit Anti-Phospho-Smad2 (Ser465/467) Polyclonal Antibody** (Chemicon, USA) v ředění 1/100 s inkubací v chladničce přes noc.

Sekundární protilátky

Jako sekundární protilátka jsme použili pro světelnou mikroskopii monoklonální protilátku Goat Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories).

Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu byl použit roztok diaminobenzidinu (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA).

Pracovní postup - ABC systém

Tkáňové řezy byly přeneseny na sklíčka předem upravené v roztoku želatiny. Po oschnutí (60 minut) se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného při teplotě minus 20°C. Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Po patnáctiminutovém usušení se řezy vložily do roztoku PBS k oplachu (2x5 minut).

Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo prvně nezbytné zablokovat nespecifická vazebná místa třicetiminutovou inkubací s 10% roztokem goat séra (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo) v roztoku PBS. Poté byly na laboratorní sklíčka napipetovány roztoky anti-avidinu a anti-biotinu, které zablokovaly reaktivitu těchto látek v myší tkáni.

Sklíčka se pak přes noc inkubovala v chladničce s primární protilátkou při teplotě 4°C . Poté se řezy vložily k oplachu do roztoku PBS (2x5minut) a dále do 3% H₂O₂ (15 minut).

Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy 30 minut inkubovaly s biotinylovanou

sekundární protilátkou Goat Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories) a opět se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). V další fázi byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories).

K vizualizaci navázané protilátky se použil chromogen DAB (DAKO, Carpinteria, USA). V konečné fázi byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xylenu (10:1) (3 minuty), aceton-xylenu (1:10) (3 minuty) a v xylenu (3 x 2 minuty). Jako poslední krok před vlastním mikroskopickým pozorováním byla sklíčka zamontována do Eukittu.

Statistická 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).

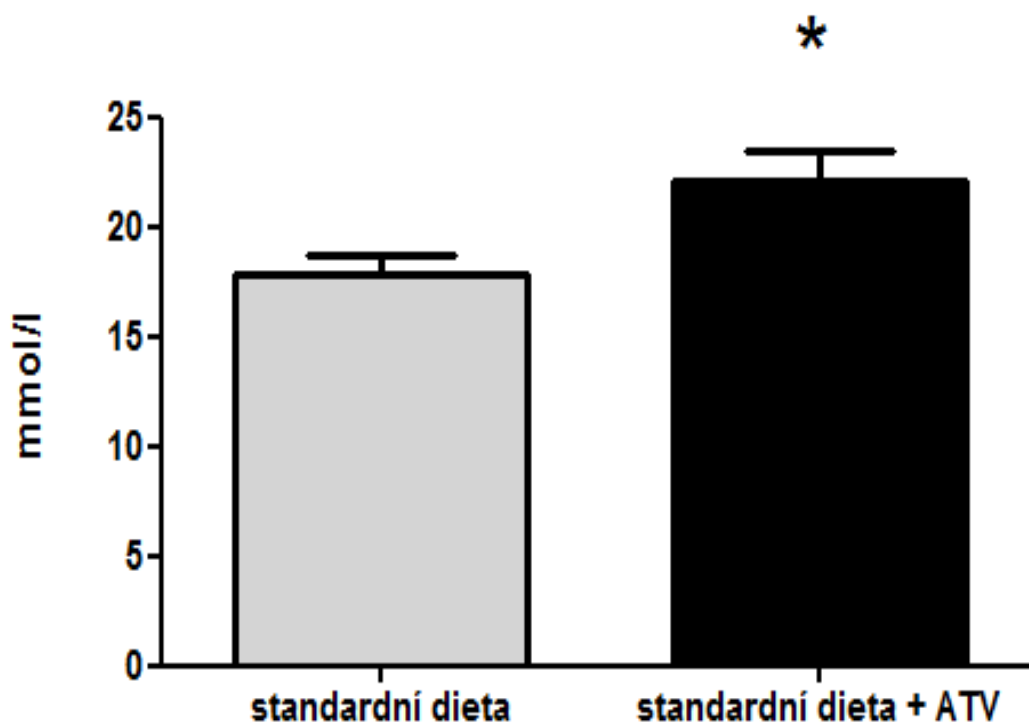
Výsledky

Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu. Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 50 mg/kg statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu (viz. graf 1).

Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší.

Osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (* $P \leq 0,05$).

