

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2007

Iva Uhlárová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv kombinovaného podávání MDOC a atorvastatinu na iniciaci aterogenního procesu u experimentálních modelů aterosklerózy.

The effect of MDOC and atorvastatin treatment on early atherogenesis in experimental models of atherosclerosis.

Školitel: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

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

Hradec Králové 2007

Iva Uhlárová

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

Seznam použitých zkratk	4
1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Rizikové faktory aterosklerózy	6
2.2 Ateroskleróza	7
2.2.1 Definice	7
2.2.2 Patogeneze aterosklerózy	7
2.2.3 Stavba artérií a jejich změny při ateroskleróze	9
2.2.4 Příčiny vzniku aterosklerózy	10
2.2.5 Funkce endotelu za fyziologických i patologických podmínek	11
2.2.6 Ruptura plátu a mechanismy působící při ruptuře nestabilních plátů	13
2.2.7 Biomarkery zánětu a ateroskleróza	16
2.2.8 Genetická dispozice	17
2.3 Buněčné adhezí molekuly	18
2.3.1 Imunoglobuliny	18
2.3.2 Fyziologické funkce CAM	19
2.3.3 Regulace endoteliální CAM exprese	21
2.4 MDOC (mikrodisperzní oxidovaná celulóza)	22
2.5 Myší model aterosklerózy	23
2.5.1 Vývoj myšího modelu	23
2.6 Statiny	25
3 CÍL PRÁCE	26
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1 Zvířata a předepsaná dieta	27
4.2 Biochemická analýza	27
4.3 Imunohistochemie	28
4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie	29
4.5 Statistická analýza	30
5 VÝSLEDKY	31
5.1 Biochemická analýza	31
5.2 Imunohistochemická detekce VCAM-1 a ICAM-1 v aortálním oblouku	33
5.3 Stereologická analýza exprese VCAM-1 a ICAM-1 v aortálním oblouku	36
6 DISKUSE	38
7 ZÁVĚR	41
8 ABSTRAKT	42
9 ABSTRACT	43
10 LITERATURA	45

Seznam použitých zkratek

Apo	apolipoprotein; bílkovina tvořící součást pláště lipoproteinu
CRP	C – reaktivní protein
HDL	high density lipoprotein; lipoprotein s nízkou hustotou
ICAM-1	intercellular adhesion molekule – 1; adhezivní molekula z imunoglobulinové superrodiny
IFN- γ	interferon – γ
IL	interleukiny
LDL	low density lipoprotein; lipoprotein s nízkou hustotou
Lp	lipoprotein
MDOC	mikrodisperzní oxidovaná celulóza
NF- κ B	nuclear faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PAF	faktor aktivující destičky
PBS	0,01M fosfátový fyziologický roztok, pH 7,4
PECAM-1	platelet cell adhesion molekule – 1
PG	prostaglandiny
TLR	patří do skupiny tzv. Pattern recognition receptors; modelové rozpoznávací receptory
TNF	tumor necrosis factor; tumor nekrotizující faktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molekule - 1; adhezivní molekula z imunoglobulinové superrodiny
VLA	very late antigen; pozdní aktivační antigen
VLDL	very low density lipoprotein; lipoprotein s velmi nízkou hustotou

1 ÚVOD

Ateroskleróza a její pozdější komplikace jsou příčinou více než poloviny všech úmrtí v západních průmyslových státech (Strutt et al 2004). Její výskyt významně stoupá i v České republice, kde na kardiovaskulární onemocnění (na jejichž vzniku se největší měrou podílí ateroskleróza) umírá více lidí než na nádorová onemocnění a jsou tak nejčastější příčinou úmrtí u nás. Je ale mylné se domnívat, že ateroskleróza jako taková vznikla až ve 20. století. Toto onemocnění sužuje lidstvo již několik tisíciletí. Například už při pitvách mumii egyptských faraónů byly popsány aterosklerotické léze a to u některých i v raném věku.

Současný problém vysoké úmrtnosti na následky aterosklerózy je obrazem životního stylu lidí ve vyspělých státech zejména špatnými stravovacími návyky a sedavým způsobem života bez výraznější fyzické aktivity. Proto je nutné klást důraz na preventivní opatření v jednotlivých zemích, začít se zásadami správné výživy už u dětí, motivovat je ke sportu a fyzickým aktivitám a jít jim příkladem. V zemích, kdy byla veřejnost dostatečně informována o rizikových faktorech aterosklerózy a pacienti uposlechli rady lékařů, úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění klesla (Xu & Chen 2007).

Naše poznání však není definitivní, je nám stále mnoho souvislostí ukryto, stále máme prostor pro nové objevování. Je třeba mít na vědomí, že aterosklerotický proces, který se odehrává ve stěně tepny, je složitým dějem, do kterého zasahuje celá řada faktorů. Jistě ještě neznáme všechny možnosti, jak můžeme proces aterosklerózy ovlivnit. Proto je nutné věnovat ateroskleróze a její léčbě pozornost na všech úrovních výzkumu, jak v rovině experimentální – preklinické, tak klinické. Má být naším cílem stále hlouběji poznávat jak ateroskleróze předcházet, včas ji detekovat, efektivně léčit a omezit tak její následky.

Proto také tato diplomové práce byla zaměřena na sledování změn exprese vybraných markerů endoteliální dysfunkce u myšího modelu aterosklerózy po podávání kombinace dnes již klinicky dobře známého atorvastatinu a potenciální nové substance, MDOCTM, která by mohla být využita jako dietární doplněk.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rizikové faktory aterosklerózy

Aterosklerózy je považována za multifaktoriální onemocnění, proto je vznik této nemoci zpravidla důsledkem současného působení více rizikových faktorů najednou. Vyskytne-li se u jedince několik rizikových faktorů současně, jejich efekt se nesčítá, ale násobí.

Rizikové faktory můžeme rozdělit na neovlivnitelné a ovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné patří věk, u mužů je to nad 45 let a u žen nad 55 let. Větší náchylnost k onemocnění mají muži než ženy, zřejmě díky protektivnímu efektu estrogenu u žen. Genetické faktory rovněž patří významným neovlivnitelným rizikům, hlavně pokud se v rodinné anamnéze u příbuzného 1. stupně vyskytne nemoc u muže do 55 let věku a u ženy do 65 let. Osobní anamnéza je významný rizikový faktor pro svůj další průběh (Muntner et al 2005). Mezi nejrizikovější ovlivnitelné faktory patří diabetes mellitus, arteriální hypertenze, kouření cigaret a hyperlipidemie (Mehta et al 1998).

Hyperlipidemie. Asi 75% cholesterolu je v krvi vázáno v LDL částicích a ateroskleróza úzce souvisí se zvýšenými hodnotami LDL. Defekt LDL receptorů vede velmi časně k ateroskleróze (Pedraza 1993). Dalším možným rizikovým faktorem se zdá být apolipoprotein(a). Apo(a) se podobá plazminogenu a soutěží s ním o vazbu na plazmin a tím zasahuje do fibrinolýzy. Působí proto antifibrinolyticky a tím trombogenně. Souvislost s aterosklerózou však potvrdily jen některé studie (Pedraza 1993).

