

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2007

Barbora Tlapalová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv hypolipidemické terapie na endoteliální dysfunkci
a časně aterogenní změny ve stěně cévy u
experimentálních modelů aterosklerózy I.

Hypolipidemic treatment and its effects on endothelial
dysfunction and early atherogenesis in the vessel wall in
experimental models of atherosclerosis I.

Školitel: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

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

Hradec Králové 2007

Barbora Tlapalová

Poděkování

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

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. ATEROSKLERÓZA.....	8
2.1.1. Lokalizace aterosklerózy.....	8
2.1.2. Patogeneze aterosklerózy	8
2.1.3. Vývojové stupně aterosklerózy	12
2.1.4. Teorie vzniku aterosklerózy	14
2.1.5. Rizikové faktory aterosklerózy	15
2.2. FUNKCE ENDOTELU ZA FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK.....	19
2.3. BUNĚČNÉ ADHEZIVNÍ MOLEKULY (CAM).....	22
2.3.1. Superrodina imunoglobulinů.....	22
2.3.2. Fyziologická funkce CAM.....	23
2.3.3. Regulace exprese endoteliálních CAM.....	24
2.4. ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE	25
2.5. ZVÍŘECÍ MODELY POUŽÍVANÉ KE STUDIU ATEROSKLERÓZY	26
2.6. STATINY V LÉČBĚ HYPERCHOLESTEROLÉMIE.....	29
2.6.1. Mechanismus účinku.....	29
2.6.2. Indikace statinů	30
2.6.3. Nelipidové (pleiotropní) účinky statinů	30
3. CÍL PRÁCE	33
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA	34
4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	35
4.3. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ	35
4.4. IMUNOHISTOCHEMIE	36
4.5. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ	37
4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	38
5. VÝSLEDKY	39
5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	39
5.2. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ	42
5.3. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ VCAM-1 V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU	44
5.4. STEREOLOGICKÁ ANALÝZA HISTOLOGICKÉHO BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ A IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ VCAM-1	45
6. ZÁVĚR.....	50
7. ABSTRAKT	51
8. ABSTRACT	53
9. LITERATURA.....	55

Seznam použitých zkratk

ACE	angiotenzin konvertující enzym
ACH	acetylcholin
ADP	adenosindifosfát
apoE	apolipoprotein E
bFGF	basic fibroblast growth factor, základní fibroblastový růstový faktor
CAM	cell adhesion molecules, buněčné adhezivní molekuly
CMP	cévní mozková příhoda
CMV	cytomegalovirus
CRP	C – reaktivní protein
EBV	virus Epsteina a Barrové
EDGF	endothelium-derived growth factor, růstový faktor produkovaný endotelem
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
eNOS	syntáza NO
Hb	hemoglobin
HDL	high density lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě
HMG-CoA	3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl koenzym A
ICAM-1	intercellular cell adhesion molekule-1, adhezní molekula
IDL	intermediate density lipoproteins, lipoproteiny o střední hustotě
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor
ICHS	ischemická choroba srdeční
ICMP	ischemická cévní mozková příhoda
IL-6, 8	interleukin 6, 8
LDL	low density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě
LPS	lipopolysacharidy
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesive molekule-1, adhezní molekula
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor, růstový hormon pro makrofágy
MDGF	monocyte-derived growth factor, růstový faktor monocytů
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
OxLDL	oxidované LDL částice

PAF	faktor agregace destiček
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PDGF	platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1, adhezní molekula
PGI ₂	prostaglandin I ₂
TAG	triacylglyceroly
TGF β	transforming growth factor β, transformující růstový faktorβ
TIMP-1	tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1
TNF α	tumor necrosis factor α, tkáňový nekrotizující faktor α
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1, adhezní molekula
VLDL	very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě

1. ÚVOD

Ateroskleróza je onemocnění tepen charakterizované ukládáním tukových částic do cévní stěny. Výsledkem je poškození cévní stěny, dochází k tuhnutí cévní stěny s postupným zužováním jejího průsvitu. Může dojít k jejímu úplnému uzávěru s následnou ischemií příslušné části cévního řečiště. Ateroskleróza se vyvíjí pomalu a nenápadně, jde o dlouhodobý proces.

Velký rozvoj této nemoci je způsoben současným životním stylem většiny obyvatelstva. Špatné stravovací návyky, nedostatek pohybu, kouření, obezita, psychický stres a některá další onemocnění jako hypertenze, cukrovka vedou ke zhoršování zdravotního stavu a patří mezi rizikové faktory vzniku tohoto onemocnění.

Současná data ze Světové zdravotnické organizace ukazují, že kardiovaskulární onemocnění jsou zodpovědná asi za 30 % celkové mortality na celém světě. Z toho je 42 % způsobeno ischemickou chorobou srdeční (ICHS) a 32 % onemocněními mozkových cév. V průmyslově vyspělých zemích jsou kardiovaskulární choroby hlavní příčinou úmrtí dospělé populace [1].

V České republice je úmrtnost na tato onemocnění jedna z nejvyšších v Evropě i když v posledních letech začala konečně klesat. Nejčastější příčinou kardiovaskulární mortality je ICHS způsobena aterosklerózou.

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

V této diplomové práci jsme se zabývali ověřením, zda atorvastatin vykazuje u apoE/LDL-receptor deficientních myši podobné účinky jako je tomu v humánní medicíně. Dále byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi, hladiny zánětlivých markerů v krvi a také exprese zánětlivých markerů v aterosklerotických plátech a velikost aterosklerotických lézí. K hodnocení morfologických nálezů byly použity stereologické metody.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění charakterizované endoteliální dysfunkcí a subendotelovou kumulací aterogenních lipoproteinů bohatých na cholesterol. Zánětlivého procesu se účastní již zmíněné modifikované lipoproteiny, makrofágy, T-lymfocyty, endotelové buňky a buňky hladkého svalstva. Výsledkem zánětu je vznik komplexních lézí v cévní stěně. Tyto léze, označované jako plaky, jsou příčinou zužujícího se průsvitu cév a mohou vést až k úplnému ucpání cévy. Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění, které se vyvíjí pomalu v závislosti na rizikových faktorech. Čím více je rizikových faktorů, tím je progresse ale i klinická manifestace nemoci rychlejší [3].

2.1.1. Lokalizace aterosklerózy

Při ateroskleróze je průtok krve ovlivněn zejména u cév koronárního řečiště, mozkových cév a cév dolních končetin. Postiženy jsou nejvíce velké a střední artérie a to především v určitých predispozičních (predilekčních) místech. K těm patří koronární artérie (jejich hlavní kmeney blízko větvení), femorální, tibiální a popliteální artérie v místech větvení. Dalšími predilekčními místy jsou oblouk aorty a odstupy velkých krčních artérií, bifurkace břišní aorty, interní a externí karotidy a cerebrální artérie [4]. Výskyt aterosklerózy v artériích je podmíněn rozdílnými hemodynamickými poměry vzhledem k vénám a odlišnou citlivostí endotelu.

2.1.2. Patogeneze aterosklerózy

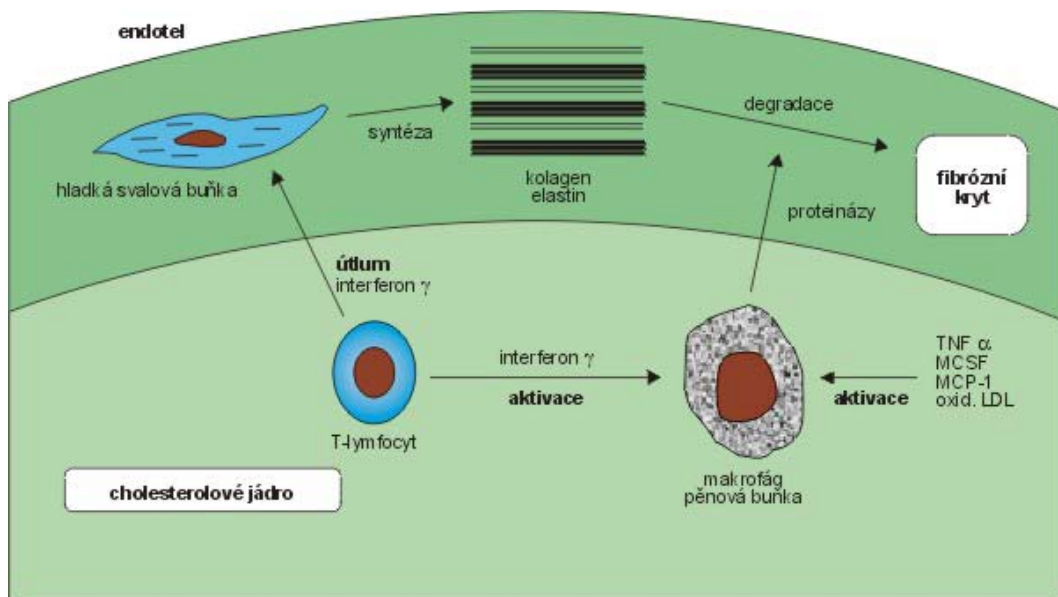
Podkladem pro vznik aterosklerózy je již zmíněná dysfunkce cévního endotelu. Nejprve dochází k *aktivaci endoteliálních buněk* (vlivem kouření, LDL, hemodynamického stresu atd.). Takto aktivované buňky produkují růstové faktory (PDGF, bFGF, MCP-1) a cytokiny (IL-1, TNF- α), na povrchu endotelu je zvýšena exprese buněčných adhezních molekul (CAM) mezi které patří např. VCAM-1 a ICAM-1 [5]. Díky změně permeability a vyšší expresi CAM, pronikají LDL částice do intimy. Následuje jejich oxidace (prostupem přes endotel, stykem s monocyty, makrofágy, hladkosvalovými buňkami a T-lymfocyty) a další poškozování endotelu.

Cytokiny přitahují do místa léze monocyty a T-lymfocyty z krevní cirkulace, dochází k jejich prostupu do intimy a jejich aktivaci. Monocyty se v intimě přeměňují na makrofágy (působením EDGF, M-CSF). OxLDL jsou vychytávány makrofágy vazbou na receptory pro OxLDL nebo tzv. scavengerové receptory. Příjem OxLDL pomocí scavengerových receptorů není zpětnovazebně regulován a díky zvýšené kumulaci cholesterolu vznikají pěnové buňky. Pěnové buňky mohou v menší míře vznikat i z buněk hladkých svalů bohatých na lipidy. Nahromaděním pěnových buněk se vytvářejí *tukové proužky* (fatty streaks). Jsou makroskopicky viditelné a mají definovanou histologickou strukturu. Vznikají v místech se zvýšeným obsahem lipoproteinů v intimě díky jejich zvýšené vazbě na makromolekuly extracelulární matrix. Toto stádium není sice klinicky významné, ale může se dál vyvíjet ve fibrózní plak [6].

Makrofágy také produkují růstové faktory (PDGF, MCP-1) a cytokiny (IL-1, TNF- α), které zvyšují chemotaxi a kumulaci dalších makrofágů a T-lymfocytů. Dále produkují společně s endotelem PDGF (destičkový růstový faktor), MDGF (monocytový růstový faktor) a zánětlivé mediátory (IL-8). Tyto látky způsobují změnu fenotypu hladkých svalových buněk. Fenotyp kontraktilní se mění na fenotyp sekreční. Kontraktilní fenotyp udržuje cévní tonus a podílí se na reparaci při poškozeních. Fenotyp sekreční produkuje růstové faktory, cytokiny, elastin a kolagen. Dochází k proliferaci a migraci hladkosvalových elementů do intimy. Cytokiny přitahují další hladké svalové buňky, které syntetizují kolagenní matrix a vytváří tzv. fibrózní čepičku. Makrofágy dále pohlcují lipoproteinové částice (ve zvýšené míře volný cholesterol) a dochází k jejich kumulaci zejména ve střední části plátu. Volný cholesterol způsobuje nekrózu a apoptózu makrofágů. Výsledkem těchto procesů je vznik ateromového plátu [7].

Fibrózní ateromový plát je pevná světlešedivá vyvýšenina v lumen cévy. Můžeme na něm rozlišit fibrózní čepičku a protrombogenní jádro. Nejsvrchnější vrstvu čepičky tvoří endotel, pod ním jsou proliferované hladkosvalové buňky a zánětlivé buňky T-lymfocyty, makrofágy, pěnové buňky a extracelulární matrix [8]. Jádro plaku je složeno z buněčné drtě extracelulárních lipidů s krystalky cholesterolu a pěnových buněk.

Obr. 1 Zjednodušené schéma tvorby a degradace fibrózního krytu aterosklerotického plátu



Pokud se plát vyklenuje do cévního lumen, může to mít hemodynamické důsledky pro průtok krve za stenózou. Omezení průtoku je dáno velikostí stenózy a spazmy cév. Takový plát se se manifestuje ischemickými příznaky (stabilní anginou pectoris..) [9].

V plaku nebo na jeho okraji může dojít k vytvoření fisury, která bývá zdrojem ruptury s následným vznikem trombu. K disrupci plátu obvykle dochází v místě aktivního zánětu, kde jsou nahromaděny makrofágy a T-lymfocyty. Ruptura aterosklerotického plátu je způsobena především mechanickými silami působícími na plát a sníženou mechanickou odolností plátu. Na jejím snížení se podílejí makrofágy produkcí proteolytických enzymů metaloproteináz, které ztenčují fibrózní čepičku a aktivované T-lymfocyty, které snižují produkci kolagenu (pomocí interferonu C) [9].

Trombus vzniká u plátu, který má slabý fibrózní kryt (čepičku). Největší protrombogenní vlastnosti má lipidové jádro (zřejmě díky vysokému obsahu tkáňového faktoru). Dochází k obnažení subendoteliálních prostor, adhezi trombocytů a tím ke spuštění koagulační kaskády. Trombus může ještě více snížit průtok krve cévou, nebo může dojít k jeho odtržení a embolizaci. Ruptura plátu

s nasedající trombózou se klinicky manifestuje jako infarkt myokardu nebo nestabilní angina pectoris.