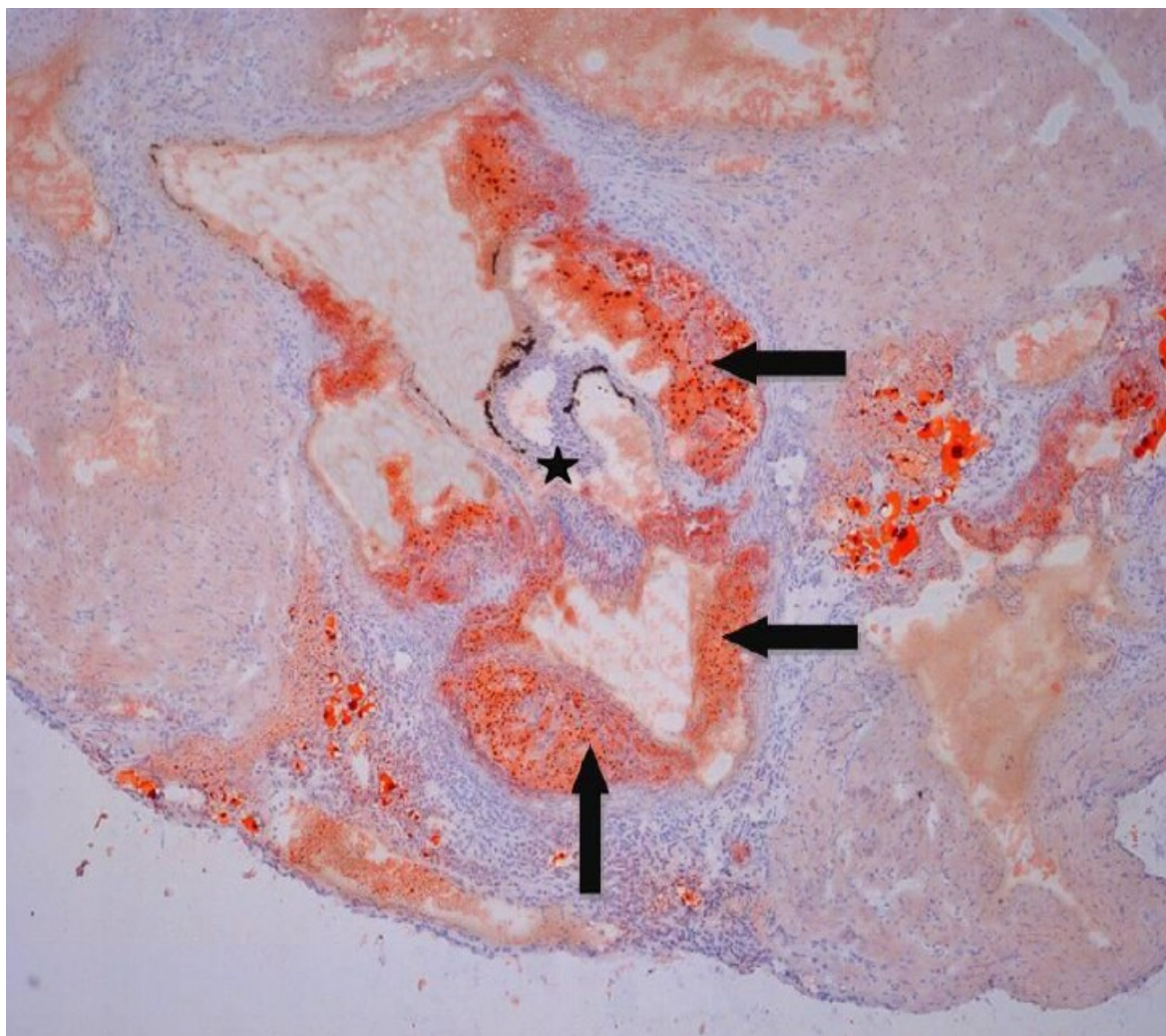


Histologické barvení olejovou červení

Barvení olejovou červení bylo provedeno za účelem kvantifikace velikosti aterosklerotických plátů u myši krmených standardní dietou a u myši, které měly k dietě přidán atorvastatin. U všech řezů v kontrolní i atorvastatinové skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí (obr.9 a 10). Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Aterosklerotické léze byly výrazně vyvinuty, přičemž u řady z nich byla již nalezena ateromová nekrotická jádra. Podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu poklesu velikosti aterosklerotických plátů ve srovnání s neléčenou skupinou.

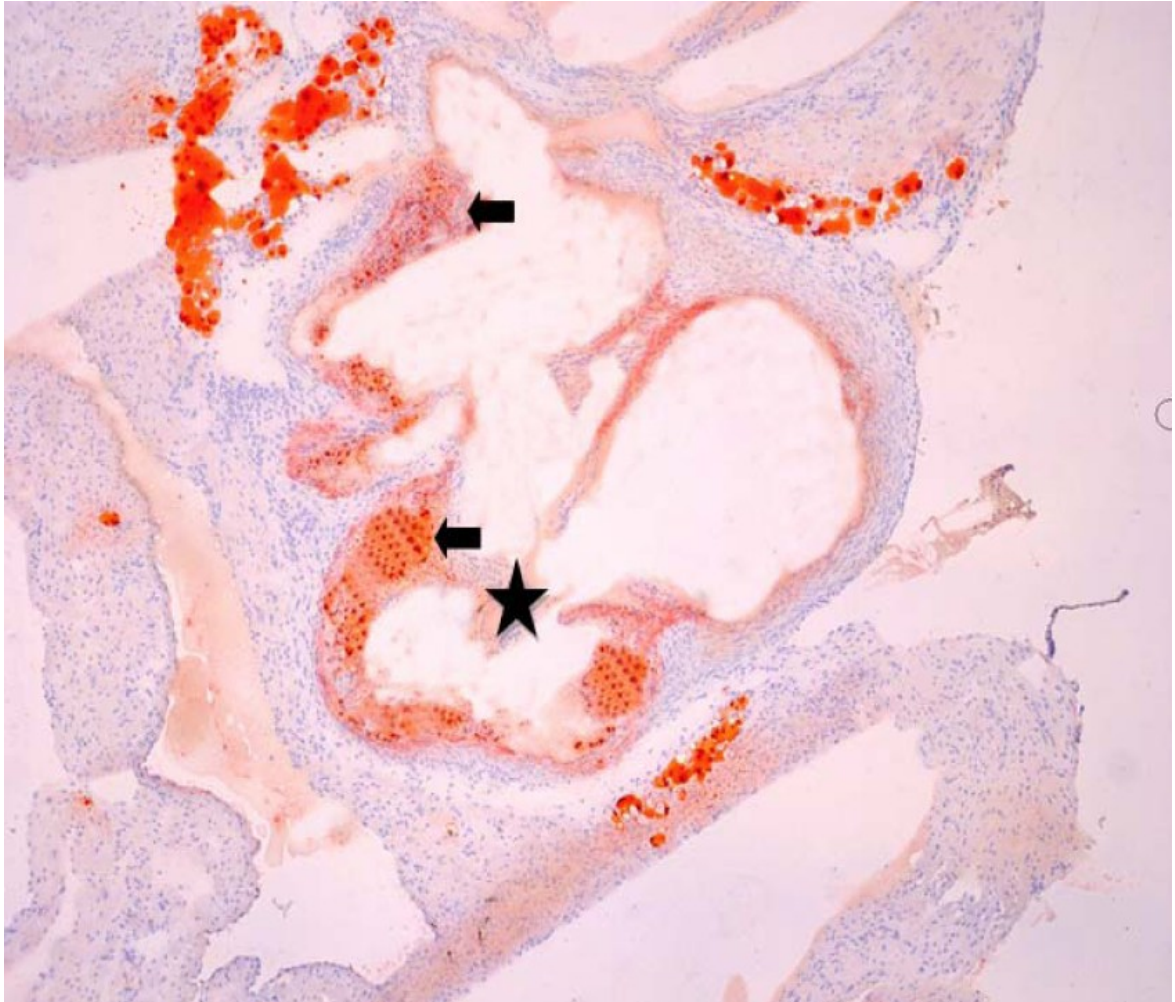
Obr.9: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána standardní dieta.

Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Zvětšení preparátu 40x.



Obr.10: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u atorvastatinové skupiny zvířat, kterým byla podávána standardní dieta společně s atorvastatinem.

Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Intenzita a plocha barvení olejovou červení je výrazně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení preparátu 40x.



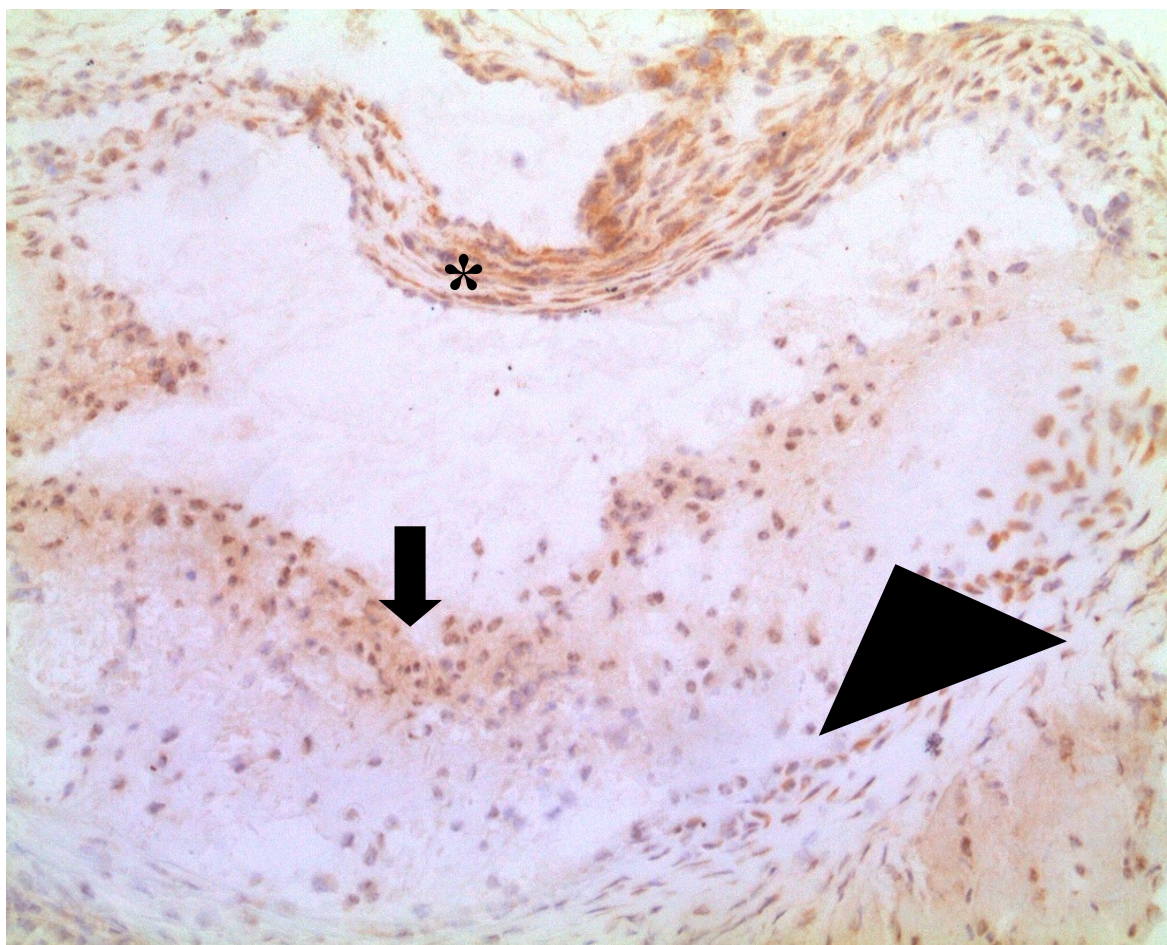
Imunohistochemická analýza

Imunohistochemické barvení p-Smad2 v oblasti aortálního sinu

Expresi p-Smad2 byla pozorována v aterosklerotických plátech obou skupin zvířat. Expresi byla pozorována v medii cév, v plátu, na chlopních a částečně na cévním endotelu na povrchu plátů. (viz obr. 11 a 12). Podávání atorvastatinu obecně zvýšilo expresi p-Smad2 zejména v plátu a na cévním endotelu ve srovnání s kontrolní skupinou.