Hypertenze se podílí na vzniku aterosklerózy zejména zvýšenou tvorbou volných radikálů a taky zvýšenou hladinou angiotenzinu II a endotelinu-1 (Goff et al 2007).

Kouření zvyšuje riziko úmrtí následkem koronární aterosklerózy na 1,4 až 2,4násobek (i slabé kouření), u silných kuřáků je zvýšeno až na 3,5násobek. Příčiny nejsou úplně objasněny, může to být způsobeno vytěsněním O₂ na hemoglobinu CO, alterací produkce oxidu dusnatého (NO), zvýšenou přilnavostí trombocytů a propustností endotelu, způsobenou látkami obsaženými v kouři (Hallan et al 2006)

Diabetes mellitus je metabolické onemocnění, proto se u něj na vzniku aterosklerózy může podílet více faktorů jako např. snížení hladiny HDL současně s vyšší hladinou Lp(a) a VLDL, zvýšená glykace kolagenu a oxidace LDL částic (Shantaram 1999).

Mezi další ovlivnitelné rizikové faktory patří: porucha glukózové tolerance, inzulinorezistence, hyperinzulinismus, nedostatek tělesné aktivity, hyperhomocysteinemie a trombogenní faktory (Shantaram 1999).

Nejčastější místem výskytu aterosklerotických plátů jsou břišní aorta, koronární tepny, aa. popliteae, vzestupná hrudní aorta, aa. carotis internae a circulus arteriosus cerebri, tzn. místa se zvýšeným průtokem a tlakem krve, tudíž hemodynamický stres je také jeden z rizikových faktorů (Tarbell 2003).

2.2 Ateroskleróza

2.2.1 Definice

Ateroskleróza je chronické degenerativní onemocnění, při kterém se ukládají zejména tukové látky do cévní stěny a tím dochází k patologickým změnám ve vnitřní a střední vrstvě cév.

Cévy postupně ztrácejí pružnost a jejich stěna se ztlušťuje, lumen cévy se zužuje a vznikají tzv. aterosklerotické pláty (Stary et al 1994).

2.2.2 Patogeneze aterosklerózy:

Podle současných vědeckých studií je ateroskleróza formou chronického zánětu, kterého se účastní některé lipoproteiny, makrofágy, T-lymfocyty, endotelové buňky, buňky hladké svaloviny cév a případně i další buněčné elementy. Výsledkem zánětlivého procesu je vznik komplexních lézí v cévní stěně, které označujeme jako pláty. Pláty často vyčnívají do průsvitu cévy a způsobují její zúžení. Na aterosklerotickém plátu se směrem do lumen cévy nachází fibrózní kryt. Ruptura plátu a následná trombóza mají za následek akutní komplikace jako srdeční infarkt, mozkové příhody, ischemii končetin s nekrózou či gangrénou anebo vznik dalších patofyziologických stavů vyplývajících z poškození cév na periferii nebo v jiných orgánech (Stary et al 1994).

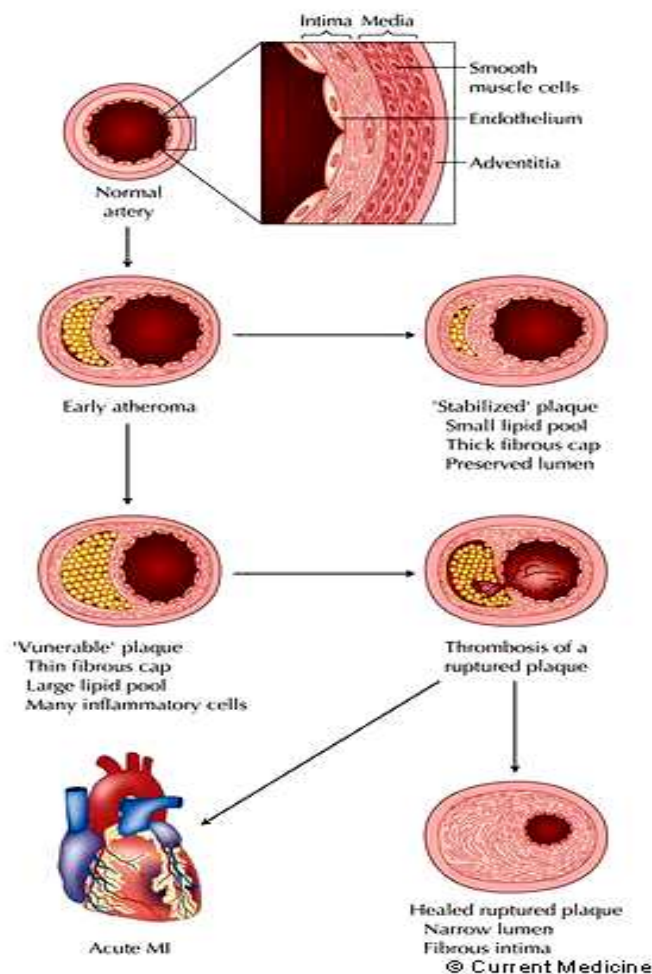
Buněčné procesy při ateroskleróze se (s výjimkou kalcifikace a trombotických jevů) zásadně neodlišují od procesů uplatňujících se při zánětlivě fibroproliferálních chorobách jako je např. jaterní cirhóza nebo revmatoidní artritida. Aterosklerotické léze vznikají jako

výsledek série specifických buněčných a molekulových odpovědí na různé endogenní rizikové faktory a potenciální exogenní antigeny. Při těchto odpovědích se aktivují zúčastněné buňky a uvolňují velké množství zánětlivých hydrolytických enzymů, chemokinů, růstových faktorů a jiných cytokinů. Poté následuje akumulace lipidů v buňkách, proliferace hladkosvalových buněk a tvorba vazivové tkáně. Klíčovým dějem při vzniku aterosklerózy je dysfunkce endotelu a subendotelová retence lipoproteinů bohatých na cholesterol (Chepelenko 2003).

Ateroskleróza postihuje zejména velké a střední artérie a to obvykle v určitých predispozičních místech. To jsou nejčastěji větvení, zúžení a ohyby artérií.

I když při vzniku a rozvoji aterosklerózy jde o dlouhodobý vývoj, je možné v něm pozorovat období relativního klidu s obdobími rychlého rozvoje patologického procesu. Rychlost progresu závisí na působení rizikových faktorů. Čím je jich víc, tím dřív se ateroskleróza manifestuje i klinicky. Klinickým projevem postižení koronárních artérií je ischemická choroba srdeční (viz Obrázek č. 1).