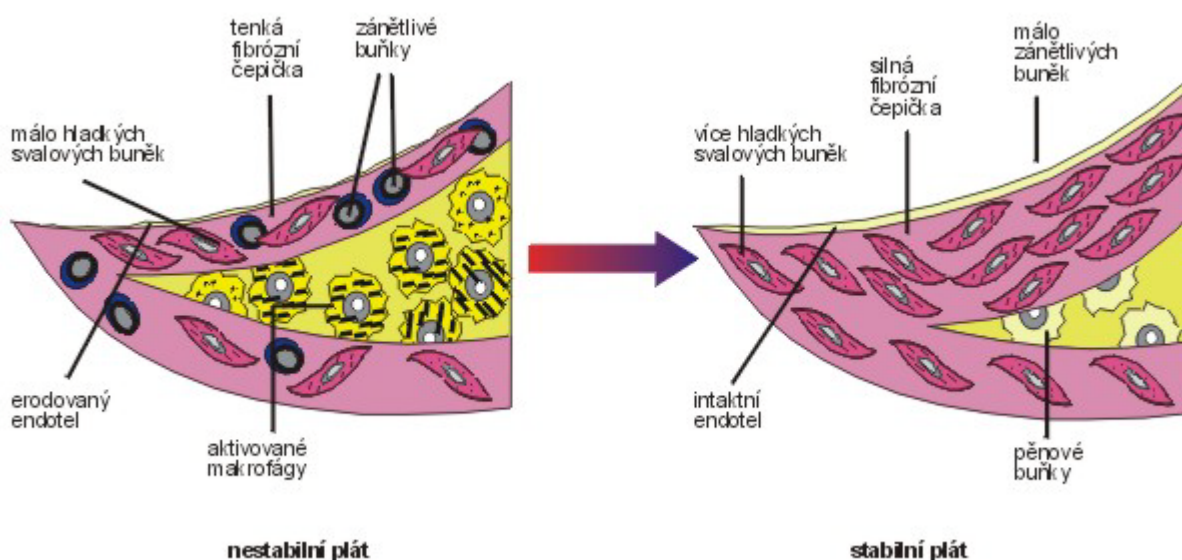
Plát náchylný k ruptuře se označuje jako plát vulnerabilní, nebo nestabilní. O stabilitě plátu rozhoduje velikost a konzistence ateromatózního jádra, hrubost a integrita fibrózní čepičky, zánětlivé změny a snížení odolnosti čepičky [10].

Vulnerabilní plát bývá měkký s velkým polotekutým lipidovým jádrem. Jádro je složeno převážně z esterů cholesterolu, pěnových buněk a T-lymfocytů. Obsahuje velké množství zánětlivých buněk s malým množstvím kolagenu a hladkých svalových buněk. Tyto pláty bývají „mladé“ a nezjistitelné na angiografickém vyšetření (viz Obr. 2) [11].

Stabilní plát na rozdíl od nestabilního obsahuje velké množství hladkých svalových buněk a kolagenu. Skládá se z lipidového jádra a malého množství zánětlivých buněk. Fibrózní čepička je silná a neporušená. Metaloproteinázy produkované makrofágy mohou způsobit její ztenčení. Tyto pláty jsou „starší“, hemodynamicky významné, ale po řadu let stálé (viz Obr. 2) [12].

U pokročilých stádií aterosklerózy dochází k ukládání pevných sloučenin vápníku do okolí nekrotického jádra. Je zde určitá závislost mezi množstvím vápníku a závažností koronární aterosklerózy. Studie ukázaly, že kalcifikace zvyšuje riziko koronárních příhod.

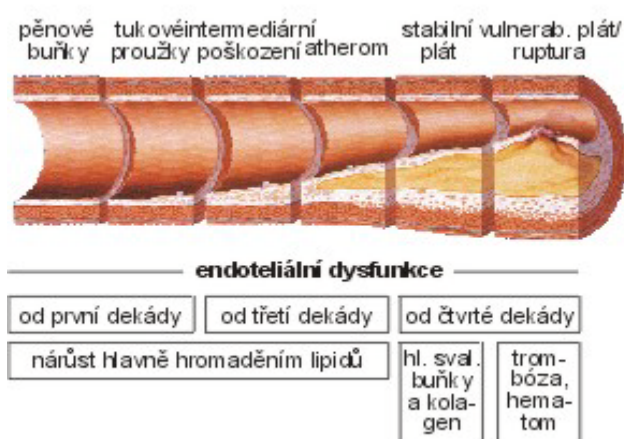
Obr. 2 Schéma stabilního a nestabilního aterosklerotického plátu (Libby, 1995; materiál "IMPPACT", BMS ČR)



2.1.3. Vývojové stupně aterosklerózy

Z hlediska morfologického můžeme rozlišit 6 stupňů rozvoje aterosklerotické léze podle jejich závažnosti (dle American Heart Association) (viz Obr. 3) [13]

Obr. 3 Vývoj aterosklerózy (Stary 1995; materiál "IMPPACT", BMS ČR)



Typ I – izolované pěnové buňky

V intimě jsou přítomny skupiny makrofágů obsahujících v cytoplazmě kapénky lipidů. Toto stádium můžeme nalézt v koronárních artériích již v dětském věku.

Typ II – tukové proužky (fatty streaks)

Jedná se o vrstvu makrofágů změněných v pěnové buňky. Hladké svalové buňky v intimě také mohou obsahovat kapénky lipidů, ale ty se vyskytují především v makrofázích. Mohou se nacházet i ojedinělé T-lymfocyty. Tukové proužky se nalézají zejména v oblastech bifurkací a odstupů artérií. Jsou dvojího typu: Ila ty většinou progredují, obsahují více hladkých svalových buněk, makrofágů a pěnových buněk s kumulací lipoproteinů. Typ IIb progreduje buď velmi pomalu (u osob se zvýšeným obsahem lipoproteinů v krvi) nebo vůbec.

Typ III - přechodný

Pod proužky makrofágů a pěnových buněk se nachází separovaný pool extracelulárně uložených lipidů. Lipidy obsahují více volného cholesterolu, mastných kyselin, triacylglycerolů než typ II.

Typ IV – aterom

Rozvinuté stádium III s hustým nahromaděním extracelulárních lipidů. Rozpadem pěnových buněk vzniká tzv. lipidové jádro, které obsahuje krystaly cholesterolu a depozita kalcia. Mezi endotelem a lipidovým jádrem jsou v intimě makrofágy a hladké svalové buňky s kapénkami tuků. Tento typ se nachází u lidí ve věku kolem 30 let. Většinou neovlivňuje průtok krve a je tedy klinicky němý.

Typ V

Léze obsahují vystupující pojivovou tkáň, mají zvýšený obsah kolagenu a hladkých svalových buněk. Na okrajích lipidového jádra, a někdy i v nově vytvořené pojivové tkáni jsou kapiláry. Tento typ se dále dělí na další podtypy. Podtyp Va má měkké tukové jádro a slabou fibrózní čepičku, u které může dojít k ruptuře. Podtyp Vb má naopak malé tukové jádro, fibrózní čepička je odolná a méně náchylná k prasknutí.

Typ VI – komplexní poškození

Jedná se o lézi, která je modifikovaná disrupcí povrchu, hematodem, hemorragií nebo trombózou, a která může vést k okluzi. Při ruptuře aterosklerotické léze je aktivována koagulační kaskáda, dochází k agregaci trombocytů s tvorbou trombu. Ten se může inkorporovat do léze, nebo okludovat artérii a způsobit ischemii. Trombóza, nasedající na aterosklerotickou lézi, je příčinou akutní koronární symptomatologie infarktu myokardu, nestabilní anginy pectoris nebo náhlé smrti.

2.1.4. Teorie vzniku aterosklerózy

Ateroskleróza je velice složitý zánětlivý proces a mechanismy jejího vzniku nejsou zatím přesně známy. Snahu o vysvětlení přináší několik teorií [14]:

Lipidová teorie

Předpokladem je, že primární příčinou aterosklerózy je kumulace lipidů (především LDL, ale i IDL, VLDL). Zvýšený průnik do endotelu je dán jejich vysokou koncentrací v krvi. V endotelu dochází k jejich vychytávání makrofágy a buňkami hladké svaloviny a přeměně na pěnové buňky, které se stávají ložiskem aterosklerotického procesu [14].

Teorie endoteliálního poškození

Podle této teorie je primární příčinou rozvoje aterosklerózy poškození cévního endotelu. Na něj adherují trombocyty, které uvolňují řadu faktorů (např. PDGF) a stimulují proliferaci hladkých svalových buněk a syntézu extracelulární matrix. Chemoatraktanty přitahují monocyty, ty se mění v makrofágy a spolu s hladkosvalovými buňkami samy produkují PDGF. Ukládání lipidů je podle této teorie záležitostí sekundární [15].

Sjednocená teorie aterosklerózy

Vychází z předpokladu, že základním krokem v rozvoji aterosklerózy je endoteliální dysfunkce. Postižení endotelu je lokalizované, není porušena jeho integrita, ale jsou poškozeny některé jeho funkce. Endoteliální buňky mají vyšší obrát a je zvýšena permeabilita. Vzniká nerovnováha mezi vasoaktivními mechanismy a hemokoagulačními působky. Výsledkem je převaha vasokonstrikčních a protrombotických pochodů, dochází k aktivaci zánětlivých a proliferačních dějů. Je zvýšena adherence a agregace trombocytů, uvolňování růstových a proliferačních faktorů. Chemoatraktanty přitahují další monocyty, které se mění na makrofágy. Lipoproteiny pronikají poškozeným endotelem, infiltrují cévní stěnu, jsou oxidovány a aktivují další makrofágy.

Infekční teorie

Tato teorie předpokládá, že základním etiologickým agens, vyvolávajícím endoteliální dysfunkci a zánětlivou reakci, jsou chronické bakteriální a virové infekce. Ty vedou k aktivaci imunitního systému, zvýšené tvorbě imunitních

komplexů způsobujících dysfunkci endotelu a zánětlivou reakci. Po poškození následuje akumulace lipidů, makrofágů, uvolňování proliferčních a chemotaktických působků a progresse aterosklerózy. Za možná infekční agens jsou v dnešní době považována Chlamydia pneumoniae, Cytomegalovirus, Helicobacter pylori, herpetické viry a další [16].

2.1.5. Rizikové faktory aterosklerózy

Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění. Rizikové faktory se podílí nejen na vzniku, ale i na její [17]. Poškozují cévní endotel a způsobují jeho dysfunkci. Ty hlavní můžeme rozdělit na tzv. modifikovatelné a nemodifikovatelné. Jejich přehled je v tabulce.

Modifikovatelné rizikové faktory	Nemodifikovatelné rizikové faktory
Hypercholesterolemie	věk > 45 let muži, > 55 let ženy
Kouření	rodinná anamnéza (předčasná ICHS)
Hypertenze	mužské pohlaví
diabetes mellitus	
fyzická inaktivita	
Obezita	

K dalším neméně důležitým rizikovým faktorům patří *metabolický syndrom*, *zvýšená hladina triacylglycerolů*, *snížená hladina HDL cholesterolu*, *zvýšená hladina C-reaktivního proteinu*, *psychický stres* a *některá infekční agens*.

Hypercholesterolémie

Pro rozvoj aterosklerózy má hlavní úlohu vysoká hladina tzv. sérového cholesterolu (VLDL a LDL), který můžeme nalézt v lipoproteinových částicích [18]. Úlohou sérového cholesterolu je transportovat lipidy z potravy, nebo endogenně vytvořené, do periferních tkání. Existuje několik typů lipoproteinů. Chylomikrony jsou důležité pro transport lipidů z diety, zatímco VLDL, IDL, LDL a HDL jsou zásadní pro transport endogenních lipidů. VLDL jsou bohaté na triacylglyceroly, po jejich rozpadu vznikají LDL částice, které představují největší podíl sérového cholesterolu a z tohoto důvodu jsou rozhodující pro transport lipidů k periferním tkáním (normální hladina v krvi by měla být $< 2,6$ mmol/l). Hladinu LDL určuje rychlost vazby na LDL receptory v játrech. Vysoké hladiny LDL cholesterolu negativně ovlivňují endoteliální dysfunkci (zvyšují permeabilitu), způsobují vyšší migraci monocytů do subendoteliálních prostor, aktivaci endoteliálních buněk a následnou vyšší expresi adhezivních molekul. Na rozdíl od LDL, HDL cholesterol brání rozvoji endoteliální dysfunkce a aterosklerózy. HDL částice 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. Hladina HDL by měla být nad 1,0 mmol/l.

Hypertenze

Dalším velice důležitým rizikovým faktorem je vysoký krevní tlak. Způsobuje mechanické poškození endotelu. Zvýšení systolického krevního tlaku je významnější, než zvýšení diastolického krevního tlaku. Hodnoty krevního tlaku nad 140/90 mm Hg (u diabetiků 135/85 mmHg) vedou ke zvýšené koncentraci angiotenzinu II. Angiotenzin II ovlivňuje aktivitu endotelových buněk, hladkosvalových buněk a makrofágů. V endotelových buňkách stimuluje tvorbu NF- β K (faktor spouštějící transkripci zánětlivých genů), dochází ke zvýšené adhezi leukocytů, expresi adhezivních molekul a tvorbě superoxidu (reaguje s NO a způsobuje dysfunkci endotelu). Dále angiotenzin působí na růst a kontrakci cévních hladkosvalových 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 CMP, ICHS a srdečního selhávání [19].

Diabetes mellitus

Hyperglykémie způsobuje vyšší 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. Zvyšuje se produkce superoxidového radikálu, který inaktivuje NO. U diabetiků je tedy snížena tvorba NO, ale naopak zvýšena produkce vasokonstrikčních prostaglandinů a narušena endotel-dependentní vasodilatace. Dochází ke snížené syntéze prostacyklinu, vyšší tvorbě PAI-1 a vyšší expresi adhezivních molekul. Ateroskleróza u pacientů s kolísavými a vysokými hladinami krevního cukru, tedy špatně kompenzovanou cukrovkou, probíhá rychleji s častějšími zdravotními následky [20].