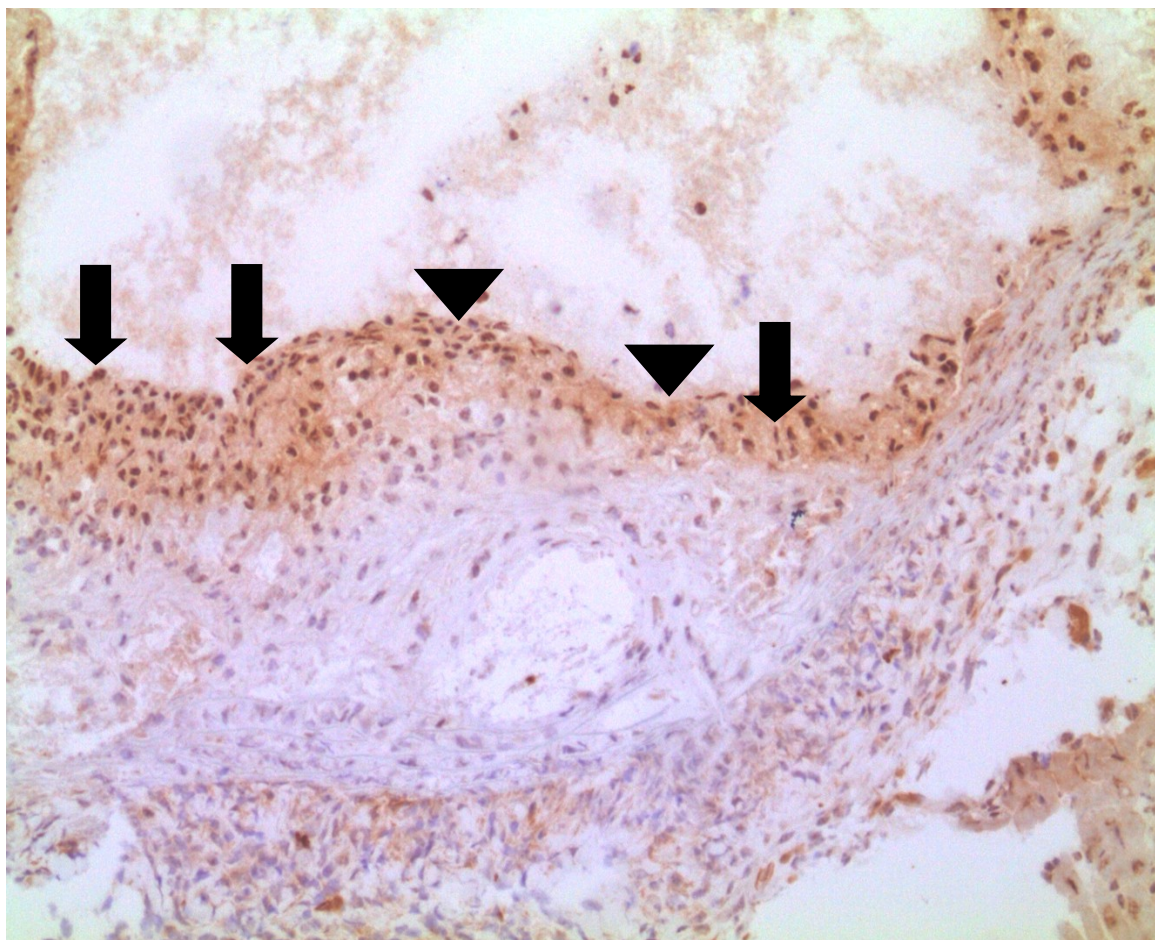
Obr.11: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení p-Smad2 u kontrolní skupiny.

Expresi p-Smad2 je lokalizována v chlopních (hvězdička), v aterosklerotických plátech (šipky) a v medii cévy (hroty šipky) a také na cévním endotelu na povrchu plátů (šipky). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšeno 200x



Obr.12: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení p-Smad2 u atorvastatinové skupiny.

Expres p-Smad2 je výraznější na povrchu plátu (šipky), a na cévním endotelu (hroty šipky) ve srovnání s kontrolní skupinou. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšeno 200x



Diskuse

U savců jsou exprimovány tři izoformy transformujícího růstového faktor beta TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3). Transformující růstový faktor beta1 (TGF- β 1) je nejvýznamněji exprimován v cévách. Tento cytokin hraje důležitou roli v procesu aterogeneze. Má významný protizánětlivé účinky, ovlivňuje aktivitu a činnost makrofágů, T-lymfocytů. Kromě výrazných protizánětlivých účinků v aterogenezi TGF- β podporuje tvorbu extracelulární matrix. Dále byl prokázán pozitivní vztah mezi aktivitou TGF- β a snížením velikosti léze, dále mezi aktivitou TGF- β a zvýšením stability aterosklerotických plátů. Tento jev nastává díky výše popsané inhibici zánětlivé reakce v plátech s podporou tvorby extracelulární matrix hladkými svalovými buňkami, což by ukazovalo na protektivní vliv TGF- β v aterogenezi. Tato hypotéza byla podpořena několika experimentálními studiemi, kde jistá blokáda účinku TGF- β 1 vedla k rozvoji nestabilních aterosklerotických plátů, charakterizovaných silnou zánětlivou reakcí, sníženou produkcí kolagenu a zvýšenou akumulací cholesterolu.

Vlastní účinky TGF- β 1 jsou zprostředkovány jeho receptory TGF- β RI a TGF- β RII, které pak prostřednictvím tzv. Smad proteinu vedou k transkripci příslušných genů. Expres Smad2 byla popsána na cévním endotelu *in vivo*. Navíc bylo zjištěno, že fosforylovaná forma Smad 2/3, (p-Smad2/3). Je zvyšována po podávání atorvastatinu, kde toto podávání bylo také doprovázeno hypolipidemickým účinkem.

V této rigorózní práci jsme se zaměřili na sledování exprese pouze p-Smad2 v situaci, kdy atorvastatin naopak zvyšoval hladiny cholesterolu. Navzdory tomuto hyperlipidemickému účinku došlo k poklesu velikosti plochy aterosklerotických plátů. Zároveň došlo obecně ke zvýšené imunohistochemické reakci p-Smad2 po podávání atorvastatinu ve srovnání s kontrolní skupinou. Na základě tohoto jevu lze konstatovat, že exprese p-Smad2 byla navzdory hyperlipidemickému účinku, zvýšena po podávání atorvastatinu.