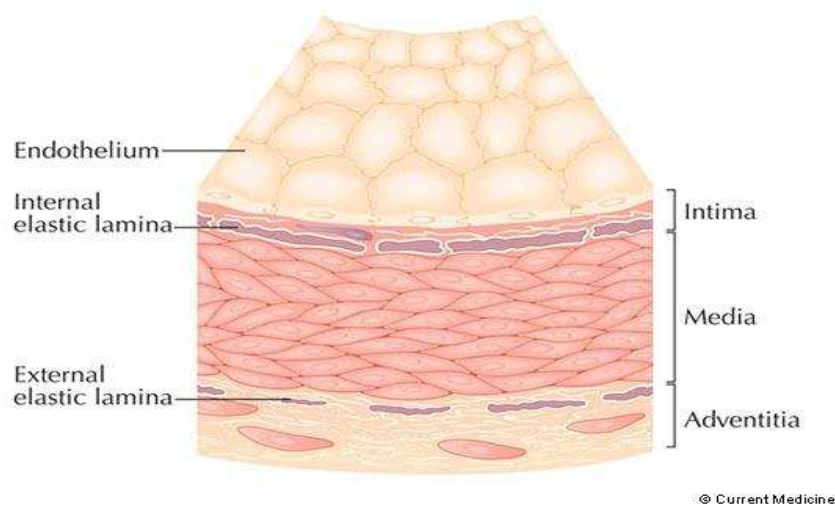
Obrázek č. 1: Vývoj sklerotického plátu a jeden z jeho možných klinických projevů



Zúžení karotických a mozkových artérií se manifestuje ischemickým atakem nebo náhlou cévní mozkovou příhodou s poruchou hybnosti a řeči. Klinickým projevem aterosklerózy v periferních tepnách dolních končetin je claudicatio intermittens a kritická končetinová ischemie s klidovými bolestmi, nekrózami a gangrény končetin (Yan et al 2003).

2.2.3 Stavba artérií a jejich změny při ateroskleróze

Obrázek č. 2: Skladba stěny cévní



Stěny krevních cév se obvykle skládají z několika vrstev (viz Obrázek č. 2). Vnitřní vrstvu, tuniku intimu, pokrývá vrstva endotelových buněk. Jsou těsně pospojované a tvoří tak překážku pro samovolný přestup všeho, co se nachází v cévách a tím regulují přestup různých látek a buněk z krevního řečiště do okolního tkaniva. Můžou se nacházet normálním (klidovým) nebo aktivovaném stavu. Buňky v klidovém stavu uvolňují faktory udržující jejich netrombogenní a neadhezivní povrch. V aktivním stavu uvolňují velké množství různých cytokinů, které se podílejí na průběhu zánětlivých reakcí a imunitních odpovědí (Schneider & Undeutsch 1967).

Pod endotelovou vrstvou se nachází lamina elastica interna. Ta je nejmohutnější ve středních a velkých artériích.

Střední cévní vrstva, tunika media, obsahuje hladkou svalovinu v jedné nebo v několika vrstvách. Mezi hladkosvalovými elementy se nacházejí v různém množství

elastická vlákna, kolagenní vlákna a proteoglykany. Zdrojem tohoto extracelulárního materiálu jsou hladkosvalové buňky.

Tunika adventicia tvoří vnější vrstvu cév. Od medie ji odděluje lamina elastica externa. Adventicia se skládá z kolagenových a elastických vláken, hladkosvalových buněk a fibroblastů. Media a adventicia spolu tvoří silnou, elastickou a kontraktilní část cév. Udržují napětí ve stěně cévy tak, aby krevní proud směřoval na periferii do malých cév a kapilár.

Při ateroskleróze je možné v cévách pozorovat dva druhy lézí. První pozorovatelnou změnou jsou tukové (lipoidní) proužky. Obvykle vznikají v místech ložiskového zvýšení obsahu lipoproteinů v intimě. Tato místní akumulace není výsledkem zvýšené propustnosti, ale vazby na makromolekuly extracelulárního matrixu, díky ní zůstávají lipoproteinové částice v intimě déle než obvykle. Tukové proužky jsou prvním stupněm rozvoje aterosklerózy. Je možné pozorovat zhrubnutí intimy a subendotelovou akumulaci buněk s vysokým obsahem lipidů (pěnové buňky). Pěnové buňky jsou většinou makrofágy pocházející z monocytů. Menší část pěnových buněk tvoří hladkosvalové buňky obsahující velké množství lipidů. Tukové proužky jsou nebezpečné v tom, že se mohou dále vyvíjet a progredovat (Velican 1981).

Fibrózní aterosklerotický plát je pevná bledošedá vyvýšenina v lumen cévy. Má typickou strukturu. Na straně do lumen cévy je fibrózní čepička. Její nesvrchnější část tvoří endotel, pod ním jsou proliferované hladkosvalové buňky, makrofágy, T-lymfocyty, pěnové buňky a extracelulární matrix. Na okrajích jsou nově vytvořené cévní kanálky. Pod fibrózní čepičkou je jádro plátu, které obsahuje nekrotický materiál složený ze zbytků buněčné hmoty, extracelulárních lipidů s cholesterolovými krystalky a menšího množství pěnových buněk (Raines & Ross 1993). V plátu nebo na jeho okraji se mohou tvořit štěrbin. Ty bývají místem, kde se začne tvořit trombus. Trombus může ucpat celý lumen cévy nebo se jeho částičky mohou přesunout periferněji, tedy embolizovat. Štěrbiny (fisury) na okraji plátu se mohou stát místem přestupu krve do nitra plátu. Při jeho ruptuře vzniká atherotrombóza. Přítomnost plátu se rovněž stává základem pro možné vytvoření aneurysma velké cévy.

2.2.4 Příčiny vzniku aterosklerózy

Příčiny vzniku se snaží vysvětlit několik teorií vycházejících zejména se známých rizikových faktorů. Mezi nejznámější teorie patří: teorie odpovědi na poškození endotelu,

teor. změněných molekul lipoproteinů, teor. oxidačního stresu, teor. klonové proliferace hladkosvalových buněk, teor. chronické infekce a autoimunitní odpovědi (Wissler 1992).

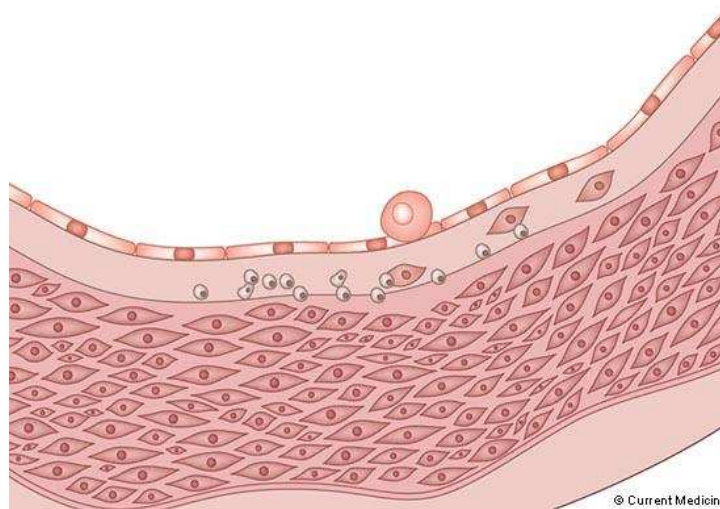
2.2.5 Funkce endotelu za fyziologických i patologických podmínek

Cévní endotel je metabolicky aktivní endokrinní orgán, který je zdrojem mnoha faktorů a mediátorů regulujících udržování normální hemostázy a homeostázy. Patří sem zejména vasodilatační látky (NO, PG₂), vasokonstrikční látky (endotelin-1, tromboxan A₂, PGH₂) a některé složky renin-angiotenzního systému), různé trombogenní a antitrombogenní faktory, fibrinolytické aktivátory a inhibitory, metabolity kys. arachidonové, lysozomové enzymy, volné radikály, adhezivní molekuly, cytokiny a neuropeptidy. Všechny tyto látky jsou biologicky velmi účinné a proto jich normální (neaktivovaný) endotel tvoří ve fyziologických množstvích a potřebném poměru (Vanhoutte 1996).