Mužské pohlaví

Hlavní příčinou většího výskytu aterosklerózy u mužů je rozdílné hormonální pozadí. Ženy jsou v premenopauzálním období chráněny estrogény. Tyto ženské hormony mají vliv na příznivější složení lipidového spektra (nižší hladiny LDL a naopak vyšší hladiny HDL cholesterolu), dále ovlivňují inzulínovou rezistenci, hladinu cytokinů a funkci endotelu. V postmenopauzálním období dochází ke zvýšenému výskytu kardiovaskulárních rizikových faktorů [17].

Obezita

Obezita je dlouho známý rizikový faktor aterosklerózy. V současné době přibývá důkazů, že není tak důležitá obezita jako taková, ale spíše její typ. Zvýšené riziko aterosklerózy představuje intraabdominální kumulace tuku. Dobrým parametrem určujícím rozsah tohoto druhu obezity je obvod pasu (u mužů > 102 cm a u žen > 88 cm). Intraabdominální tukové buňky nejsou jen zásobárnou tuku, ale produkují prozánětlivé a prokoagulační faktory (TNF α , CRP, PAI-1) [21].

Kouření

Kouření poškozuje endotel a způsobuje endoteliální dysfunkci, snižuje HDL cholesterol, způsobuje hemodynamický stres, zvyšuje koagulační pohotovost, 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 [22].

C-reaktivní protein

Jedná se o velmi nespecifický, ale velmi citlivý marker zánětlivé reakce. Po stimulaci mediátory zánětu (IL-6, IL-8, TNF- α) je produkován nejen hepatocyty, ale také endoteliálními buňkami, hladkosvalovými buňkami a makrofágy. Spolupodílí se na rozvoji aterosklerózy díky poškození fyziologické funkce endotelu, posílení prozánětlivého a prokoagulačního stavu [23].

Infekce

Předpokládá se, že infekční agens mohou spustit, nebo se podílet na progresi aterosklerózy. Ovlivňují lipidové spektrum (zvyšují VLDL, TAG, snižují HDL), indukují tvorbu volných radikálů v cévní stěně, aktivují prozánětlivé a prokoagulační faktory, zvyšují expresi CAM a hladinu CRP. V aterosklerotických lézích byla nalezena řada patogenů např. Chlamydia pneumoniae, P. gingivalis, CMV (cytomegalovirus), EBV (virus Epsteinova a Barrova) a Helicobacter pylori [16].

2.2. FUNKCE ENDOTELU ZA FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK

Endotel je metabolicky aktivní orgán s celou řadou fyziologických funkcí. Je největším autokrinním, parakrinním a endokrinním orgánem lidského organismu. Endotel je tvořen jednou vrstvou specializovaných buněk podlouhlého tvaru s řadou regulačních funkcí. Celkový povrch endotelu představuje plochu asi 500-1000m² a jeho hmotnost je 1,5-3 kg. [24].

Mezi základní funkce endotelu patří : Regulace cévního tonu

Ovlivnění struktury cévní stěny

Antitrombotické a fibrinolytické působení

Interakce s buňkami v cirkulaci

Regulace permeability cévní stěny

1. Regulace cévního tonu

Endotel produkuje látky s vasodilatačními a vasokonstrikčními vlastnostmi a tím udržuje napětí cévní stěny. Mezi nejdůležitější *vasodilatační látky* patří *oxid dusnatý NO*. Jeho tvorbu zprostředkovává NO-syntáza, která je aktivována smykovým napětím krevního proudu (shear-stress), hypoxií a celou řadou působků (ACH, vasopresin, ADP). NO má obrovský vasodilatační účinek (aktivuje guanylátcyklázu svalových buněk) [25]. Inhibuje také expresi adhezivních molekul, adhezi a agregaci trombocytů a apoptózu endoteliálních buněk. Brání dále migraci myocytů z médiu, jejich proliferaci a transformaci v sekreční buňky. Působí také jako antioxidant, reaguje se superoxidovým radikálem a s organickými hydroperoxy a tím chrání lipidy (LDL) před oxidací. Dalšími endotelem produkoványi vasodilatačními látkami jsou prostacyklin, bradykinin, typ C-natriuretického peptidu a EDHF. *Prostacyklin* (PGI₂) je produkován za stejných podmínek jako NO, svým účinkem zesiluje jeho působení a brání agregaci trombocytů. *EDHF* (endothelium-derived hyperpolarizing faktor) dilatuje krevní řečiště [15].

Vasokonstrikčními látkami jsou endotelin-1, angiotenzin II, acetylcholin, tromboxan A₂. *Endotelin-1* se uvolňuje při stimulaci některými aterogenními proteiny (trombin) nebo lipidy (oxidovaný LDL). Endotelin aktivuje kalciové kanálky hladkosvalových buněk a stimuluje jejich kontraktlní myofibrily. Jeho

vasokonstrikční účinek je mírněn současnou stimulací produkce NO a prostacyklinu. Teprve při poškození endotelu se plně projeví vasokonstrikce (díky snížené produkci NO). Endotelin stimuluje proliferaci myocytů v cévní stěně. Na povrchu endotelu se nachází také ACE (angiotenzin konvertující enzym), který ovlivňuje hladiny angiotenzinu II a bradykininu. V poškozeném endotelu je převaha vasokonstrikčních látek nad vasodilatačními a endotel není schopen vasodilatace [24].

2. Ovlivnění struktury cévní stěny

Endotel ovlivňuje strukturu cévní stěny produkcí látek se stimulačními nebo inhibičními účinky na růst. Jestliže se zvýší mechanické napětí cévní stěny, dojde k produkci růstových faktorů. Mezi růstové faktory patří např. PDGF (růstový faktor tvořený destičkami), indukuje růst a dělení buněk pojivové tkáně (fibroblasty, hladké svalové buňky). IGF-1 (inzulínu podobný růstový faktor), interleukin-1, endotelin-1. Tyto mitogeny stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendoteliálního prostoru z medie, která je následována hyperplázií intimy a hypertrofií cévní stěny. Naopak prostacyklin, TGF- β nebo NO inhibují proliferaci buněk cévní stěny a zabraňují hypertrofii cévní stěny [26]. Makrofágy produkují také PDGF, ale i IL- α a TNF- α , které stimulují proliferaci hladkých svalových buněk.

3. Antitrombotické a fibrinolytické působení

Na funkční endotel neadherují trombocyty ani leukocyty. Dokonale nesmáčivý povrch zajišťuje negativní elektrostatický náboj, sekrece NO a prostacyklinu. Intaktní endotel udržuje rovnováhu mezi faktory, které regulují trombolytické a fibrinolytické procesy.

Antikoagulační aktivitou se rozumí vytvoření bariéry mezi cirkulujícími koagulačními faktory a tkáňovým faktorem a produkcí antikoagulačně působícího heparansulfátu a trombomodulinu. Trombomodulin se váže na trombin. Touto vazbou ztrácí trombin schopnost štěpit fibrinogen. Komplex trombin-trombomodulin aktivuje protein C, ten spolu s proteinem S inaktivuje faktory Va a VIIa a dochází k inhibici koagulace. Na fibrinolýzu působí endotel prostřednictvím produkce t-PA (tkáňový aktivátor plazminogenu) a inhibitorů plazminogenových aktivátorů (PAI-1,2). t-PA přeměňuje plasminogen na plasmin, který je schopen rozštěpit molekulu

fibrinu. PAI-1,2 inhibují funkci t-PA. Na procesu hemokoagulace a hemostázy se také podílí von Willebrandův faktor, který aktivuje adhezi trombocytů. Dále se endotel podílí na produkci koagulačních faktorů (faktory V, VII, tkáňový faktor) a protrombogenního faktoru [27].

4. Interakce s buňkami v krevním oběhu

Endotel na svém povrchu exprimuje adhezivní molekuly. Tyto molekuly zajišťují interakce endoteliálních buněk s buňkami v krevním oběhu. Za fyziologických podmínek je exprese těchto molekul malá. Po aktivaci dochází ke zvýšení exprese adhezivních molekul na povrchu endotelu, ale také na povrchu leukocytů (E-selektinu, integrinů, imunoglobulinových adhezivních molekul). Výsledkem zvýšené exprese je usnadnění adheze a průniku leukocytů do cévní stěny [28].

5. Regulace permeability

Za fyziologických podmínek vytváří endotel bariéru, která brání průniku škodlivých látek do cévní stěny. Kontroluje prostup pro buněčné i nebuněčné komponenty. Nebuněčné komponenty jsou transportovány paracelulárními nebo transcelulárními mechanismy. Prostup krevních elementů je realizován pomocí vasoadhezivních molekul exprimovaných na povrchu endotelu (př. E-selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) [29]. Při poškození endotelu nebo jeho aktivaci (např. zánětlivými působky, nebo ischemií), dochází ke zvýšení propustnosti pro aterogenní lipidy a monocyty. Tyto lipidy a monocyty se mohou akumulovat v endotelu a následně vést k rozvinutí aterosklerózy.

2.3. BUNĚČNÉ ADHEZIVNÍ MOLEKULY (CAM)

Adhezivní molekuly jsou látky proteinového charakteru, nacházejí se na povrchu všech buněk a zajišťují přímé kontakty mezi buňkami. Přenášejí do buňky signály, na které buňky reagují (na rozdíl od cytokinů a hormonů, které působí na určitou vzdálenost). Jsou exprimovány stále nebo až po aktivaci. Uplatňují se při fyziologických procesech (buněčná a tkáňová diferenciaci, embryogeneze, hematopoéza, regenerace), ale účastní se i při patologických procesech (kancerogeneze, metastázování nádorových buněk [30]).

Podle struktury rozlišujeme několik podtypů: integriny

selektiny a jiné lektiny

kadheriny

adhezivní molekuly Ig rodiny a jiné

2.3.1. Superrodina imunoglobulinů

Zahrnuje širokou skupinu molekul s opakujícími se Ig doménami. Pro cévní nemoci jsou důležité adhezivní molekuly ICAM-1, ICAM-2 (intercellular cell adhesion molekules-1 a 2), VCAM-1 (vascular cell adhesion molekule-1), PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molekule-1) a MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesive molekule-1) [31].

ICAM-1 je exprimována na mnoha typech buněk, ale u endoteliálních buněk je její exprese regulována [32]. V normálním séru můžeme detekovat rozpustné isoformy ICAM-1. Při onemocnění dochází k podstatnému zvýšení jejich hladiny [33]. ICAM-2 je zkrácená verze ICAM-1 exprimovaná také na endoteliálních buňkách, ale při aktivaci endotelu nedochází ke zvýšení její hladiny

Exprese *VCAM-1* je u klidových endotelových buněk zanedbatelná, ale může být významně zvýšena po setkání s cytokiny. VCAM-1 se podílí na adhezi leukocytů a monocytů k aktivovanému endotelu [34].

PECAM-1 je exprimována zejména na trombocytech, leukocytech a endotelových buňkách. Zprostředkovává homofilní, ale i heterofilní interakce [35]. Její exprese zůstává i po stimulaci cytokiny stejná.

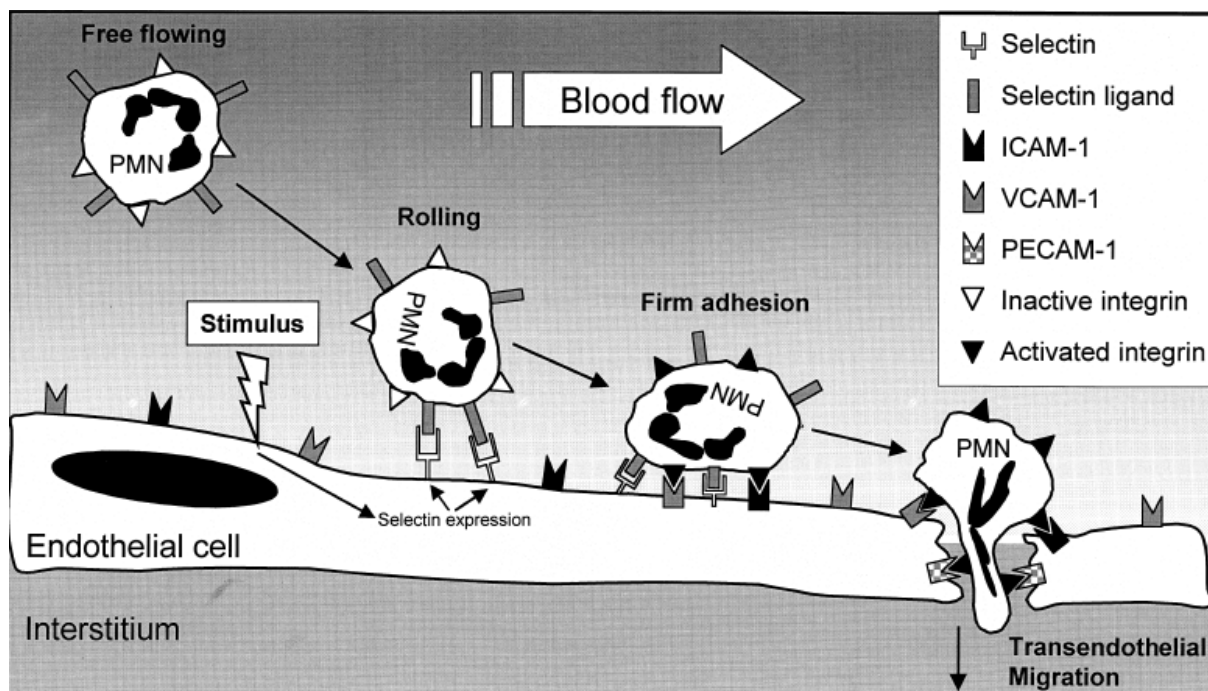
MAdCAM-1 je exprimována ve větší míře na endotelu žilek Peyerových plátů, lymfatických uzlinách embryí, v menší míře na intestinální lamina propria a velmi málo v dutině sleziny [30].