TGF- β 1 je schopen aktivovat obecně několik cest, které v zásadě vedou k aktivaci dvou Smad kaskád. Jednu skupinu s podobnými účinky tvoří Smad2 a Smad3 a druhou skupinu většinou s jinými účinky tvoří Smad1 a Smad5. Smad2 a Smad3 jsou aktivovány díky interakci TGF- β 1/ALK5. Právě tato kaskáda se zdá být zásadní pro k aterogenezi. Pokud se týká cévního endotelu, tak zde je zřejmě významnější Smad2. Smad2 je schopen díky kompetici s NF- κ B zvyšovat expresi eNOS a tedy produkci NO, čímž se také podílí na snížení exprese adhezních molekul. Expres Smad2 také

ovlivňuje chování a činnost hladké svaloviny. Obecně lze říci, že Smad2 má spíše inhibiční vliv na proces aterogeneze, a jejich exprese během aterogeneze v aterosklerotických plátech klesá.

Z našich výsledků by tedy šlo usuzovat, že pokud je exprese p-Smad2 zvýšena bude zvýšena také exprese eNOS a tedy NO. Zvýšená produkce NO má několik významných antiaterogenních účinků, ke kterým patří inhibice exprese adhezních molekul, proliferace hladké svaloviny, což jsou faktory, které inhibují proces aterogeneze. Toto tvrzení je ovšem ještě nutno ověřit. Vzhledem k tomu, atorvastatin neměl v této práci hypolipidemické účinky, lze konstatovat, že na zvýšení exprese p-Smad2 se podílely jeho tzv. nepřímé neboli pleiotropní účinky.

Celkově lze tedy konstatovat, že podávání atorvastatinu vedlo k hyperlipidemickému účinku, který byl ovšem doprovázen zvýšenou expresí p-Smad2 a snížením velikostí aterosklerotických plátů. V této fázi nelze určit, zda nárůst exprese p-Smad2 je markerem změn ve stěně cévy, nebo zdali by toto zvýšení exprese mohlo být příčinou zmenšení aterosklerotických lézí

Závěr

Výsledky této rigorózní práce prokázaly expresi jednoho z členů TGF- β kaskády, p-Smad2, v aterosklerotických plátech v cévní stěně u apoE/LDLR deficientního myšího modelu aterosklerózy.

Exprese p-Smad2 byla pozorována v aterosklerotických plátech obou skupin zvířat. Exprese byla pozorována jak na endotelu plátů, tak i mimo něj. Dále byla exprese nalezena uvnitř plátů a někde také v medii cév.

Podávání atorvastatinu v dávce 50 mg/kg/den vedlo k výraznému hyperlipidemickému efektu.

Navzdory tomuto jevu byla snížena velikost plochy aterosklerotických plátů.

Podávání atorvastatinu vedlo ke zvýšení exprese p-Smad2, zejména v oblasti povrchu plátů a na cévním endotelu ve srovnání s kontrolní skupinou.

V této fázi nelze určit, zda nárůst exprese p-Smad2 je markerem změn ve stěně cévy nebo zdali by toto zvýšení exprese p-Smad2 mohlo být příčinou zmenšení aterosklerotických lézí.

Seznam zkratek

AII	angiotenzin II
ALK	aktivin receptor-like kináza
ALK5	aktivin receptor-like kinase 5
ApoE	apolipoprotein E
ApoE ^{-/-}	apoE deficitní myši
ApoE ^{-/-} /LDLr ^{-/-}	myši deficitní pro ApoE i LDL-receptor
BFGF	základní růstový faktor fibroblastů, basic fibroblast growth factor
BMP	kostní růstový protein, bone morphogenetic protein
CETP	cholesterol ester transfer protein
Co-Smads	„common-partner“ Smads
CRP	C-reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
EDGF	endothelium derived growth factor
E3L	ApoE*3-Leiden transgenní myš
ERK1/2	extracelulární signál regulující kináza 1/2
eNOS	endoteliální syntetáza oxidu dusnatého
Hb	hemoglobin
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
HMG-CoA	3-hydroxy- 3-methylglutarylkoenzym A
IDL	intermediate density lipoproteins, lipoproteiny se střední hustotou
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula
IL-1, IL-6, IL-8	interleukin-1, -6, -8
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
INF- γ	interferon gamma
I-Smads	inhibitory Smads
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LAP	latentní asociovaný peptid
LDL	lipoprotein o nízké hustotě

LDLr	LDL-receptor
LDLr ^{-/-}	LDL-receptor deficitní myš
LTBP	protein vázající latentní TGF- β
MCP-1	monocyty přitahující protein
M-CSF	macrophage colony stimulating factor, růstový hormon makrofágů
MMPs	matrixové metaloproteinasy
MG-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NF-kB	nukleární faktor kappa-B
NO	oxid dusnatý
NO-syntáza	syntáza oxidu dusnatého
OCT medium	zmrazovací medium
oxLDL	oxidovaný LDL
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu-1
PBS	fosfátový pufr
PDGF	destičkový růstový faktor
PECAM-1	adhezní molekula destičkových a endotelových buněk
PI3K	fosfatidyl-inositol-3-kináza
p-Smad2/3	fosforylovaný Smad2/3
p38 MAP-kináza	p38 mitogenem aktivovaná protein-kináza
R-Smads	receptory-regulované Smads
SEM	střední chyba průměru
Smad	protein regulující funkci TGF- β , fungující jako transkripční faktor
TGF- β	transformující růstový faktor- β
TGF- β RI, TGF- β RII	receptor pro TGF- β typu I a typu II
TK	krvní tlak
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	adhezní molekula-1 cévních buněk
VLA	very late antigens
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