Pokud je endotel v aktivovaném stavu, tak jeho buňky začnou produkovat zvýšené množství mnohých výše zmíněných faktorů např. adhezních molekul (selektiny E a P, ICAM-1, VCAM-1), prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-1, IL-6), chemokinů, volných radikálů a dalších látek nezbytných pro realizaci obranného zánětu a které zároveň mohou vyústit až do poškozující zánětlivé reakce. Proto se předpokládá, že poškození endotelu nebo jeho abnormální aktivita (dysfunkce) může být základní změnou, která navodí vznik a rozvoj aterosklerotického procesu (Cannon 1998).

Dysfunkci endotelu je možné charakterizovat jako stav jeho poškození nebo abnormální funkce, který může vyvolat kompenzační opatření, ale i těžké poškození cév a okolní tkáně (viz Obrázek č. 3).

Obrázek č. 3: Dysfunkce endotelu - počátek aterosklerotických změn v tepnách



Ke kompenzačním odpovědím dysfunkčního endotelu patří zvýšená adhezivita pro leukocyty a trombocyty, zvýšená propustnost, změna antikoagulačních vlastností na prokoagulační a produkce prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů. Když tato primárně obranná zánětlivá reakce není schopna odstranit vyvolávající agens, pokračuje nekontrolovaně dál, přičemž stimuluje migraci a proliferaci hladkosvalových buněk, které se v místě zánětu promíchají s jinými buňkami. Pokud zánět stále pokračuje stejnou intenzitou, tak stěna artérie zhrubne, postupně se rozšíří, ale lumen zůstává stejný. Tomuto projevu se říká remodelace.

Základními zánětlivými buňkami v aterosklerotických lézích jsou makrofágy pocházející z monocytů a některé subpopulace T-lymfocytů, v počátečních stádiích i proliferující hladkosvalové buňky.

Všechny faktory vyvolávající dysfunkci endotelu nejsou známy. Předpokládá se, že mezi patří zejména: působení zvýšených koncentrací prozánětlivých cytokinů, růstových faktorů a jiných mediátorů, oxidační stres, některé infekční agens a jejich produkty a některé choroby (hypertenze, diabetes mellitus) (Vanhouste 1997).

Oxidační stres vzniká následkem zvýšení množství oxidantů vůči antioxidantům. Výsledkem je poškození buněk jejich struktur v místech nerovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty. Oxidanty jsou látky schopné od jiných látek odebrat elektron nebo elektrony a tím je oxidovat. Patří mezi ně volné radikály s nespárovaným elektronem (superperoxid, hydroxylový radikál), reaktivní molekuly odvozené od kyslíku (peroxid vodíku, kys. chlorná) nebo od dusíku (oxid dusnatý). Antioxidanty jsou látky, které inaktivují nebo omezují

působení oxidantů, obzvláště jejich poškozující účinky. Mezi antioxidanty patří např. enzymy, nízkomolekulární látky (tokoferoly, kys. askorbová) a některé proteiny (ferritin).

Oxidanty vznikají v organismu endogenně nebo působením exogenních faktorů. Endogenním zdrojem jsou fyziologické i patologické procesy. Mezi exogenní faktory patří zejména cigaretový kouř, ionizující záření, ultrafialové světlo, ozón a mnohé xenobiotické metabolity léčiv (Fuhrman et al 2002).

Mnohé z těchto oxidantů mohou vyvolat dysfunkci endotelu buď jeho přímým poškozením, případně aktivací zánětu, a nebo nepřímo prostřednictvím oxidace LDL a jiných fosfolipidů. Oxidované fosfolipidy aktivují mnoho genů zánětu, stimulují adhezní a prokoagulační aktivitu endotelu. Kromě toho se stávají autoantigeny a tím aktivují imunitní systém proti sobě. Výsledkem je nejen iniciace, ale i podpora rozvoje aterosklerózy.

Reaktivní intermediáty kyslíku jsou schopné aktivovat NF- κ B transkripční faktor, jehož přítomnost se zjišťuje v aterosklerotických lézích a který spouští transkripci mnoha genů zánětu v endotelových a hladkosvalových buňkách. Dalším účinkem reaktivních intermediátů kyslíku může být snížení vasodilatační schopnosti odstraňováním NO, který produkují endotelové buňky, stimulace proliferace hladkosvalových buněk a aktivace zánětlivého procesu prostřednictvím zvýšené tvorby prozánětlivých cytokinů a adhezních molekul zúčastněnými buňkami (Gudev 1996).

2.2.6 Ruptura plátu a mechanismy působící při ruptuře nestabilních plátů

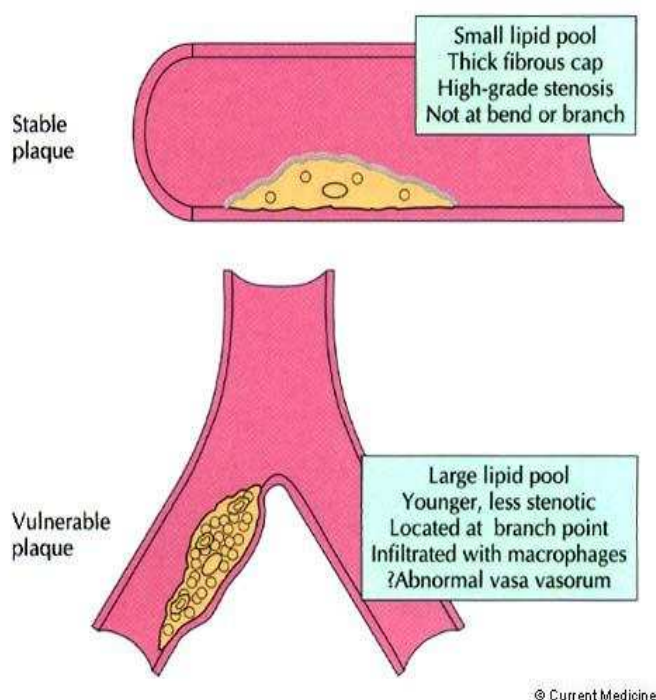
Nestabilní aterosklerotický plát může být příčinou různých forem nestabilní anginy pectoris, akutního infarktu myokardu nebo náhlé srdeční smrti. Ruptura aterosklerotického plátu je vždy doprovázena tvorbou trombu. Tvorba trombu nad aterosklerotickým plátem je proces primárně závislý na trombocytech a plazminu. Trombocyty adherují do míst ruptury plátu (oblasti bez cévního endotelu) a jsou rychle aktivovány prostřednictvím tkáňového faktoru a jiných mediátorů uvolněných z plátu. Nejdůležitějšími mediátory jsou Willebrandův faktor, trombin a kolagen. Současně s aktivací trombocytů dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin (Mallat et al 2001).