2.3.2. Fyziologická funkce CAM

V cévním systému mohou všechny jeho části (artérie, kapiláry i vény) exprimovat buněčné adhezivní molekuly. Primárním ložiskem zánětlivé reakce jsou postkapilární venuly, díky nejvyšší hustotě exprese těchto molekul. Výzkumy chování leukocytů ve venulách in vivo vedly k vytvoření modelu interakcí mezi leukocyty a endoteliálními buňkami. Model popisuje migraci leukocytů přes cévní stěnu ve třech následných a koordinovaných krocích. Nejprve dochází k rolování, poté k pevné adhezi leukocytů s endoteliálními buňkami a jejich transendoteliální migraci (viz Obr. 4). Aby mohly leukocyty vytvořit pevnou vazbu s buňkami endotelu, musí se přemístit z centrálního proudu směrem k cévní stěně. Selektiny a jejich ligandy zprostředkovávají slabé adhezivní interakce projevující se při rolování [36]. I další buněčné adhezivní molekuly (VCAM-1, MAdCAM-1...) se mohou podílet na krátkodobé vazbě leukocytů, ale jejich působení je slabé. Adherované leukocyty jsou vystaveny slabé koncentraci chemoatraktantů, která způsobuje jejich aktivaci a vyvolá na integrinu a protilátkách závislou adhezi leukocytů. Současně probíhá down-regulace L-selektinu.

Aktivace leukocytů je spojená s rostoucí aktivitou integrinů, která může být vyvolána chemokiny, bakteriálními peptidy, PAF (faktor aktivující destičky) a leukotrieny (B_4). Transendoteliální migrace leukocytů začíná pohybem adherovaných leukocytů směrem ke spojům endoteliálních buněk. Na předním konci se neustále vytváří nové vazby mezi leukocyty a CAM, zatímco na zadním konci jsou tyto vazby redukovány [37].

Obr. 4 Schéma migrace leukocytů cévní stěnou



2.3.3. Regulace exprese endoteliálních CAM

Postup leukocytů do místa zánětu je určován především časovým průběhem a velikostí endoteliální exprese CAM. Nejdříve dochází k aktivaci L-selektinu na leukocytech a rychlému pohybu tzv. přetvarovaného P-selektinu na povrch endoteliálních buněk. Výsledkem těchto dějů je rolování leukocytů po povrchu endotelu. Aktivací rolovaných leukocytů nebo expresí β_2 integrinu dochází k vazbě leukocytů na exprimované ICAM-1 na povrchu endotelu. Pro infiltraci velkého počtu leukocytů do zanícené tkáně je důležitá vysoká hustota CAM na endotelu. Počet exprimovaných CAM závisí na jejich syntéze de novo. Na transkripci závislá syntéza endoteliálních CAM (ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1, E-selektin, P-selektin) je vyvolávána různými bakteriálními toxiny, cytokiny a oxidanty. Největší exprese CAM nastává za 3 až 6 hodin po expozici zánětlivým stimulem.

Endoteliální exprese je regulována dvěma transkripčními faktory: NF- κ B a AP-1[38]. Vazebná místa pro NF- κ B byla nalezena na promotorové oblasti genů pro E-selektin, VCAM-1 a ICAM-1. Vazebná místa pro AP-1 se nachází na promotorové oblasti genů pro ICAM-1 a E-selektin. [39]. Ke zmírnění exprese CAM vyvolané

cytokiny, LPS (lipopolysacharidy) nebo oxidanty se používají inhibitory aktivace nebo nukleární translokace faktorů NF- κ B a AP-1 [40].

2.4. ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE

Jedná se o lokalizované či generalizované poškození endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi vasorelaxačními a vasokonstrikčními, prokoagulačními a antikoagulačními, růst stimulačními a růst inhibujícími mechanismy. Výsledkem této nerovnováhy je proaterogenní účinek s převahou vasokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů [41]. Endoteliální dysfunkce představuje časnou morfoloogicky němou fází aterosklerózy. Podílí se na vývoji morfoloogicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy.

Dysfunkce endotelu je důležitá v patogenezi aterosklerózy, arteriální hypertenze, diabetu, ICHS, srdečního selhávání, cévních mozkových příhod nebo plicní hypertenzi [42].

Prvním stádiem vedoucím k endoteliální dysfunkci je tzv. *aktivace endotelu* lokálními, nebo systémovými podněty. Výsledkem aktivace je změna permeability, vazospastické reakce, porušení hemostatických mechanismů, uvolnění růstových faktorů. Aktivace endotelu je pouze krátkodobá záležitost, která provází např. i virová onemocnění.

Při dlouhodobém působení rizikových faktorů (hypertenze, diabetes, hyperlipidémie, kouření atd.) dochází rozvoji endoteliální dysfunkce [43].

Endoteliální dysfunkce a ateroskleróza

Endoteliální dysfunkce je prvním krokem při vzniku aterosklerózy. V časně fázi dochází díky zvýšené permeabilitě k průniku aterogenních lipidů a monocytů do cévní stěny. Aktivovaný endotel interaguje svými adhezivními molekulami s leukocyty (exprese adhezivních molekul je zvýšena). Dochází k jejich adhezi a migraci do endotelu. Vyšší produkce cytokinů usnadňuje kumulaci monocytů v cévní stěně, následuje fagocytóza oxidovaných LDL částic monocyty a jejich přeměna na pěnové buňky. Díky nedostatečné produkci NO se uplatňují růstové faktory, které

stimulují buňky hladkého svalstva k migraci do subendoteliálního prostoru. Pěnové buňky vytvářejí tukové proužky, které jsou prvním stádiem aterosklerózy. Postupnou kumulací se vytváří aterosklerotický plát. U pokročilých stádiích aterosklerózy endoteliální dysfunkce zvyšuje riziko ruptury plátu [44].

2.5. ZVÍŘECÍ MODELY POUŽÍVANÉ KE STUDIU ATEROSKLERÓZY

Ke studiu patogeneze aterosklerózy a jejího léčení se používá mnoho zvířecích druhů. Jejich použití je omezeno velikostí zvířete a vlastnostmi charakterizujícími určitý druh. Např. *potkani a psi* nejsou dobrými modely ke studiu aterosklerózy. Aterosklerotické léze se u nich nevyvíjí spontánně, ale k jejich vzniku je potřeba speciální dieta. U *králíků* se také nerozvíjí ateroskleróza bez speciální diety, ale po cholesterolové manipulaci vznikají léze velice rychle. [45]. V porovnání s lézemi lidskými jsou tyto bohatší na tuk a makrofágy a hladiny cholesterolu jsou mimořádně vysoké. *Prasata a opice* jsou také vhodnými modely ke studiu aterosklerózy, ale v současné době se upouští od zkoumání lézí u opic kvůli jejich vysoké ceně a riziku jejich vyhubení. Hladiny cholesterolu a léze jsou u prasat velice podobné jako u lidí, ale jejich použití je limitováno problémy s udržováním a zacházením s prasečími koloniemi. Do roku 1992 se veškeré výzkumy zaměřovaly na studium aterosklerózy u králíků, méně u prasat a primátů. Během výzkumů se získaly neocenitelné poznatky. Prasečí modely ukázaly, že aterogenní proces začíná infiltrací monocytů [46]. Díky studiím u opic a králíků jsme získali informace o iniciaci a rozvoji aterosklerotických lézí [47].

Myší modely aterosklerózy

Stále se však hledal vhodný myší model, který by plně vyhovoval podmínkám jako je velikost zvířete, genetická reprodukce a možnost zkoumat terapii aterosklerózy. Myši jsou velice odolné ke vzniku a rozvoji aterosklerózy. Jediná výjimka je druh myší C57BL/6. Jestliže jsou krmeny dietou bohatou na cholesterol s vysokým obsahem kyseliny cholové, vytváří se u nich léze, které se liší od lidských v histologické povaze a jejich umístění. První dieta, která byla používána u myšího modelu, se skládala z 30% tuku, 5% cholesterolu a 2% kyseliny cholové. U myší krmených touto dietou docházelo k rozvoji aterosklerózy. Tato dieta se postupem

času ukázala jako vysoce toxická, myši ztrácely váhu a onemocněly smrtelnými respiračními infekcemi [48].

Další dietou byla tzv. „Paigenova dieta“, skládala se z 15% tuku, 1,25% cholesterolu a 0,5% kyseliny cholové [49]. Bohužel, ani tato dieta plně nevyhovovala nárokům na studium aterosklerózy. Myši byly krmené touto dietou od 14 týdnů do 9 měsíců. Léze, které se u nich vyvíjely byly velmi malé (od 200 do 1000 μm^2). Vyskytovaly se pouze v aortálním oblouku ve stádiu pěnových buněk a tukových proužků s malou účastí hladkosvalových buněk. Další výzkumy ukázaly, že tato dieta je sama o sobě vysoce zánětlivá. Indukuje aktivaci jaterního faktoru NF- κ B a expresi mediátorů akutní fáze zánětu. Aterosklerotické léze zůstávaly, na rozdíl od lidských, ve stádiu tukových proužků a nedocházelo u nich k progresi nemoci do pokročilejších stádií. Proto také tento model nebyl nejvhodnější, i když byl hodně používán [50].

Dlouhou dobu se myší modely ke studiu aterosklerózy nepoužívaly. Důvodů bylo několik: u mnoha myší léze nevznikaly, byly odlišné od lidských lézí, nebo nebyly reprodukovatelné, mnoho myší nebylo schopno přežít vysoce aterogenní tukovou dietu. Problém s reprodukovatelností byl vyřešen použitím tzv. rodově zatížených (imbredních) myších druhů. U tohoto typu vznikají aterosklerotické léze, které se velmi podobají lézím lidským (vytváří se u nich fibrózní čepička). Při snížení obsahu tuků v dietě se vyřešil problém s přežíváním myších kolonií.

Myší modely splňují mnoho důležitých kritérií, ale musíme vzít v úvahu velké rozdíly mezi myší a člověkem. Průměrná délka lidského života je kolem 75 let, zatímco myš žije maximálně 2 roky. Také se liší svojí váhou (dospělá myš váží asi 30 gramů). Další rozdíl je ve spektru lipidů. Člověk transportuje cholesterol pomocí LDL částic, u myší je cholesterol přepravován vázáný na HDL částice, které mají naopak u lidí protektivní účinek proti ateroskleróze. Myši krmené dietou se sníženým obsahem tuků spontánně nerozvíjí aterosklerotické léze, zatímco u člověka k jejich vzniku dochází [48].

Výhodou všech zvířecích modelů je, že při studiích můžeme ovlivnit životní podmínky a dietu. U člověka to vzhledem k délce života není možné. U myší můžeme provádět různé genetické modifikace pomocí křížení nebo genetického inženýrství. U člověka jsou studie v tomto směru limitovány.

Studie aterosklerózy na myších modelech mají mnoho výhod. Je lehké získat a udržet zvířecí druh. Etapa vývoje je velmi krátká (přibližně 9 týdnů – 3 týdny březosti a 6 týdnů do sexuální dospělosti). Další výhodou je možnost chovat obrovské skupiny pro experimentální studie. Klasická genetika je u myši velice dobře zavedená a s její pomocí můžeme získat stovky imbredních druhů.

V roce 2002 byl na The Mouse Genome Sequencing Consortium publikován výsledek mezinárodní snahy – vysoce kvalitní sekvence a analýza genomu myšího druhu C57BL/6J [51]. S rozvojem molekulární genetiky se podařilo do myšího genu inkorporovat vnější transgeny. Toto včlenění může být provedeno i u mnoha dalších druhů. Ale co je specifické pouze pro myši je možnost vyřadit (knock-outovat) nebo nahradit endogenní geny. Toto je další velice důležitá výhoda práce s myšími modely [52].

Myší modely nemají jen samé výhody, jejich důležitou nevýhodou je malá velikost způsobující problémy s chirurgickou manipulací. V současné době technika pokročila a podařilo se překonat i tento problém. Dnes jsou vědci schopni sejmout aterosklerotické léze u žijících myši, srdeční katetrizací vyšetřit kardiovaskulární funkci u volně žijících myši a chirurgickou ligaturou obvázat koronární artérie a tím způsobit ischemii.

Nedávno byly genetickou manipulací vytvořeny tzv. dvojitě knock-outované myši [53]. Byl jim vyřazen gen pro apoE lipoprotein a pro LDL receptor (apoE/LDLr-DKO myši). Tyto dvojitě knock-outované myši reprezentují nový myší model u kterého se rozvíjí vážná hyperlipidémie a ateroskleróza. Progrese aterosklerózy je u apoE/LDLr-DKO myši mnohem více výrazná, než u myši deficitních pouze na apoE (při krmení stejnou dietou se sníženým obsahem tuků) [54]. Z tohoto důvodu se zdají být apoE/LDLr-DKO myši vhodným modelem ke studiu vlivu řady antiaterogenních látek na proces experimentální aterosklerózy.

2.6. STATINY V LÉČBĚ HYPERCHOLESTEROLÉMIE

Statiny (nazývané též vastatiny) patří v dnešní době mezi nejúčinnější hypocholesterolemika.