Seznam použité literatury

1. Ali K, Middleton M, Pure E, Rader DJ: Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo, *Circ Res*, 2005, vol. 97, no. 9, s. 922-927
2. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H: Protective role of endothelial nitric oxide synthase, *J Pathol*, 2003, 199, 8-17.
3. Altman R: Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point, *Thrombosis Journal*, 2003
4. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB: Making sense of latent TGF- β activation, *Journal of Cell Sciences* 2003, 116: 217-224
5. Arnaud C, Mach F: Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation, *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005, vol. 98, no. 6, s. 661-666
6. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB: Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response, *Nat Cell Biol*, 1999, no. 1, s. 260 –266
7. Auer J, Berent R, Weber T, Eber B: Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond, *Curr Med Chem*, 2002, vol. 9, no. 20, s. 1831-1850
8. Baumhoer D, Steinbrück I, Götz: *Kurzlehrbuch histologie*, Urban&Fischer, 2003, s. 91-98, ISBN 3-437-42231-6
9. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabeu C: Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions, *Eur J Immunol*, 1993, vol. 23, no. 9, s. 2340-2345
10. Bellosta S, Ferri N, Arnaboldi L, Bernini F, Paoletti R, Corsini A: Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes, *Diabetes Care*, 2000, 23 Suppl 2, B72-78
11. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P: Transforming growth factor- β signal transduction in angiogenesis and vascular disorders, *Chest*, 2005, no. 128, s. 585-590
12. Bjorkbacka H. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*, 2008, vol. 19, no. 5, s. 548-549

13. Blobe GC, Schiemann WP, Lodisch HF: Role of transforming growth factor β in human disease; *N Engl J Med* 2000, 342: 1350-1358
14. Bobik A: Transforming Growth Factor- β s and Vascular Disorders, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, vol. 26, 1712-1720
15. Bonnefont-Rousselot D, Beaudoux JL, Therond P, Peynet J, Legrand A, Delattre J: Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts, *Ann Pharm Fr*, 2004, vol. 62, no. 3, s. 147-157
16. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM: Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium – dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2333-2340
17. Brasen JH, Niendorf A: Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance, *Pathologe*, 1997, vol. 18, no. 3, s. 218-227
18. Brustolin S, Giugliani R, Félix TM: Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders, *Braz J Med Biol Res* 2010, 43: 1-7
19. Bultas J, Cífková R, Češka R, et al.: *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční*, Praha, Galén 1999, 127s., ISBN 8072620266
20. Calabro P, Yeh ET: The pleiotropic effects of statins, *Curr Opin Cardiol*, 2005, vol. 20, no. 6, s. 541-546
21. Carr AC, McCall MR, Frei B: Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, vol. 20, no. 7, s. 1716-1723
22. Celemajer DS: Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997, 30: 325-333
23. Češka R: *Cholesterol a ateroskleróza. Léčba hyperlipidemií*, Praha, Maxdorf 1999, 226s.
24. Chang H, Brown CW, Matzuk MM: Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily, *Endocrine reviews* 2002, 23: 787-823
25. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD: Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation, *Vascul Pharmacol*, 2008, 49, 134-140
26. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M: Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells, *J Biol Chem*, 1992, vol. 267, no. 27, s. 19027-19030
27. Chobanian AV, Dzau VJ: Vascular smooth muscle and atherosclerotic vascular

- disease. In: Futer V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary Artery disease*, Vol.1, Philadelphia, *Lippincott-Raven* 1996, 237-42
28. Cipollone F, Fazio M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cucurullo C, Uchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cucurullo F, Mezzetti A, Porreca E: Increased expression of transforming growth factor- 1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques, *Stroke*, 2004, no. 35,s. 2253–2257
 29. Comparato C, Altana C, Bellosta S, Baetta R, Paoletti R, Corsini A: Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction?, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2001, vol. 11, no. 5, s. 328-343
 30. Coniglio RI, Colombo O, Vasquez L, Salgueiro AM, Otero JC, Malaspina MM: [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. *Medicina (B Aires)*, 1997, vol. 57, no. 1, s. 21-28
 31. Corsini A, Raiteri M, Soma MR, Bernini F, Fumagalli R, Paoletti R: Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, *Am J Cardiol*, 1995, vol. 76, no. 2, s. 21A-28A
 32. D'agostino RB, JR, Hamman RF, Karter AJ, Mykkanen L, Wagenknecht LE, Haffner SM: Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study, *Diabetes Care*, 2004, vol. 27, no. 9, s. 2234-2240
 33. Daubresse JC: Atherosclerosis and nutrition, *Rev Med Brux*, 2000, vol. 21, no. 4, s. A359-362
 34. Davignon J: Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, vol. 25, no. 2, s. 267-269.
 35. Delsing DJ, Jukema JW, Van De Wiel MA, Emeis JJ, Van Der Laarse A, Havekes LM, Princen HM: Differential effects of amlodipine and atorvastatin treatment and their combination on atherosclerosis in ApoE*3-Leiden transgenic mice, *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003, vol. 42, no. 1, s. 63-70
 36. Duriez P: Mechanisms of actions of statins and fibrates. *Therapie*, 2003, vol. 58, no. 1, s. 5-14
 37. Egorova MO: Increased serum level of the acute inflammation phase parameter CRP and the high level of low density lipoprotein cholesterol - factors of increased risk of development of atherosclerosis and its complications, *Klin Lab Diagn*, 2002, no.6, s. 3-6

38. Esaki T, Hayashi T, Muto E, Yamada K, Kuzuya M, Iguchi A: Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 1997, vol. 128, no. 1, s. 39-46
39. Faggiotto A, Ross R: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque, *Arteriosclerosis*, 1984, no. 4, s. 341-356
40. Fan J, Watanabe T: Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis, *J Atheroscler Thromb* 2003, 10: 63-71
41. Feinberg MW, Jain MK: Role of transforming growth factor-beta1/Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis, *Panminerva Med*, 2005, vol. 47, no. 3, s. 169-186
42. Fejfar Z, Přerovský I: *Klinická fyziologie krevního oběhu*, Galén 2002, 361s., ISBN 8072621300
43. Fruchart JC, Duriez P: Fundamental data on atherosclerosis, *Ann Endocrinol (Paris)* 62: 93-100, 2001
44. Gerrity RG: The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions, *Am J Pathol*, 1981, no. 103, s. 181-190
45. Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Tedgui A, Mallat Z, Groux H: Specific abrogation of transforming growth factor-beta signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice, *Blood*, 2003, 102, 4052-4058.
46. Grainger DJ: Transforming growth factor-b and atherosclerosis: so far so good for the protective cytokine hypothesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:399-404
47. Grainger DJ, Kemp BR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schonfield PM, and Chauhan A: The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nature Med* 1995, 1: 74-79
48. Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E: Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice, *J Immunol*, 2004, vol. 173, no. 10, s. 6366-6375
49. Gregor P, Widimský P, et al.: *Kardiologie*, Praha, Galén 1999, 595s., ISBN