Vytvořený aterotrombotický plát zužuje průřez artérie, což má za následek lokální zvýšení rychlosti průtoku krve zúženým místem. Za stenózou naopak dochází ke zpomalování toku krve v důsledku rozšiřování průřezu artérie. Pokud je ukončení plátu dostatečně strmé,

potom se v tomto místě začnou tvořit turbulence. Z popsaných jevů vyplývá, že na plát nepůsobí po celé jeho ploše stejný tlak a to může mít negativní dopad na jeho stabilitu.

Ruptura plátu vzniká následkem zvýšení zranitelnosti plátu (viz Obrázek č. 4), což může záviset na velikosti a konzistenci ateromatózního jádra, tloušťce a integritě fibrózní čepičky, zánětlivých změnách ve fibrózní čepičce, snížení odolnosti fibrózní čepičky vůči místním hemodynamickým stresům a také na lokalizaci plátu (Palinski & Napoli 2002).

Obrázek č. 4: Srovnání stabilního a zranitelného plátu



Zvětšení objemu nekrotického jádra negativně působí na stabilitu plátu. Pokud jádro tvoří více jak 40% obsahu plátu, považujeme plát za nestabilní. Stabilita rovněž úzce souvisí s hladinou lipidů a jejich oxidačních produktů v cirkulaci.

Fibrózní čepička je struktura bránící trombogenní jádro vůči hemokoagulačnímu systému. Ztenčení tloušťky fibrózní čepičky vzniká porušením rovnováhy mezi produkcí a degradací kolagenu. Kolagen je zodpovědný za odolnost plátu vůči vnitřnímu napětí stěny cévy a také vůči tlaku krve v ní. Jeho produkce zase závisí na množství a aktivitě hladkosvalových buněk. Aktivitu těchto buněk regulačně ovlivňují mediátory zánětu, jako $\text{IFN-}\gamma$, který v nich inhibuje tvorbu kolagenu. $\text{IFN-}\gamma$ současně aktivuje makrofágy na uvolňování metaloproteináz, které odbourávají kolagen, proteoglykany a elastin v mezibuněčné hmotě. Při zeslabování fibrózní čepičky působí i další proteázy a antiproteázy. Výsledek závisí na posunutí jejich vzájemné rovnováhy. Z antiproteáz jsou nejdůležitější ty, které patří do skupiny serinů (Karapanayiotides & Devuyt 2006).

Nicméně základní příčinou snížení tvorby kolagenu a ztenčení fibrózní čepičky je snížený počet hladkosvalových buněk. Tloušťka fibrózní čepičky je různá v různých částech plátu. Nejtenčí většinou bývá v hraniční oblasti, kde plak přechází do okolní intimy. Ruptura se nejčastěji vyskytuje právě v této nejzranitelnější části plátu.

V hraniční oblasti nestabilních plátů se aktivují také žírné buňky, které sekretují proteolytické enzymy. Tyto enzymy dodatečně zvyšují proteolytickou kapacitu matrixových metaloproteináz.

Místo ruptury nemusí vždy souhlasit s místem největšího napětí fibrózní čepičky, ale může se vyskytnout v místě maximální aktivace makrofágů nebo v důsledku tření kalcifikované části s okolní nekalcifikovanou částí fibrózní čepičky při změnách tlaku. Na stabilitu plátu působí negativně náhlé opakující se změny krevního tlaku (z hypertenze do hypotenze), změny lokálního proudění krve v místě stenózy a přechod krve do širšího průsvitu cévy (Trostdorf et al 2005).

Spasmus cévy způsobí zmenšení průměru cévy a teoreticky sníží vnitřní napětí působící na plak. Vnější komprese však může stlačit plak a způsobit jeho rupturu. Spasmus také úzce souvisí s funkcí endotelu. Paradoxní vasokonstrikce při fyzické zátěži může být spouštěcím mechanismem ruptury.

Patofyziologickým mechanismem uzávěru cévy je kombinace ruptury plátu, trombózy v místě ruptury a vasokonstrikce. Výskyt ruptury může být závislý i na vnějších faktorech jako je hladina katecholaminů a jejich fluktuace během dne a ročního období, v důsledku fyzické zátěže a psychosociálních stresů. Zvýšená hladina katecholaminů způsobuje zvýšení krevního tlaku, zvýšení pulzace průtoku, vasokonstrikci a aktivaci trombocytů.

V trombotických segmentech koronárních artérií se zjistily dva odlišné typy ruptury plátů. Podstatou prvního z nich jsou hluboké trhliny přecházející přes fibrózní čepičku až do jádra bohatého na lipidy. Tato forma umožňuje krvi vstoupit do lipidového jádra, čímž se rychle rozšíří původní trhlina. Trombogenní materiál se dostává do lumen artérie, což vede k vytvoření masivního trombu. To ve většině případů vede úplné trombotické obstrukci artérie (Yuan et al 2002).

Druhým typem ruptury je povrchová eroze. Vyskytuje se v oblasti endotelového obnažení plátu, jež zůstává intaktní. Vznikají tak přepážkovité neokluzivní a na trombocyty bohaté tromby, typické pro pacienty s méně těžkými koronárními syndromy. Tyto tromby jsou potenciálním zdrojem embolizace distálního koronárního řečiště

V mnohých případech trombóza po ruptuře plátu probíhá subklinicky. Často se opakující subklinické ruptury plátů, trombózy a hemoragie do plátu tvoří pravděpodobně

patofyziologický mechanismus akcelerované aterosklerózy. Klinické důsledky masivní trombózy po ruptuře plátu jsou závislé na lokalizaci plátu, závažnosti a délce trvání totální okluze a také na přítomnosti kolaterální cirkulace. Detekce nestabilních plátů je jedním z cílů klinické medicíny (Jensen et al 2006).

2.2.7 Biomarkery zánětu a ateroskleróza

V rozsáhlých klinických studiích byl ověřen význam mnohých ukazatelů imunitního systému, popisujících zánětovou odpověď, jako biomarkerů s prediktivní vahou určující klinické komplikace aterosklerózy. Z mnohých vybíráme zvýšené hladiny prozáněťových cytokinů (IL-6, IL-1, IL-18, TNF), látek uvolňovaných degranulací buněk zánětu (myeloperoxidáza, metaloproteinázy), solubilní formy regulačních membránových molekul (sCD40L), solubilní formy adhezních molekul leukocytů i endotelových buněk (sVCAM-1, P-selektin, E-selektin, ICAM-1), fibrinogen či adipokiny nebo leptin (Nylaende et al 2006).