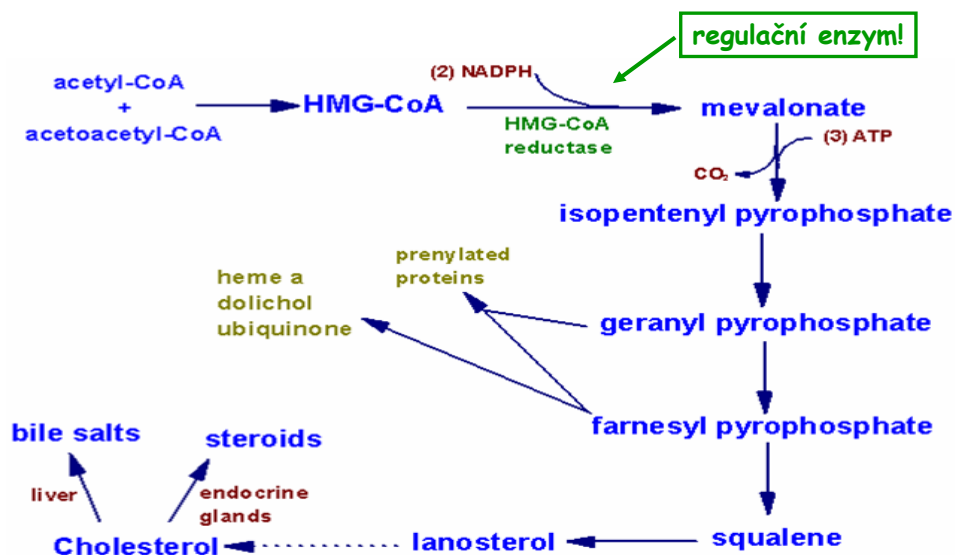
Statiny jsou kompetitivními inhibitory enzymu HMG-CoA reductázy. Místem jejich působení jsou játra. Základní dávka statinů snižuje LDL-cholesterol asi o 27%, její zdvojnásobení vždy o dalších asi 7%. Syntéza endogenního cholesterolu je nejvyšší v noci, proto bývá doporučováno brát statiny na noc.

2.6.1. Mechanismus účinku

Statiny způsobují inhibici klíčového enzymu syntézy cholesterolu HMG-CoA reductázy (3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reductázy). Tento enzym katalyzuje v játrech přeměnu HMG-CoA na mevalonát (viz Obr. 5). Jeho inhibicí dochází k blokáde endogenní biosyntézy cholesterolu. Kyselina mevalonová je prekurzorem nejen cholesterolu, ale i mnoha nesteroidních isoprenoidních sloučenin, které se účastní procesu buněčného metabolismu a mezibuněčné komunikace [55]. Snižování hladiny cholesterolu vede k jeho depleci zejména v hepatocytech, díky tomu dochází ke zvýšené transkripci LDL receptorového genu a zvýšené expresi LDL receptorů. Následkem zvýšení počtu receptorů je rychlejší odstraňování LDL cholesterolu z krevního oběhu. Pokles hladiny cholesterolu vede ke zmenšení velikosti aterosklerotických plátů a snížení rizika jejich ruptury a k méně častým projevům ischemie [56]. Statiny ovlivňují také hladiny triglyceridů vychytáváním VLDL cholesterolu, nepřímo působí i na zvýšení hladiny HDL [57].

Podle klinické účinnosti můžeme statiny srovnat takto ruvastatin, atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin, pravastatin (od nejúčinnějšího k nejméně účinnému) [58].

Obrázek 5 Schéma syntézy cholesterolu
 (<http://web.indstate.edu/thcme/mwking/cholesterol.html>)



2.6.2. Indikace statinů

Hlavní indikací statinů je hypercholesterolemie nebo smíšená dislipidémie s převahou hypercholesterolemie u pacientů s manifestní aterosklerózou, nebo ve vysokém riziku atherotrombotických komplikací. Statiny snižují riziko kardiovaskulárních příhod o 61% a riziko ICMP o 17%. Hlavním cílem léčby není snížení hladin lipidů na určitou hranici, ale snížení rizik kardiovaskulárních příhod.

2.6.3. Nelipidové (pleiotropní) účinky statinů

Podle randomizovaných klinických studií se statiny podílejí na snížení incidence infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhody u pacientů s hypercholesterolémií. Klinický prospěch je dán nejen jejich schopností snižovat hladiny plazmatických lipidů, ale i jejich pleiotropními účinky, které jsou nezávislé na snížení hladin lipidů. Statiny inhibicí HMG-CoA reduktázy blokují nejen vznik cholesterolu, ale i dalších nesteroidních isoprenoidních sloučenin, jejichž prekurzorem je kyselina mevalonová. Isoprenoidy se účastní procesů buněčného

metabolismu a mezibuněčné komunikace. Snížením jejich syntézy jsou ovlivněny různé patologické procesy. Mezi významné extralipidové účinky patří ovlivnění zánětlivé reakce, endoteliální dysfunkce, tvorby trombů, stability plátů, inzulínové rezistence a kostní formace, což jsou mechanismy a procesy uplatňující se v patofyziologii aterosklerózy, ischemické cévní mozkové příhody, demence nebo osteoporózy [59].

Protizánětlivé účinky jsou dány zejména snížením hladiny CRP, inhibicí interakce endotelových buněk a leukocytů, snížením počtu zánětlivých buněk v aterosklerotickém plátu a snížením exprese CAM [60].

Příznivé působení na endoteliální dysfunkci spočívá nejspíš v jejich schopnosti zvyšovat expresi a aktivitu endoteliální NO syntázy (eNOS) [61]. Statiny tedy ovlivňují posttranskripční a posttranslační děje [62]. Ovlivněním syntézy NO je snížena progresse aterosklerózy.

Dalším pleiotropním účinkem je inhibice migrace a proliferace buněk hladkého svalstva. Je pozorován především u lipofilních derivátů [63]. Statiny navíc inhibují expresi tkáňového faktoru lidských makrofágů, důsledkem může být snížení intenzity trombózy při ruptuře plátu. Stabilizační účinek na aterosklerotický plát je výsledkem schopnosti statinů redukovat hladiny lipidů, inhibovat jejich oxidaci, snižovat zánět, buněčnou smrt, syntézu metaloproteináz (způsobují oslabení fibrózní čepičky), zvyšovat hladiny tkáňového inhibitoru metaloproteinázy-1 (TIMP-1) a obsah kolagenu v plátu [64].

V poslední době byl prokázán příznivý vliv statinů i na kostní denzitu a snížení rizika fraktur. Statiny mají stejný účinek na aktivitu osteoklastů jako bifosfonáty (omezují kostní resorpci inhibicí farnesylpyrofosfátsyntázy, enzymu účastnícího se i syntézy cholesterolu). Inhibitory HMG-CoA reductázy působí také při novotvorbě kostní hmoty. Zvyšují expresi genu pro kostní morfogenetický protein-2. Tento protein je růstovým faktorem umožňující proliferaci a zrání osteoblastů a novotvorbu kostí [65].

U lidí trpících Alzheimerovou demencí dochází ke kumulaci neurotoxického β -amyloidu v mozku a zvýšení hladiny sérového cholesterolu. V experimentálních studiích bylo po podávání statinů zjištěno snížení intracelulárních a extracelulárních hladin β -amyloidu. Omezení tvorby β -amyloidních plaků je následkem snížení

membránového cholesterolu. Statiny jsou také schopny inhibovat lidské cholinesterázy, zejména butyrylcholinesterázu (její hladina je u Alzheimerovy nemoci zvýšená). Cholinesterázy hrají roli v patogenezi a progresi nemoci (jejich inhibitory se používají k léčbě symptomů) [66].

Tyto pleiotropní účinky (spojené s lokální modulací biosyntézy mevalonátu) přispívají ke snížení rizika aterosklerotických komplikací a mohly by být využity i v dalších indikacích. Například při snižování rizika nového vývoje diabetes mellitus typu 2, demence a osteoporózy. Použití statinů v jiných, než hypolipidemických indikacích, brání nedostatek randomizovaných klinických studií sledujících terapeutickou účinnost v nových indikacích.

Díky tomu obecně platí názor, že extralipidové účinky mají pouze doplňující funkci k hlavnímu hypolipidemickému efektu [67].

3. CÍL PRÁCE

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

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

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

4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 10 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

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

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

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

4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

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

4.3. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ

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

Postup barvení olejovou červení:

Barvení Oil Red O:

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

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

4.4. IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a v části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C . Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy po patnáctiminutovém usušení vložily na 10 minut do destilované vody, následně se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). V další fázi byly na sklíčka napipetovány roztoky anti avidinu a anti biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut), dále do roztoku 3% H_2O_2 (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5 minut) se řezy inkubovaly se sekundárními protilátkami (30 minut) – goat anti-hamster IgG a goat anti-rat IgG (Vector Laboratories), které byly značeny biotinem a opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dále byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories). K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontována do eukittu.

Byla použita následující primární protilátka:

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

Pracovní postup:

nechat uschnout řezy	60 minut
Fixace aceton (uschovaný v-20°C)	15 minut
Usušit	15 minut
PBS	10 minut

10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	30 minut
inkubace s avidinem D	15 minut
Oplach v PBS	5 minut
inkubace s biotinem	15 minut
PBS	Oplach
primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
PBS 1	2x5 minut
10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	15 minut
sekundární protilátka (+ mouse sérum v PBS)	30 minut
PBS 3	5 minut
3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
PBS 4	2x5 minut
ABC komplex elite	30 minut
PBS 5	5 minut
DAB (podle návodu)	nutno určit čas
destilovaná voda	Oplach
Aceton	Oplach
Aceton – xylen (10:1)	3 minuty
Aceton – xylen (1:10)	3 minuty
3x xylen	2 minuty
Eukitt – montování krycího sklíčka	

4.5. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ

Plocha velikosti barvení olejovou červení a endoteliální exprese VCAM-1 byla kvantifikována pomocí stereologických metod [68]. Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7µm (0,385 mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 5. řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou olejové červeně, respektive VCAM-1 barvením v intimě

cévy na jednu cévu [69]. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočítá podle vzorce:

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

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

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

4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA

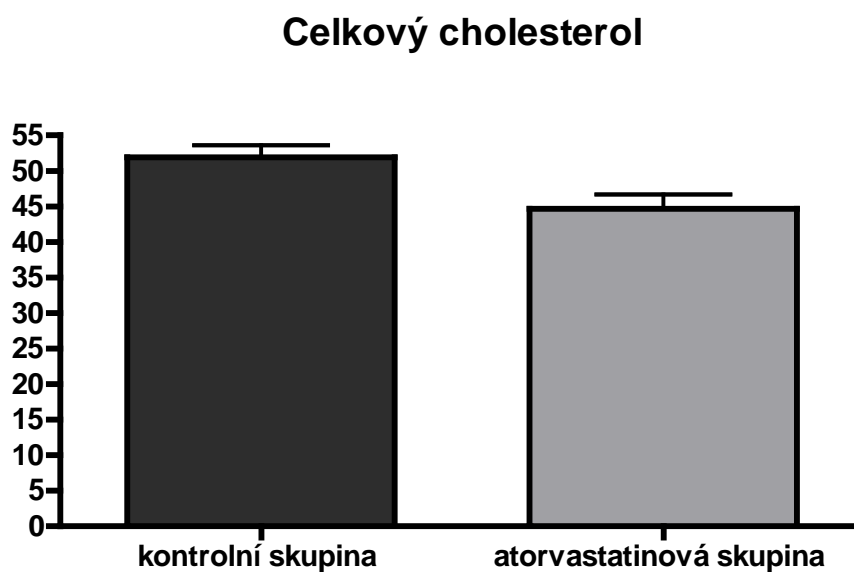
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u atorvastatinové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$.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

5. VÝSLEDKY

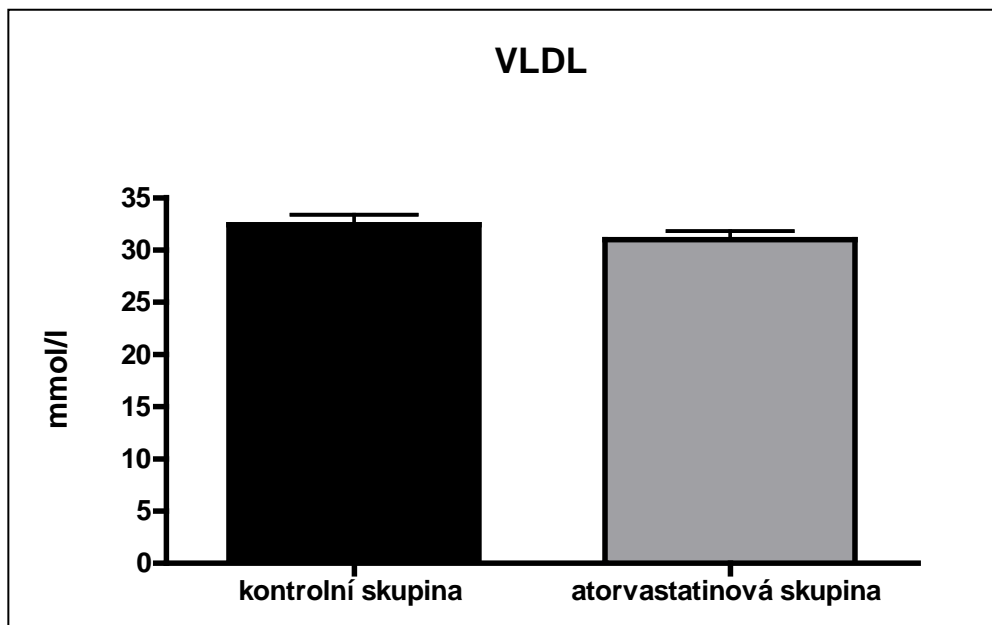
5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

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

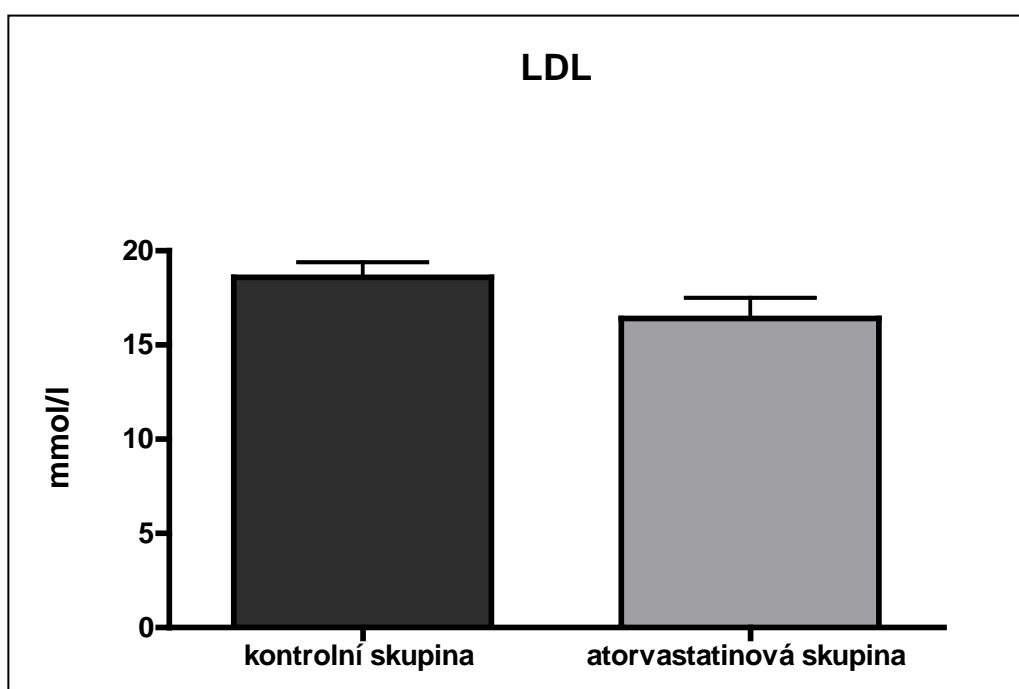
Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou ($^xP < 0,05$).