50. Groot PH, Van Vlijmen BJ, Benson GM, Hofker MH, Schiffelers R, Vidgeon-Hart M, Havekes LM: Quantitative assessment of aortic atherosclerosis in APOE*3 Leiden transgenic mice and its relationship to serum cholesterol exposure, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, vol. 16, no. 8, s. 926-933
51. Gryglewski RJ, Chlopicki S, Swies J, Niezabitowski P: Prostacyclin, nitric oxide, and atherosclerosis, *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 748, 194-206; discussion 206-197.
52. Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA, Fabra A, Garcia-Pardo A, Vera S, Letarte M, Bernabeu C: Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts, *Eur J Cell Biol*, 1999, vol. 78, no. 9, s. 614-623
53. Hallan S, De Mutsert R, Carlsen S, Dekker FW, Asarod K, Holmen J: Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis*, 2006, vol. 47, no. 3, s. 396-405
54. Hosseinsabet A, Mohebbi A, Almasi A: C-reactive protein and coronary calcium score association in coronary artery disease, *Cardiol j*, 2008, vol.15, no.5, s.431-6
55. Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Liu W, Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T, Kohno M: Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria, *Eur J Pharmacol*, 1999, vol. 380, no. 1, s. 37-48
56. Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G: Novel risk factors for atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and cholesterol as predictors of peripheral arteriopathy, *Ital Heart J Suppl*, 2001, vol. 2, no. 9, s. 1031-1033
57. Jawien J, Nastalek P, Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis, *J Physiol Pharmacol*, 2004, vol. 55, no. 3, s. 503-517
58. Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, Ilyinskaya O, Smirnov V, Tararak E, Bobik A: Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004 24, 1391-1396
59. Keaney JF, JR: Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction, *Mol Aspects Med*, 2000, vol. 21, no. 4-5, s. 99-166
60. Krejsek J, Kunes P, Andrys C, Holicka M, Novosad J, Kudlova M, Kolackova M: Innate immunity, receptors for exogenous and endogenous danger patterns in

- immunopathogenesis of atherosclerosis--part II: TLR receptors, significance of genetic polymorphism of danger signals receptors, *Cas Lek Cesk*, 2005, vol. 144, no. 12, s. 790-794
61. Krieglstein CF, Granger DN: Adhesion molecules and their role in vascular disease, *Am J Hypertens*, 2001, vol. 14, no. 6 Pt 2, s. 44S-54S
 62. Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Aalmendro N, Raab U, Lopez LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabeu C: Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1, *J Cell Biol*, 1996, vol. 133, no. 5, s. 1109-1121
 63. Laufs U, Liao JK: Isoprenoid metabolism and the pleiotropic effects of statins, *Curr Atheroscler Rep*, 2003, vol. 5, no. 5, s. 372-378
 64. Laurila A, Bloigu A, Nayha S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P: Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, vol. 17, no. 11, s. 2910-2913
 65. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P: TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*, 2005, vol. 65, no. 3, s. 599-608
 66. Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C: Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan, *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, no. 49, s. 33011-33019
 67. Lincová D, Hassan F: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha 2002, s.242-243, ISBN 80-7262-168-8
 68. Linton MF, Fazio S: Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, vol. 27 Suppl 3, no. s. S35-40
 69. Linß W, Fanghänel J: *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie*, Walter de Gruyter, 1998, s. 95-101, ISBN 3-11-014032-2
 70. Lüllmann-Rauch R: *Taschenlehrbuch Histologie*, Thieme, 2006, s.244-250, ISBN 3-13-129242-3
 71. Lusis A: Atherosclerosis, *Nature* 2000, 407: 233-241
 72. Lutgens E, Daemen M, Kockx M, Doevendans P, Hofker M, Havekes L, Wellens H, Demuinck ED: Atherosclerosis in APOE*3-Leiden transgenic mice: from proliferative to atheromatous stage, *Circulation*, 1999, vol. 99, no. 2, s. 276-283
 73. Mallat Z, Gojova A, Marchinol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R,

- Fradelizi D, and Tedgui A: Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotyp in mice, *Circ Res* 2001, 89: 930-934
74. Mehta JL: Pleiotropic effects of statins: how important are they in the prevention of vascular disease?, *Endothelium*, 2003, vol. 10, no. 1, s. 3-4
 75. Mehta JL, Saldeen TG, Rand K: Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease, *J Am Coll Cardiol*, 1998, vol. 31, no. 6, s. 1217-1225
 76. Moghadasian MH, Frohlich JJ, McManus BM: Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis, *Lab Invest*, 2001, vol. 81, no. 9, s. 1173-1183
 77. Moiseeva EP: Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res*, 2001, vol. 52, no. 3, s. 372-386
 78. Muntner P, HE, J, Astor BC, Folsom AR, 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*, 2005, vol. 16, no. 2, s. 529-538
 79. Nachtigal P, Pospisilova N, Vecerova L, Micuda S, Brackova E, Pospechova K, Semecky V: Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice, *J Atheroscler Thromb*, 2009a, 16, 265-274
 80. Nishina PM, Lowe S, Verstuyft J, Naggert JK, Kuypers FA, Paigen B: Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice, *J Lipid Res*, 1993, vol. 34, no. 8, s. 1413-1422
 81. Østerud B, Bjørklid E: Role of Monocytes in Atherogenesis, *Physiol. Rev.* 2003, 83: 1069-1112
 82. Paigen B, Morrow A, Holme PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-240
 83. Palinski W, Napoli C: Unraveling pleiotropic effects of statins on plaque rupture, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, vol. 22, no. 11, s. 1745-1750
 84. Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, et al.: Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects, *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2001, 21: 1378-1382
 85. Paulsen DF: *Histologie a buněčná biologie*; H&H Vyšehradská 2004, s.158-162, ISBN 80-7319-024-9