Uvedené biomarkery jsou tvořeny různými buněčnými typy, které se podílejí v patogenezi aterosklerózy. Zdrojem nejsou pouze buňky imunitního systému, ale i jiné buněčné typy, např. endotelové buňky, buňky hladké svaloviny, a především hepatocyty. Právě játra jsou nejvýznamnějším zdrojem bílkovin akutní fáze. Ty se zde tvoří po ovlivnění prozáněťovými cytokiny, zvláště IL-6. Z bílkovin akutní fáze má nepochybně největší význam sérový C-reaktivní protein (sCRP). Ten je v každém ohledu nejvýznamnějším markerem aterosklerózy. C-reaktivní protein je totiž prokazatelný v aterosklerotických plátech, kde se váže na chemicky modifikované LDL lipoproteiny. Svou vazbou stimuluje aktivaci komplementové kaskády a zesilují akumulaci monocytárních elementů. Navíc CRP snižuje tvorbu oxidu dusnatého v endotelových buňkách a zesiluje tvorbu chemokinů v buňkách hladké svaloviny a endotelových buňkách. Pokusem bylo prokázáno, že infuze CRP dobrovolníkům indukuje výrazné prozáněťové a protrombotické aktivity. Z těchto údajů vyplývá, že případná neutralizace biologických vlastností CRP by mohla mít terapeutický potenciál (Egorova 2002)

2.2.8 Genetická dispozice

Charakteristiky každého jedince jsou určovány jeho genetickou dispozicí podmíněnou polymorfismem mnohých genů. Genová proměnlivost určuje spolu s vlivem vnějších podmínek i konečnou individuální imunitní reaktivitu. Zaměříme se na přehled důsledků genetické proměnlivosti receptorů TLR na vznik a rozvoj aterosklerózy. Nejvíce je známo o substituci kyseliny asparágové za glycin (D299G) v molekule pro TLR-4. Osoby s polymorfismem D299G mají snížené riziko rozvoje aterosklerózy. Je u nich prokazatelná nižší schopnost produkovat prozáněťové cytokiny, např. IL-6, ale i fibrinogen a solubilní adhezní molekulu sVCAM-1 (Doherty et al 2006).

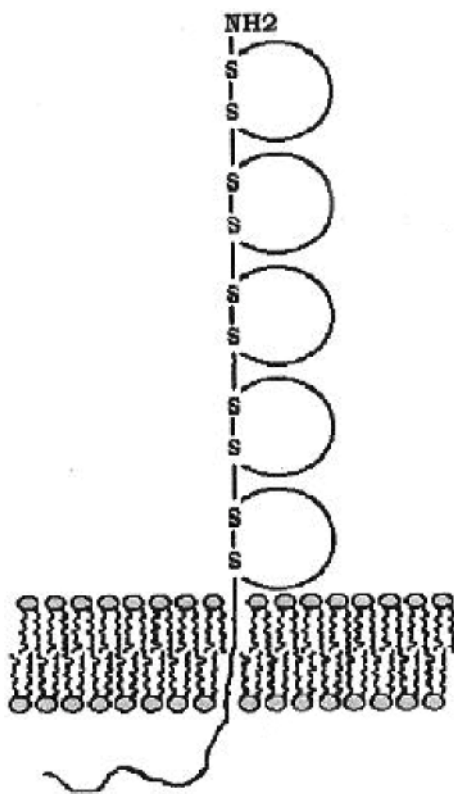
Problematika polymorfismu receptorů TLR, ale také polymorfismu v genu pro molekuly IgG je v kardiologii studována mimořádně aktivně. Získané výsledky poskytují další doklady pro hypotézu, že na aterosklerotický proces je třeba pohlížet jako na záněťový proces, který může být indukován infekčními podněty i mnohými podněty neinfekční povahy. Na rozvoj záněťového procesu ústícího v aterosklerózu mají nepochybně zásadní vliv především signální systémy přirozené imunity. U disponovaných lidí bude zřejmě možné předcházet rozvoji onemocnění například důslednou eliminací infekčních agens s potenciálním podílem na imunopatogenezi aterosklerózy. Je možné je rovněž ovlivnit manipulací s jejich lipidovým metabolismem a záněťovou reakcí, např. pomocí statinů. Působení statinů je mimořádně pleiotropní. Kromě ovlivnění lipidového metabolismu mají výrazné imunomodulační účinky. Ovlivňují jak složky přirozené, tak specifické imunity (Krejsek et al 2005)

2.3 Buněčné adhezní molekuly

Buněčné adhezní molekuly jsou exprimovány na povrch všech tkání organismu. Účastní se jak fyziologických (hojení ran, obnova tkání, buněčný růst), tak patologických (účast na interakci mezi složkami imunitního systému) procesů v organismu. Můžeme je rozdělit na 4 základní skupiny, což jsou imunoglobulinová skupina, selektiny, integrity a kadheriny (Jang et al 1994). Podrobněji se budu věnovat pouze imunoglobulinové skupině, která je v rámci této diplomové práce nejdůležitější .

2.3.1 Imunoglobuliny

Obrázek č. 5: Struktura imunoglobulinové adhezivní molekuly



Superrodina imunoglobulinů zahrnuje širokou škálu molekul s rozmanitými Ig doménami (viz Obrázek č. 5). Ovšem jen některé imunoglobuliny mají souvislost s aterosklerózou. Patří mezi ně zástupci vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), platelet cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) a mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1). ICAM-1 je exprimován

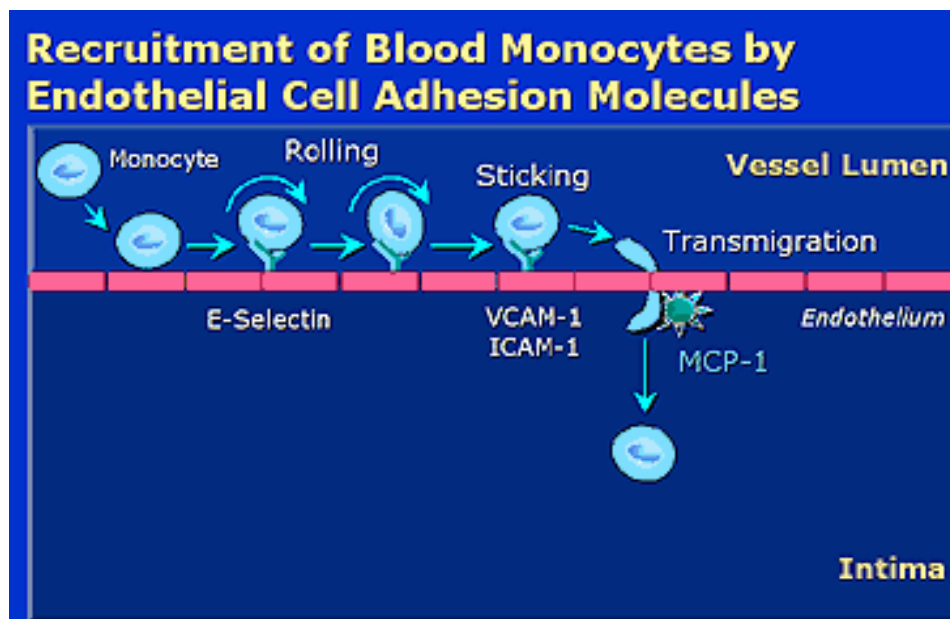
různými typy buněk, ale endoteliální buňky jeho exprese regulují (Mareckova et al 1999), čímž se projeví nápadná nestejnorodost jeho exprese mezi cévními řečišti (Joseph-Silverstein & Silverstein 1998). Orgány s vysokou směrodatnou expresí ICAM-1 (např. plíce) se po stimulaci cytokiny projevují menšími přírůstky v ICAM-1 expresi než orgány s nízkou směrodatnou expresí (např. srdce). Rozpustná isoforma ICAM-1 může být zjištěna i v séru při významném zvýšení hladin v určitých stádiích nemoci (Bourdillon et al 2000).