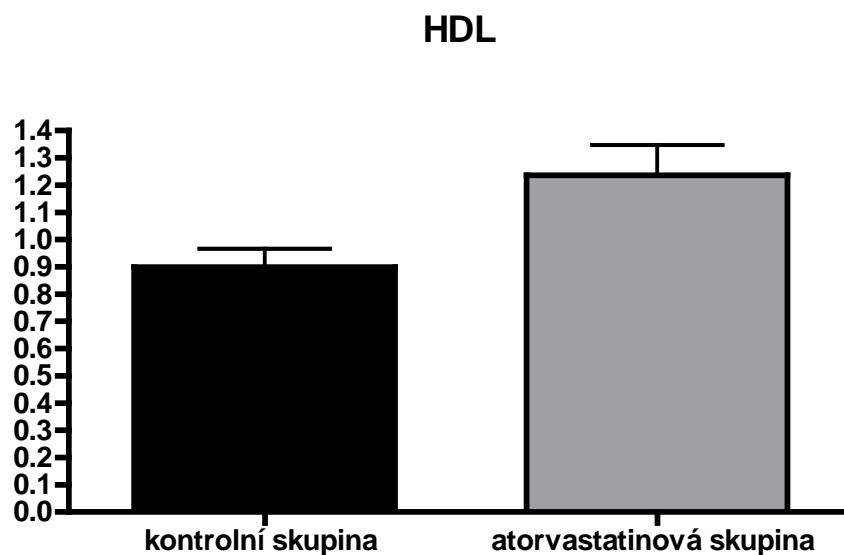
Graf 2: Hladiny VLDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu pouze mírně a nesignifikantně snížilo hladiny VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou.



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



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

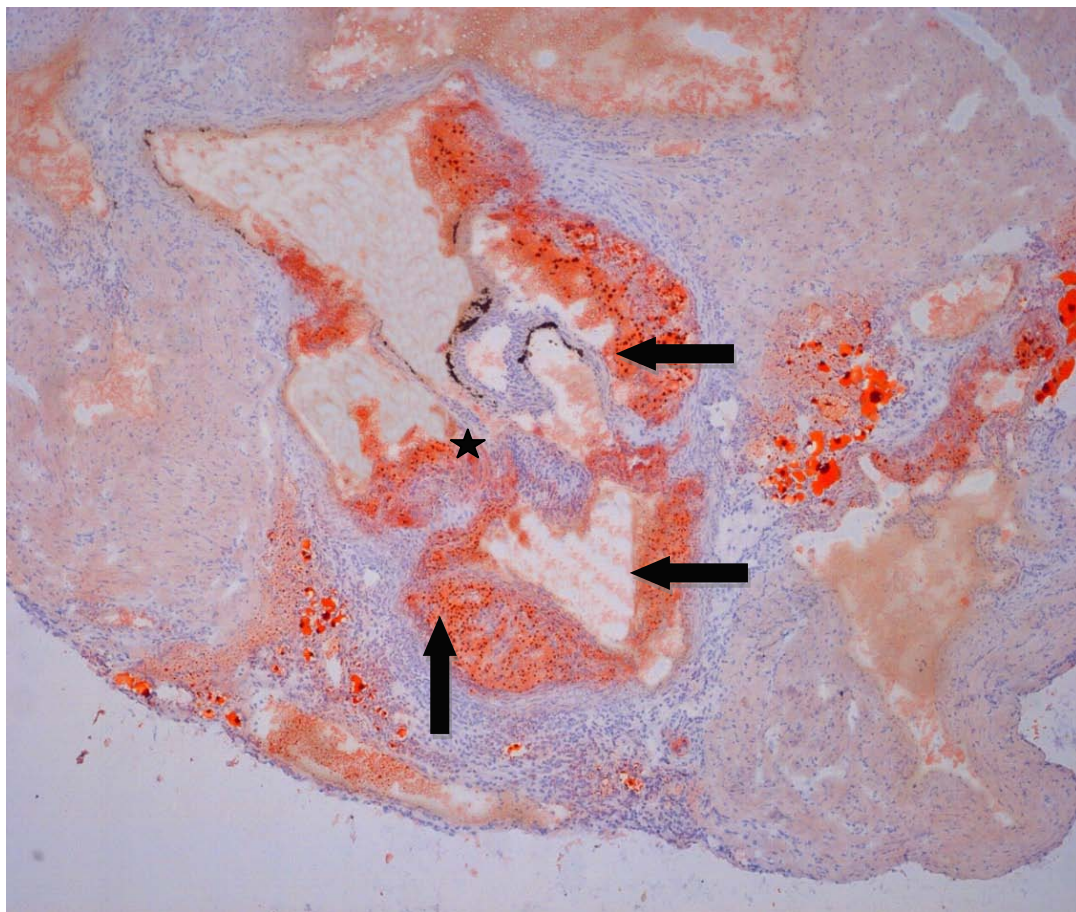


Graf 5: Hladiny triacylglycerolů u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu pouze mírně a nesignifikantně snížilo hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou.

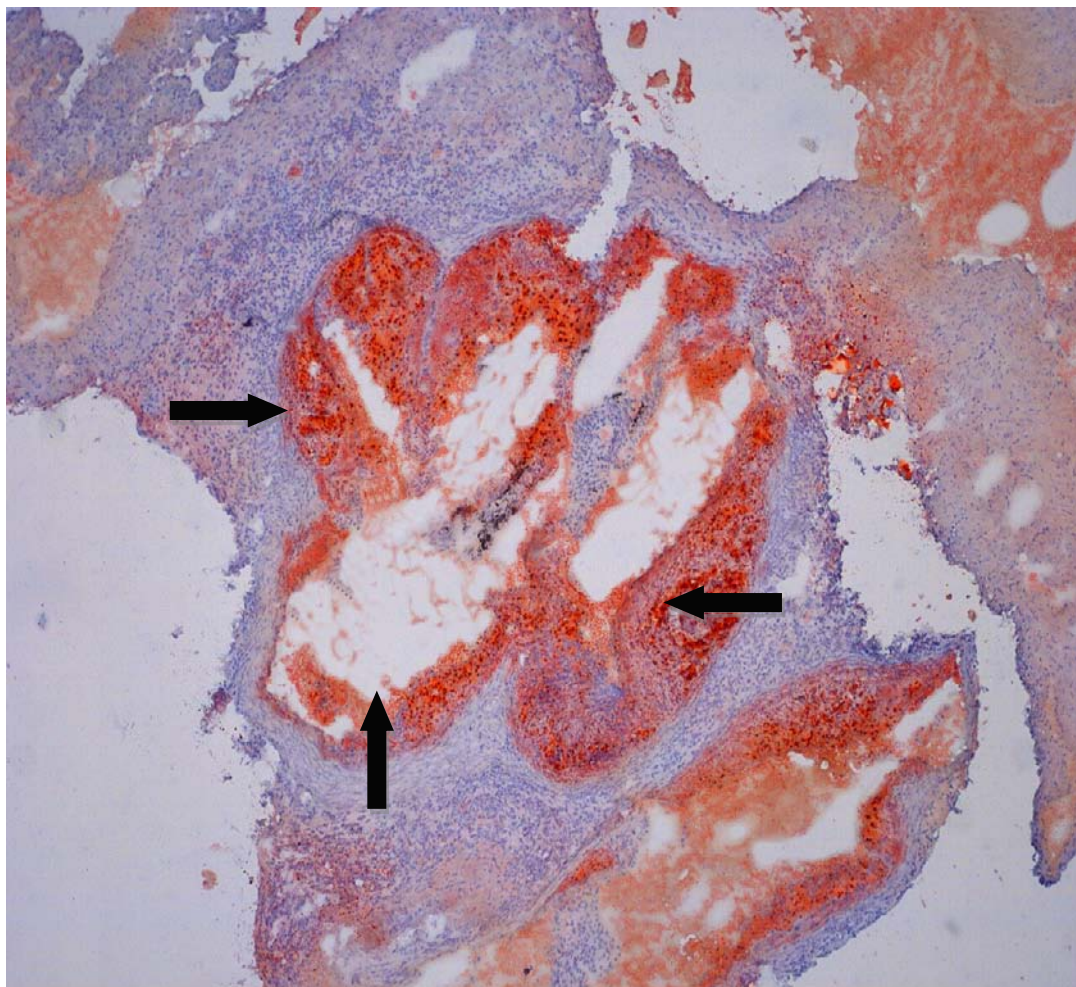
5.2. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ

U všech řezů v kontrolní i atorvastatinové skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí. Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Podávání atorvastatinu nevedlo ke změně intenzity barvení olejovou červení v aterosklerotických lézích.

Obr. 6: Barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Zvětšení preparátu 40x.



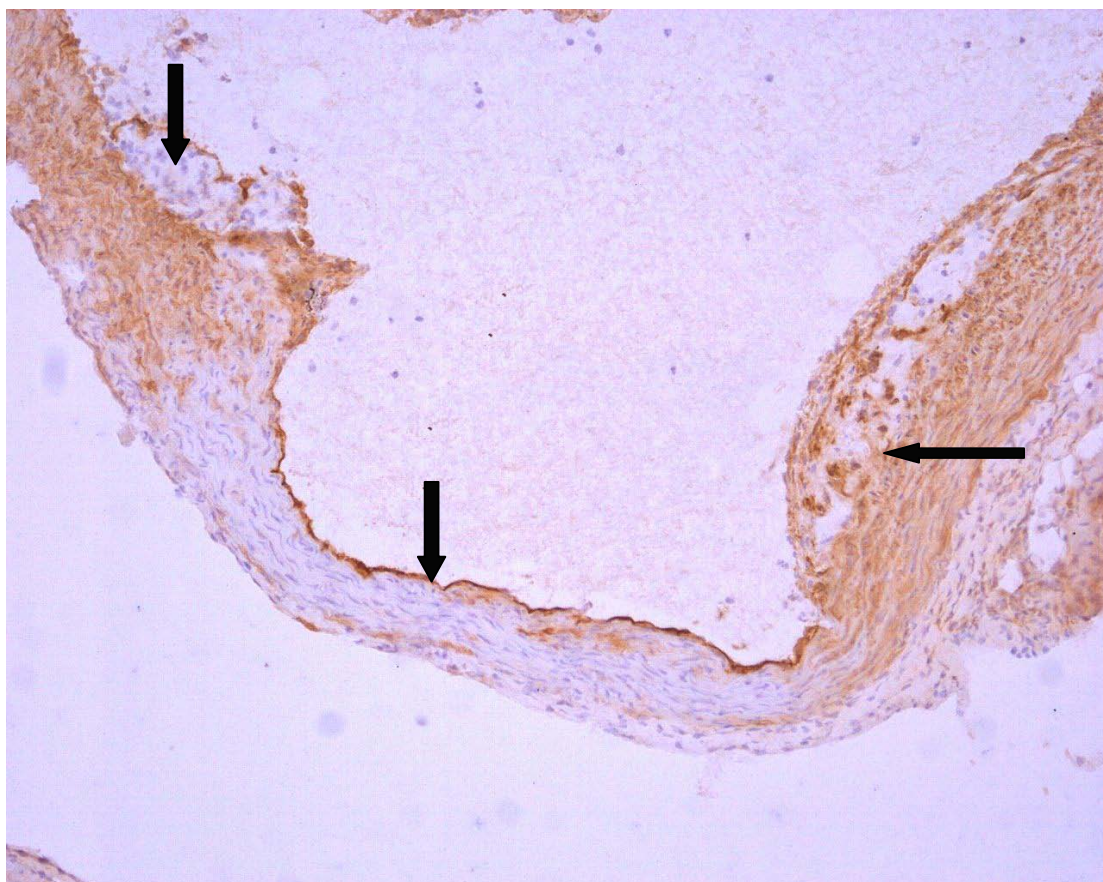
Obr. 7: Barvení olejovou červení u atorvastatinové skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta společně s 10 mg/kg atorvastatinu. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní. Intenzita a plocha barvení olejovou červení se zdá být stejná jako u kontrolní skupiny. Zvětšení preparátu 40x.



5.3. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ VCAM-1 V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU

Expres VCAM-1 byla pozorována v kontrolní i atorvastatinové skupině. Silná intenzita byla pozorována v medii cév pod aterosklerotickými pláty. Dále byla pozorována exprese v aterosklerotických plátech. Silná exprese byla pozorována také na cévním endotelu v oblasti plátu i mimo něj (obr.8). Barvení VCAM-1 bylo v obou studovaných skupinách téměř identické a nelišilo se ani v lokalizaci ani v intenzitě barvení.