86. Pepine CJ, Schlaifer JD, Mancini GB, Pitt B, O'Neill BJ, Haber HE: Influence of smoking status on progression of endothelial dysfunction. TREND Investigators. Trial on reversing endothelial dysfunction, *Clin Cardiol* 1998, 21: 331-334
87. Piřha J, Roztočil K, Cířková R, et al.: Endoteliální dysfunkce a její hodnocení, *Cor Vasa* 2001, 43: 452-456
88. Regazzi M.B, Iacona I, Campana C, Gavazzi A, Vigano M, Perani G: Clinical efficacy and pharmacokinetics of HMG-CoA reductase inhibitors in heart transplant patients treated with cyclosporin A, *Transplant Proc*, 1994, vol. 26, no.5, s. 2644-2645
89. Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A a kol.: Fatty streak expansion and maturation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits, *Arteriosclerosis*, 1987, no. 7, s. 24-34
90. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N Engl J Med* 1999, 340: 115-126
91. Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J: TGF- β signaling in vascular fibrosis, *Cardiovascular Research* 2007, 74: 196-206
92. Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L, Bernabeu C: Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling, *J Cell Physiol*, 2007, vol. 210, no. 2, s. 456-468
93. Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, Lowenstein CJ: Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression, *Circ Res*, 2002, 91, 806-813
94. Schwartz SM: Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*, 1997, vol. 100, no. 11 Suppl, s. S87-89
95. Shah PK: Pathophysiology of coronary thrombosis: role of plaque rupture and plaque erosion. *Prog Cardiovasc Dis*, 2002, vol. 44, no. 5, s. 357-368
96. Shantaram V: Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 1999, vol. 21, no. 1-2, s. 69-77
97. Shih DM, Welch C, Lusic AJ: New insights into atherosclerosis from studies with mouse models, *Mol Med Today*, 1995, vol. 1, no. 8, s. 364-372
98. Silbernagel S, Florian L: *Atlas patofyziologie člověka*, Grada, Praha 2001, s.236, ISBN 80-7169-968-3
99. Sinzinger H, Wolfram R, Peskar BA: Muscular side effects of statins, *J*

Cardiovasc Pharmacol, 2002, vol. 40, no. 2, s. 163-171

100. Soriano-Guillen L, Hernandez-Garcia B, Pita J, Dominguez-Garrido N, Del Rio-Camacho G, Rovira A: High-sensitivity C-reactive protein is a good marker of cardiovascular risk in obese children and adolescents.. *Eur J Endocrinol* 2008, 159: R1-R4
101. Springer TA: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration, *Annu Rev Physiol*, 1995, vol. 57, no. s. 827-872
102. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME Jr., Schaffer SA, Schwarz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American heart association, *Circulation* 1994, 89: 2462-2478
103. Stehbens WE: The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses*, 2002, vol. 58, no. 4, s. 359-360
104. Stolba P, Dobesova Z, Husek P, Opltova H, Zicha J, Vrana A, Kunes J: The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes, *Life Sci*, 1992, vol. 51, no. 10, s. 733-740
105. Štulc T: Aterogeneze a její patogenetické mechanismy, *Kardiologické fórum* 2006, 4:14-15
106. Tonolo G, Brizzi P, Melis MG, Secchi G, Maioli M: About the pleiotropic effects of statins in human. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, vol. 18, no. 6, s. 1234
107. Vaughan CJ, Gotto AM, JR, Basson CT: The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2000, vol. 35, no. 1, s. 1-10
108. Veniant MM, Zlot CH, Walzem RL, Pierotti V, Driscoll R, Dichek D, Herz J, Young SG: Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice, *J Clin Invest*, 1998, vol. 102, no. 8, s. 1559-1568
109. Vestweber D, Blanks JE: Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 1999, vol. 79, no. 1, s. 181-213
110. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, et al.: Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adult, *JAMA* 1999, 282: 2131-2135
111. Vlček J, Fialová D: *Klinická farmacie I.*, Grada, Praha 2010, s.108-120, ISBN 978-80-247-3169-8
112. Vojáček J, Malý M a kol.: *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, Grada,

- Praha 2004, s.21-42, ISBN 80-247-0501-X
113. Vokurka M, Hugo J a kol.: *Velký lékařský slovník*, Maxdorf, Praha 2004, s.141, ISBN 80-7345-037-2
 114. Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Häring HU, Schleicher ED: Angiotensin II induces human TGF- β 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia, *Diabetologia* 2002; 45: 890-8
 115. Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J: Atherosclerotic changes in the femoral and carotid arteries in familial hypercholesterolemia. Ultrasonographic assessment of intima-media thickness and plaque occurrence. *Arterioscler Thromb*, 1993, vol. 13, no. 10, s. 1404-1411
 116. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A: The lipid and non-lipid effects of statins: *Pharmacol Ther*, 2003, vol. 99, no. 1, s. 95-112
 117. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, 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*, 1999, vol. 13, no. 6, s. 667-675
 118. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, Van Gorp PJ, Van Bilsen M, Hofker MH: Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin Chem Lab Med*, 2005, vol. 43, no. 5, s. 470-479
 119. Wu L, Fan J, Matsumoto S and Watanabe T: Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 269: 808-815
 120. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, vol. 88, no. 12, s. 5252-5256
 121. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, De Vries-Van Der Weij J, Van Der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T: Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, vol. 27, no. 8, s. 1706-1721
 122. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E, *Science*, 1992, vol. 258, no. 5081, s. 468-471