VCAM-1, jehož exprese na neaktivovaných endoteliálních buňkách je velmi nízká až zanedbatelná, je významně up-regulován po aktivaci cytokiny (Nakashima et al 1998). Tento CAM zprostředkovává adhezi lymfocytů a monocytů v zanícených částech cév. Ukazuje se, že VCAM-1 je exprimován především v oblastech výskytu lézí, zatímco ICAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami i mimo aterosklerotickou lézi (Ley & Huo 2001). PECAM-1 je exprimován hlavně na trombocytech, lymfocytech a endoteliálních buňkách v místech intercelulárních spojů. PECAM-1 se podílí na homofilních i heterofilních buněčných interakcích (Watt et al 1995). Expese cytokínů nemění PECAM-1 expresi v místním cévním řečišti, a tudíž může být použit jako marker pro detekci endoteliálních buněk bez ohledu na jejich funkční stav. (Rosenblum et al 1996). Slizniční MAdCAM-1 je exprimován převážně na endoteliálních žilkách Peyerových plaků, na žilkách v tenké střešní lamině propria, na okrajových záhybech sleziny a na důležitých endoteliálních žilkách embryonálních lymfatických uzlin.

2.3.2 Fyziologické funkce CAM

Ačkoliv endoteliální buňky ve všech segmentech cévního systému (artérie, kapiláry a žíly) mohou indukovat expresi CAM, primární ohnisko zánětlivé reakce je u postkapilárních žilek. V tomto segmentu je exprese největší hlavně díky hustotě endoteliálních CAM. Díky pozorování leukocytů „in vivo“ se vytvořil model leukocyto-endoteliálních buněčných interakcí, podle něhož je prostup leukocytů do subendoteliálních prostor rozčleněn do 3 na sebe navazujících fází (viz Obrázek č. 6): kutálení leukocytů po endotelu, pevná adheze a transmigrace leukocytů do subendoteliálních prostor (Paiker et al 2000).

Obrázek č. 6: Prostup leukocytů do subendoteliálního prostoru pomocí adhezních molekul



K založení adhezních interakcí leukocytů s endoteliálními buňkami, musí cirkulující leukocyty nejprve vybočit z hlavního krevního proudu směrem k cévní stěně. Dále dojde ke zpomalení pohybu leukocytů a jejich kutálení po endotelu. Tento děj je zprostředkovan především slabými interakcemi s nízkou afinitou mezi lektínovými receptory a selektiny. (Joseph-Silverstein & Silverstein 1998). Ačkoliv se i jiné CAM (př. VLA-4, VCAM-1, MAdCAM-1 a integriny patřící do podrodiny β_7) účastní první fáze, jejich kvantitativní význam pro tento děj zůstává nejasný. Slabými interakcemi připoutané leukocyty jsou poté vystaveny nízkým koncentracím chemoatraktantů/mediátorů zánětu, které vedou k aktivaci leukocytů a jejich následné integrin-Ig dependentní adhezenci se současnou down-regulací L-selektinu. Leukocytární aktivace je rovněž v úzké spojitosti se zvyšující se afinitou integrinů, která může být vyvolána chemokiny, bakteriálními peptidy, destičkovými aktivačními faktory (PAF) a leukotrieny B4 (Khan et al 1995) V další fázi dochází k vytvoření pevných vazeb mezi leukocyty a endoteliálními buňkami. V poslední fázi, transendoteliární migrace leukocytů, buňky leukocytu a endotelu neustále zakládají nové adhezivní spoje v migračním čele, zatímco se snižují adhezivní interakce na konci. V této fázi je velmi důležitá adhezivní molekula PECAM-1, která se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk. Interakce se uskutečňuje mezi PECAM-1 molekulou na endotelu a PECAM-1 molekulou na leukocytech.

Nedávné studie dokázaly, že model leukocyto-endoteliální buněčné interakce rovněž platí ve větších cévách v protiproudu z postkapilárních žilek (Jang et al 1994).

2.3.3 Regulace endoteliální CAM exprese

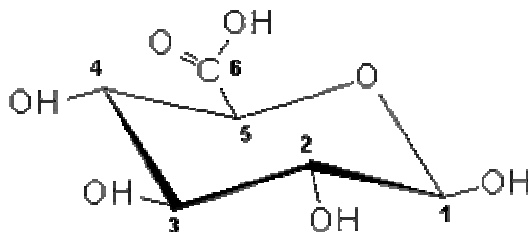
Koordinovaná migrace leukocytů na místo zánětu je do značné míry řízena časovým průběhem a velikostí endoteliální CAM exprese. Rychlé doplňování kutálejících se leukocytů může plynout z L-selektivní aktivace leukocytů (zajišťuje vazbu leukocytů na endotel v místě zánětu) a mobilizace přeměněného P-selektinu endoteliálním buněčným povrchem. Leukocytární přilnavost může také vzniknout rychle, jako následek β_2 -integrinové exprese nebo aktivace kutálejících se leukocytů, jež umožní buňkám vazbu na endoteliálními buňkami exprimovaný ICAM-1 (Marui et al 1993).

Vysoké procento endoteliálních CAM nutných k tomu, aby zanícenou tkáň prostupovalo velké množství leukocytů, je závislých na syntéze de novo. Tuto na transkripci závislou syntézu různých endoteliálních CAM, včetně ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1, E-selektinu a P-selektinu mohou přivodit rozmanité bakteriální toxiny, cytokiny, a oxidanty. Maximální exprese těchto CAM je zaznamenána mezi 3 a 6 hodinou po prvotním vystavení organismu zánětlivému stimulu (Libby & Li 1993).