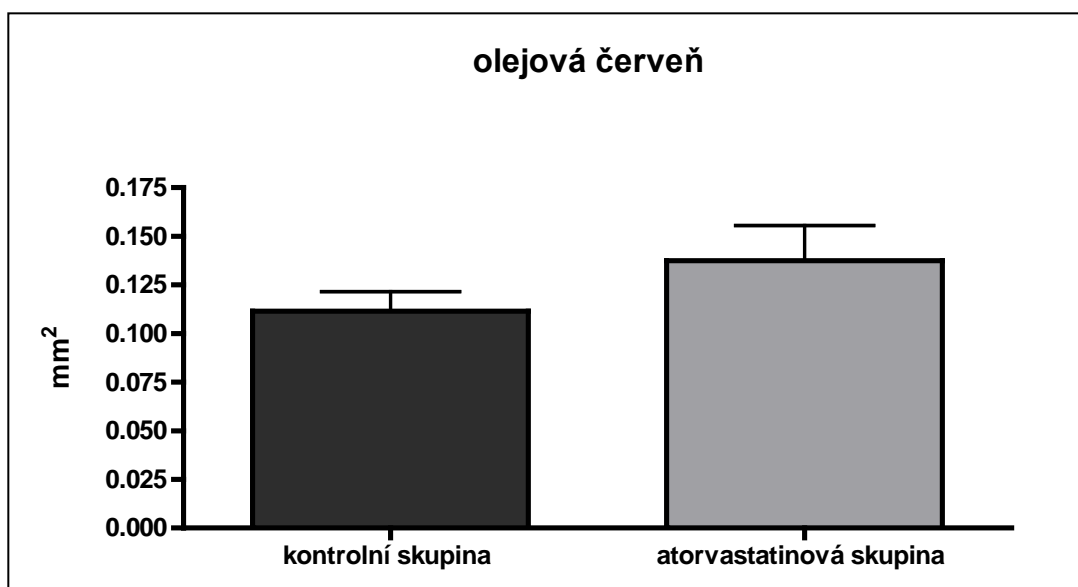
Obr. 8: Imunohistochemické barvení VCAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je pozorována v medii cévy pod aterosklerotickým plátem, v plátu a na cévním endotelu. Zvětšení 200x.



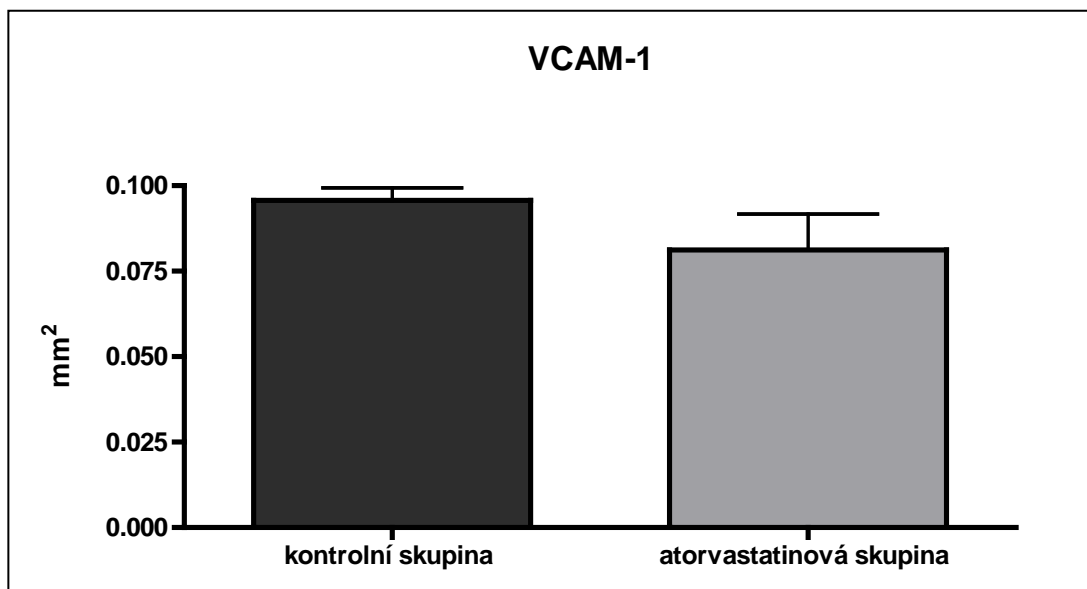
5.4. STEREOLOGICKÁ ANALÝZA HISTOLOGICKÉHO BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ A IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ VCAM-1

Stereologická analýza překvapivě prokázala sice statisticky nevýznamné, ale přesto zvětšení plochy barvení olejovou červení (graf 8). Naproti velikost plochy VCAM-1 barvení byla mírně ale statisticky nevýznamně snížena po podávání atorvastatinu (graf 9).

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



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



6. DISKUSE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze [70].

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky statiny. Statiny (někde uváděny též pod názvem vastatiny) jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktázy). Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením, tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizací ateromatózních plátů aj[71]. Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu [49].

Ačkoli se tento model nejprve vyvíjel slibně, měl dva zásadní problémy. Oproti lidským aterosklerotickým lézím, které se vyskytují ve větvích hlavních cév, kde pláty progredují, myší léze jsou malé, vyskytují se pouze v oblastech aortálního oblouku a nedochází k jejich progresi. Strava, kterou jsou myši krmeny, je nefyziologická, obsahuje 10 – 20x více cholesterolu a žlučových kyselin. Tato strava

vyvolá chronický zánět pouze u citlivých kmenů myši, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohadu, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myši jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v genu pro apolipoproteinu E (apoE) [72]. ApoE apoproteiny jsou tvořeny primárně v játrech, mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myši se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a subklaviálních arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech diety. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myši se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneuryzmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly [73].

U těchto myši bylo prokázáno, že podávání statinů u tohoto modelu nevede k očekávanému hypolipidemickému účinku a tudíž je možné tento model považovat za vhodný ke studiu pleiotropních účinků statinů [74]. Na druhou stranu ale někteří autoři prokázali opačný vliv podávání statinů u tohoto modelu aterosklerózy. Wang et al a Bea et al prokázali hyperlipidemický účinek simvastatinu, který byl navíc doprovázen progresí aterogenních změn u těchto myši [75]. Tyto výsledky tedy naznačují, že tento kmen není příliš vhodný ke studiu účinku statinů.

LDL-receptor deficientní myši jsou myši, které také vznikly genetickými úpravami kmene C57BL/6J. Po podání standardní diety u nich nedochází ke spontánnímu rozvoji hypercholesterolemie jako u apoE^{-/-}-myši. Hypercholesterolemie a morfologicky významná ateroskleróza se vyvíjí až po

podávání vysokotukové diety. Přesto je nutné poměrně dlouhodobé podávání takovéto diety k indukci významných aterosklerotických plátů [48].

Podávání statinů těmto myším vede k hypolipidemickému a antiaterogennímu účinku nicméně se často musí využívat velké dávky statinů a to až 300mg/kg/den [76].

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

ApoE/LDL receptor deficientní myši vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu, již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik [53].

My jsme se v této diplomové práci pokusili ověřit, zda atorvastatin u těchto myší vykazuje hypolipidemické, protizánětlivé a antiaterogenní účinky. Podávání dávky 10mg/kg/den atorvastatinu po dobu osmi týdnů přineslo poněkud rozporuplné výsledky. Došlo sice ke snížení celkového cholesterolu a zvýšení HDL cholesterolu nicméně LDL, VLDL a TAG nebyly významně sníženy. Podávání atorvastatinu bohužel nevedlo k významnému ovlivnění exprese VCAM-1 v plátu a zároveň ani k ovlivnění barvení olejovou červení, která je markerem akumulace tuků v aterosklerotickém plátu. Z výše uvedených výsledků lze usuzovat, že podávání 10mg/kg/den atorvastatinu není dostatečné pro zajištění výrazného hypolipidemického a protizánětlivého účinku, tedy účinků, které jsou demonstrovány po podávání statinů u lidí.

6. ZÁVĚR

Osmítýdenní podávání atorvastatinu v dávce 10 mg/kg/den vedlo k mírnému zlepšení lipidového profilu léčených apoE/LDL receptor deficientních myši.

Vzhledem k tomu, že v další diplomové práci, kde byl použit stejný design experimentu, ale kde byla použita dávka 100mg/kg/den, došlo k demonstraci velmi výrazného hypolipidemického a protizánětlivého účinku, lze tedy konstatovat, že apoE/LDL receptor deficientní myši by mohly být dobrým zvířecím modelem pro studium účinků statinů na aterogenezi. Je nutné však použít dávku statinů pohybující se kolem 100 mg/kg/den.

Zejména by však tyto myši mohly být využity pro studium možné kombinace jiných hypolipidemik (s jiným mechanismem účinku) se statiny.

7. ABSTRAKT

Ateroskleróza, neboli „kornatění tepen“ je degenerativním onemocněním cév. Ateroskleróza se někdy označuje jako „nemoc 20. století“.

Dvojnásobně knokautované myši (apoE/LDL – receptor double – knockout) reprezentují nový model pro studium aterogeneze, který je schopen rozvinout závažný stupeň hyperlipidémie a aterosklerózy.

Statiny (nebo-li kompetitivní inhibitory 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A-reduktázy) patří v současné době mezi nejúčinnější a celosvětově nejpoužívanější hypolipidemika s příznivými účinky na hladiny sérových lipidů i na celkovou a kardiovaskulární mortalitu. Snižují především hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu.

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

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin: kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta, a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 10 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání 10 mg/kg atorvastatinu statisticky významně snížilo pouze hladiny celkového cholesterolu. Hladiny VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu a TAG byly sníženy pouze mírně a statisticky nevýznamně. Bylo ovšem zjištěno, že atorvastatin statisticky významně zvýšil hladiny HDL cholesterolu.

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

Stereologická analýza překvapivě prokázala sice statisticky nevýznamné, ale přesto zvětšení plochy barvení olejovou červení. Naproti tomu velikost plochy

VCAM-1 barvení byla mírně ale pouze statisticky nevýznamně snížena po podávání atorvastatinu.

Závěrem této diplomové práce tedy může být tvrzení, že apoE/LDL receptor deficientní myši by mohly být dobrým zvířecím modelem pro studium účinků statinů na aterogenezi. Osmítýdenní podávání atorvastatinu v dávce 10 mg/kg/den vedlo k mírnému zlepšení lipidového profilu léčených apoE/LDL receptor deficientních myší. Další parametry však nebyly signifikantně zlepšeny tudíž lze konstatovat, že zřejmě vyšší dávka atorvastatinu musí být podávána tak, aby se dosáhlo výrazného antiaterogenního účinku u těchto myší.

8. ABSTRACT

Atherosclerosis, or sclerosis of arteries, is a degenerative disease of arteries. Sometimes it is called „the disease of the 20th century“.

Double knockout mice (apoE/LDL – receptor double knockout) represent a new model for a study of atherogenesis which is capable of developing severe hyperlipidaemia and atherosclerosis.

Statins (or so-called competitive inhibitors of 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-coenzyme A-reductase) currently belong to the most efficient hypolipidemic drugs that are used all over the world. Statins have propitious effects on lipid plasma levels and cardiovascular mortality. They mainly decrease the levels of total cholesterol and LDL cholesterol.

The main aim of this diploma thesis was to evaluate whether atorvastatin possess the same antiatherogenic effects in apo/LDL-receptor deficient mice as were demonstrated in humans. Therefore we analyzed parameters of lipid spectrum in blood, the expression of inflammatory markers in atherosclerotic plaques and the size of atherosclerotic lesions.

All mice were fed with experimental diets in 8 weeks of age. Animals were randomly divided into 2 groups (a control and an atorvastatin group). The mice in the control group were fed only with an atherogenic diet, and the mice in the atorvastatin group had an atherogenic diet which was enriched with 10 mg of atorvastatin/kg of weigh a day.

The results of biochemical analysis showed that 8 weeks feeding with 10 mg atorvastatin/kg significantly decreased only total cholesterol levels. VLDL cholesterol, LDL cholesterol and TAG levels were decreased only slightly and non-significantly. On the contrary atorvastatin treatment resulted in a significant increase in HDL cholesterol levels.

Expression of VCAM-1 was studied in the control and the atorvastatin group. Large intensity was observed in vascular media under atherosclerotic plaques. Moreover strong intensity was observed in atherosclerotic plaque and in endothelium both over the lesion and outside it.

Stereologic analysis showed surprising yet non-significant increase in oil red area staining. On the other hand VCAM-1 expression area was slightly but only non-significantly decreased after atorvastatin treatment.

We conclude that apoE/LDL receptor deficient mice could be a good animal model for studying of effects of statins on atherogenesis. Eight weeks feeding of atorvastatin in dose 10mg/kg/day led to slight improvement in lipid profile in apo/LDL receptor deficient mice. Other parameters were not significantly improved, thus we suggest, that higher dose of atorvastatin must be used to reach marked antiatherogenic effect in these mice.

9. LITERATURA

- [1] K. Strutt, R. Caplan, H. Hutchison, A. Dane, J. Blasetto, More Western hypercholesterolemic patients achieve Japan Atherosclerosis Society LDL-C goals with rosuvastatin therapy than with atorvastatin, pravastatin, or simvastatin therapy, *Circ J* 68 (2004) 107-113.
- [2] I.M. Handzha, [Viral infection, atherosclerosis, and ischemic heart disease], *Lik Sprava* (2001) 65-67.
- [3] J.F. Keaney, Jr., Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction, *Mol Aspects Med* 21 (2000) 99-166.
- [4] H.C. Stary, Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults, *Arteriosclerosis* 9 (1989) I19-32.
- [5] Y. Jang, A.M. Lincoff, E.F. Plow, E.J. Topol, Cell adhesion molecules in coronary artery disease, *J Am Coll Cardiol* 24 (1994) 1591-1601.
- [6] V. Shantaram, Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension, *Clin Exp Hypertens* 21 (1999) 69-77.
- [7] H. Mangge, H. Hubmann, S. Pilz, K. Schauenstein, W. Renner, W. Marz, Beyond cholesterol--inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis, *Clin Chem Lab Med* 42 (2004) 467-474.
- [8] S. Yla-Herttuala, Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis, *Ann Med* 23 (1991) 561-567.
- [9] J.J. Boyle, Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture, *Curr Vasc Pharmacol* 3 (2005) 63-68.
- [10] W.E. Stehbens, The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis, *Med Hypotheses* 58 (2002) 359-360.
- [11] C. Yuan, S.X. Zhang, N.L. Polissar, D. Echelard, G. Ortiz, J.W. Davis, E. Ellington, M.S. Ferguson, T.S. Hatsukami, Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke, *Circulation* 105 (2002) 181-185.
- [12] Z. Mallat, A. Gojova, C. Marchiol-Fournigault, B. Esposito, C. Kamate, R. Merval, D. Fradelizi, A. Tedgui, Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice, *Circ Res* 89 (2001) 930-934.
- [13] H.C. Stary, A.B. Chandler, S. Glagov, J.R. Guyton, W. Insull, Jr., M.E. Rosenfeld, S.A. Schaffer, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, R.W. Wissler, 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, *Arterioscler Thromb* 14 (1994) 840-856.
- [14] C.F. Semenkovich, J.W. Heinecke, The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot, *Diabetes* 46 (1997) 327-334.
- [15] R.O. Cannon, 3rd, Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium, *Clin Chem* 44 (1998) 1809-1819.
- [16] A. Laurila, A. Bloigu, S. Nayha, J. Hassi, M. Leinonen, P. Saikku, Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 2910-2913.
- [17] P. Muntner, J. He, B.C. Astor, A.R. Folsom, J. Coresh, Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney

- disease: results from the atherosclerosis risk in communities study, *J Am Soc Nephrol* 16 (2005) 529-538.
- [18] F.M. Sacks, A.M. Tonkin, J. Shepherd, E. Braunwald, S. Cobbe, C.M. Hawkins, A. Keech, C. Packard, J. Simes, R. Byington, C.D. Furberg, Effect of pravastatin on coronary disease events in subgroups defined by coronary risk factors: the Prospective Pravastatin Pooling Project, *Circulation* 102 (2000) 1893-1900.
- [19] C. Catena, M. Novello, R. Lapenna, S. Baroselli, G. Colussi, E. Nadalini, G. Favret, A. Cavarape, G. Soardo, L.A. Sechi, New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a), *J Hypertens* 23 (2005) 1617-1631.
- [20] R.B. D'Agostino, Jr., R.F. Hamman, A.J. Karter, L. Mykkanen, L.E. Wagenknecht, S.M. Haffner, Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study, *Diabetes Care* 27 (2004) 2234-2240.
- [21] R.I. Coniglio, O. Colombo, L. Vasquez, A.M. Salgueiro, J.C. Otero, M.M. Malaspina, [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis], *Medicina (B Aires)* 57 (1997) 21-28.
- [22] H.C. McGill, Jr., C.A. McMahan, A.W. Zieske, G.T. Malcom, R.E. Tracy, J.P. Strong, Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile, *Circulation* 103 (2001) 1546-1550.
- [23] L. Iacoviello, M.B. Donati, G. de Gaetano, [Novel risk factors for atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and cholesterol as predictors of peripheral arteriopathy], *Ital Heart J Suppl* 2 (2001) 1031-1033.
- [24] H.M. Dansky, C.B. Barlow, C. Lominska, J.L. Sikes, C. Kao, J. Weinsaft, M.I. Cybulsky, J.D. Smith, Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (2001) 1662-1667.
- [25] N.N. Chan, P. Vallance, H.M. Colhoun, Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003) 1048-1054.
- [26] M. Stoll, S. Meffert, U. Stroth, T. Unger, Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium, *J Hypertens* 13 (1995) 1529-1534.
- [27] F. Lebrin, M. Deckers, P. Bertolino, P. Ten Dijke, TGF-beta receptor function in the endothelium, *Cardiovasc Res* 65 (2005) 599-608.
- [28] Y. Nakashima, E.W. Raines, A.S. Plump, J.L. Breslow, R. Ross, Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 842-851.
- [29] H. Li, M.I. Cybulsky, M.A. Gimbrone, Jr., P. Libby, An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium, *Arterioscler Thromb* 13 (1993) 197-204.
- [30] C.F. Krieglstein, D.N. Granger, Adhesion molecules and their role in vascular disease, *Am J Hypertens* 14 (2001) 44S-54S.

- [31] A.D. Blann, C.N. McCollum, Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis, *Thromb Haemost* 72 (1994) 151-154.
- [32] P.L. Walpole, A.I. Gotlieb, M.I. Cybulsky, B.L. Langille, Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (1995) 2-10.
- [33] M.I. Cybulsky, K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J.C. Gutierrez-Ramos, P.W. Connelly, D.S. Milstone, A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis, *J Clin Invest* 107 (2001) 1255-1262.
- [34] N. Marui, M.K. Offermann, R. Swerlick, C. Kunsch, C.A. Rosen, M. Ahmad, R.W. Alexander, R.M. Medford, Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells, *J Clin Invest* 92 (1993) 1866-1874.
- [35] S.M. Watt, S.E. Gschmeissner, P.A. Bates, PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells, *Leuk Lymphoma* 17 (1995) 229-244.
- [36] T.A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* 76 (1994) 301-314.
- [37] T.A. Springer, Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration, *Annu Rev Physiol* 57 (1995) 827-872.
- [38] J.H. Brasen, T. Hakkinen, E. Malle, U. Beisiegel, S. Yla-Herttuala, Patterns of oxidized epitopes, but not NF-kappa B expression, change during atherogenesis in WHHL rabbits, *Atherosclerosis* 166 (2003) 13-21.
- [39] M.I. Cybulsky, A.H. Lichtman, L. Hajra, K. Iiyama, Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis, *Clin Chim Acta* 286 (1999) 207-218.
- [40] M. Richardson, S.J. Hadcock, M. DeReske, M.I. Cybulsky, Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits, *Arterioscler Tromb* 14 (1994) 760-769.
- [41] P.L. van Haelst, J.J. van Doormaal, F.W. Asselbergs, A.M. van Roon, N.J. Veeger, M.M. Henneman, A.J. Smit, J.W. Cohen Tervaert, J.F. May, R.O. Gans, Correlates of endothelial function and their relationship with inflammation in patients with familial hypercholesterolaemia, *Clin Sci (Lond)* 104 (2003) 627-632.
- [42] Z. Mareckova, S. Heller, K. Horky, [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes], *Vnitr Lek* 45 (1999) 46-50.
- [43] A.L. Taylor, Endothelial dysfunction and nitric oxide enhancing therapy: a new approach to the treatment of heart failure, *Congest Heart Fail* 10 (2004) 237-242.
- [44] J. Davignon, P. Ganz, Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis, *Circulation* 109 (2004) III27-32.
- [45] K. Iiyama, L. Hajra, M. Iiyama, H. Li, M. DiChiara, B.D. Medoff, M.I. Cybulsky, Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation, *Circ Res* 85 (1999) 199-207.
- [46] A. Faggiotto, R. Ross, L. Harker, Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation, *Arteriosclerosis* 4 (1984) 323-340.

- [47] A. Faggiotto, R. Ross, Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque, *Arteriosclerosis* 4 (1984) 341-356.
- [48] J.L. Breslow, Mouse models of atherosclerosis, *Science* 272 (1996) 685-688.
- [49] B. Paigen, A. Morrow, P.A. Holmes, D. Mitchell, R.A. Williams, Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice, *Atherosclerosis* 68 (1987) 231-240.
- [50] P.M. Nishina, S. Lowe, J. Verstuyft, J.K. Naggert, F.A. Kuypers, B. Paigen, Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice, *J Lipid Res* 34 (1993) 1413-1422.
- [51] R.H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M.R. Brent, D.G. Brown, S.D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R.D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A.T. Chinwalla, D.M. Church, M. Clamp, C. Clee, F.S. Collins, L.L. Cook, R.R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K.D. Delehaunty, J. Deri, E.T. Dermitzakis, C. Dewey, N.J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D.M. Dunn, S.R. Eddy, L. Elnitski, R.D. Emes, P. Eswara, E. Eyas, A. Felsenfeld, G.A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W.N. Frankel, L.A. Fulton, R.S. Fulton, T.S. Furey, D. Gage, R.A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T.A. Graves, E.D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R.C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L.W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D.B. Jaffe, L.S. Johnson, M. Jones, T.A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E.K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W.J. Kent, A. Kirby, D.L. Kolbe, I. Korf, R.S. Kucherlapati, E.J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J.P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D.R. Maglott, E.R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J.H. Mayer, M. McCarthy, W.R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J.D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J.P. Mesirov, W. Miller, T.L. Miner, E. Mongin, K.T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J.C. Mullikin, D.M. Muzny, W.E. Nash, J.O. Nelson, M.N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M.J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K.H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C.S. Pohl, A. Poliakov, T.C. Ponce, C.P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B.A. Roe, K.M. Roskin, E.M. Rubin, A.G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M.S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J.B. Singer, G. Slater, A. Smit, D.R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J.P. Vinson, A.C. Von Niederhausern, C.M. Wade, M. Wall, R.J. Weber, R.B. Weiss, M.C. Wendl, A.P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R.K. Wilson, E. Winter, K.C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S.P. Yang, E.M. Zdobnov, M.C. Zody, E.S. Lander, Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature* 420 (2002) 520-562.

- [52] S.H. Zhang, R.L. Reddick, J.A. Piedrahita, N. Maeda, Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E, *Science* 258 (1992) 468-471.
- [53] S. Ishibashi, J. Herz, N. Maeda, J.L. Goldstein, M.S. Brown, The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 4431-4435.
- [54] G. Li, J.M. Sanders, E.T. Phan, K. Ley, I.J. Sarembock, Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express p-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein e-deficient mice, *Am J Pathol* 167 (2005) 1511-1518.
- [55] C.J. Vaughan, A.M. Gotto, Jr., C.T. Basson, The evolving role of statins in the management of atherosclerosis, *J Am Coll Cardiol* 35 (2000) 1-10.
- [56] I. Czuriga, I. Edes, [Lowering cholesterol: how low is low enough?], *Orv Hetil* 147 (2006) 1349-1356.
- [57] M. Ahmed, P. Griffiths, Statins and secondary prevention of coronary heart disease, *Br J Community Nurs* 9 (2004) 160-165.
- [58] P. Duriez, [Mechanisms of actions of statins and fibrates], *Therapie* 58 (2003) 5-14.
- [59] J.L. Mehta, Pleiotropic effects of statins: how important are they in the prevention of vascular disease?, *Endothelium* 10 (2003) 3-4.
- [60] S. Mori, Y. Saito, [Pleiotropic effects of statins], *Nippon Rinsho* 60 (2002) 875-881.
- [61] A.S. Wierzbicki, R. Poston, A. Ferro, The lipid and non-lipid effects of statins, *Pharmacol Ther* 99 (2003) 95-112.
- [62] U. Laufs, J.K. Liao, Isoprenoid metabolism and the pleiotropic effects of statins, *Curr Atheroscler Rep* 5 (2003) 372-378.
- [63] A. Corsini, M. Raiteri, M.R. Soma, F. Bernini, R. Fumagalli, R. Paoletti, Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, *Am J Cardiol* 76 (1995) 21A-28A.
- [64] C. Comparato, C. Altana, S. Bellosta, R. Baetta, R. Paoletti, A. Corsini, Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction?, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11 (2001) 328-343.
- [65] G. Tonolo, P. Brizzi, M.G. Melis, G. Secchi, M. Maioli, About the pleiotropic effects of statins in human, *Nephrol Dial Transplant* 18 (2003) 1234.
- [66] J.C. LaRosa, Pleiotropic effects of statins and their clinical significance, *Am J Cardiol* 88 (2001) 291-293.
- [67] P. Calabro, E.T. Yeh, The pleiotropic effects of statins, *Curr Opin Cardiol* 20 (2005) 541-546.
- [68] P. Nachtigal, V. Semecky, M. Kopecky, A. Gojova, D. Solichova, P. Zdansky, Z. Zadak, Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis, *Pathol Res Pract* 200 (2004) 219-229.
- [69] H.J. Gundersen, P. Bagger, T.F. Bendtsen, S.M. Evans, L. Korbo, N. Marcussen, A. Moller, K. Nielsen, J.R. Nyengaard, B. Pakkenberg, et al., The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis, *Apmis* 96 (1988) 857-881.

- [70] R. Ross, Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med* 340 (1999) 115-126.
- [71] C. Arnaud, F. Mach, Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation, *Arch Mal Coeur Vaiss* 98 (2005) 661-666.
- [72] Y. Nakashima, A.S. Plump, E.W. Raines, J.L. Breslow, R. Ross, ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree, *Arterioscler Tromb* 14 (1994) 133-140.
- [73] M.H. Hofker, M. Breuer, Generation of transgenic mice, *Methods Mol Biol* 110 (1998) 63-78.
- [74] C.P. Sparrow, C.A. Burton, M. Hernandez, S. Mundt, H. Hassing, S. Patel, R. Rosa, A. Hermanowski-Vosatka, P.R. Wang, D. Zhang, L. Peterson, P.A. Detmers, Y.S. Chao, S.D. Wright, Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (2001) 115-121.
- [75] F. Bea, E. Blessing, B. Bennett, M. Levitz, E.P. Wallace, M.E. Rosenfeld, Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 1832-1837.
- [76] M.R. Soma, E. Donetti, C. Parolini, G. Mazzini, C. Ferrari, R. Fumagalli, R. Paoletti, HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits, *Arterioscler Thromb* 13 (1993) 571-578.