Do regulace endoteliální CAM exprese jsou zapojeny základní dva transkripční faktory, NF- κ B a AP-1 (Brasen et al 2003). Vazebná místa pro NF- κ B byly rozpoznány v promotorových částech genů pro E-selektin, VCAM-1 a ICAM-1, zatímco vazebné místo pro AP-1 bylo lokalizováno v promotorové části genu pro ICAM-1 a E-selektin. (Hernandez-Presa et al 2003). V pokusech in vivo a in vitro bylo prokázáno, že inhibitory NF- κ B a AP-1 aktivace oslabily CAM expresi podněcenou cytokiny, lipopolysacharidy nebo oxidanty. Tyto objevy umožnily kontrolovat na transkripci závislé buněčné jevy, které iniciují doplňování leukocytů na místo zánětu tím, že poskytly logický výklad pro zacházení s NF- κ B nebo AP-1 systémem.

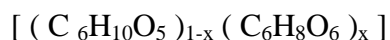
2.4 MDOC (mikrodisperzní oxidovaná celulóza)

Obrázek č. 7: Strukturální molekula oxidované celulózy



Základní funkční jednotkou oxidované celulózy je kyselina anhydroglukuronová. Její strukturální vzorec je tvořen tak, že atomy C uvnitř pyranosového kruhu jsou označeny čísly od 1 do 6 dle konvenčního číslování (Jelinkova et al 2002).

Oxidovanou celulózu je možné charakterizovat jako polyanhydroglukózu, která vzniká selektivní oxidací primární alkoholové skupiny na 6. uhlíku na skupinu karboxylovou. Tudíž může být všeobecně brána i jako náhodný kopolymer složený z anhydroglukózových jednotek a jednotek kyseliny anhydroglukuronové. Tomu odpovídající molekulární vzorec má tuto podobu:



Je pochopitelné, že oxidovaná celulóza není v plné míře popsána výše uvedeným vzorcem. Pochází z nehomogenní přírodní suroviny, která je selektivně oxidována na C₆ atomu uhlíku. Výsledný produkt bude rovněž obsahovat další látky vzniklé jinými oxidačními cestami. Např. mohou být zoxidovány sekundární alkoholické skupiny a také některé glukosové kruhy se po otevření mohou stát cílem dalších oxidací.

MDOC je tedy polymer glukuronové kyseliny. Vyskytuje se ve formě Ca/Na soli rozpustné ve vodě, přičemž Ca sůl vytváří pouze koloid.. Metabolizuje se na glukuronovou kyselinu, jejíž oligomery přecházejí pravděpodobně do krve. Glukuronová kyselina samozřejmě má detoxikační vlastnosti, zkoumá se její vliv na cévní stěnu (Nachtigal et al 2006).

2.5 Myší model aterosklerózy

2.5.1 Vývoj myšího modelu

Asi před 10 lety se některé laboratoře pokusily vyvinout aterosklerózu u myší, aby tím pomohly k rozpoznání potenciálních modifikátorových genů. Myši jsou velmi odolné vůči ateroskleróze. Při nízkotučné a nízkocholesterolové dietě byla jejich hladina cholesterolu pod 2,6 mmol/l. Tento údaj zahrnoval z velké části antiaterogenní HDL frakci, takže nedocházelo ke vzniku lézí ani k jejich rozvoji. Ovšem, když byly myši krmeny stravou vysokocholesterolovou a s vysokým obsahem tuku, který obsahoval také kyselinu cholovou, jejich cholesterolové hladiny vzrostly a HDL frakce již většinu cholesterolu netvořila. Po mnoha měsících na této dietě se u myší vytvořilo několika vrstev pěnových buněk v ohraničeném subendoteliálním prostoru v blízkosti aortální záklopky (Paigen et al 1987).

Ačkoliv byl zpočátku tento model nadějný, musel potýkat s dvěma problémy. První problém byl rozpor v lokalizaci a rozvoji lézí u člověka a u myší. Zatímco u člověka se léze vyskytují hlavně v místech větvení hlavních cév a dále se vyvíjejí do stadia fibrózního plátu, myší léze jsou malé, vyskytují se pouze v oblasti aortálního oblouku a dále se nevyvíjejí. Druhým problémem bylo, že dieta nutná k vytvoření lézí nebyla fyziologická, protože obsahovala 10-ti až 20-ti násobek cholesterolu stravy západního typu a navíc s nepřírozenou potravní složkou jako je kyselina cholová. Tato strava způsobila chronický zánětlivý stav pouze u kmene myší C57BL/6, což zvýšilo předpoklad, že genetická rozdílnost mezi jednotlivými kmeny myší se vztahuje spíše na stravu vyvolaný zánět než na aterosklerózu (Nishina et al 1993).

V roce 1992, byly genetickou modifikací vytvořeny myši bez apolipoproteinu E. ApoE je tvořen hlavně v játrech. Je povrchovou složkou lipoproteinových částic a ligand, které jsou rozpoznávány receptory a tím slouží k odstranění rozpoznaných lipoproteinů z organismu. Myši s chybějícím ApoE mají zpožděnou clearance lipoproteinů a na nízkocholesterolové a nízkotučné dietě jejich hladina cholesterolu dosahuje 10,3 až 15,5 mmol/l, což je následek hromadění chylomikronů, VLDL zbytků obohacených esterifikací a volného cholesterolu (Reddick et al 1994). Je pozoruhodné, že se u těchto myší v cévním prostoru neobjevují pouze tukové proužky, ale také rozšířené fibrózní pláty typické pro lidskou aterosklerózu (Piedrahita et al 1992). Léze vznikají na bázi aorty, v menším oblouku hrudní aorty; v místech větvení karotid, v mezižeberních, mezenteriálních, renálních a

iliakálních artériích; a také v proximálních koronárních, karotických, femorálních, subklaviálních a brachiocefálních tepnách. Poškození začíná v 5-6 týdnu věku, kdy se monocyty přichytnou na endotelium v oblasti náchylné k poškození a pokračují transendoteliární migrací. Tukové proužky se začnou objevovat v desátém týdnu, pěnové buňky a vřetenovité hladkosvalové buňky v intimě se objeví v patnáctém týdnu. Fibrózní pláty se začnou vyvíjet po dvacátém týdnu. Plát se skládá z nekrotického jádra pokrytého fibrózní čepičkou. Nejsvrchnější vrstvu čepičky tvoří endotel, pod ním jsou hladkosvalové buňky, pěnové buňky, extracelulární matrix...atd. V okolí fibrózní čepičky jsou elastická vlákna a kolagen. U starších myší se fibrózní pláty dále vyvíjejí. U některých pokročilých poškozeních se setkáme s částečnou destrukcí základních buněk medie s občasným výskytem výdutí (aneurysmat), u jiných můžeme objevit kalcifikaci ve vazivové tkáni. Rozsáhlé fibrózní bujení může zúžit cévní průsvit nebo dokonce způsobit cévní okluzi. Komplikované poškození jako je trombóza nebylo zjištěno (Quarfordt et al 1995).

Chylomikrony a VLDL remnanty (zbytky) jsou aterogenními stimuly u ApoE deficitních myší. Buněčný povrch LDL receptorů rozpozná ApoB na LDL a ApoE na IDL a, během průběhu s vysokou afinitou vazby a internalizací, vyjme tyto lipoproteiny z cirkulace. Myši bez LDL receptorů (LDL receptor-deficitní) byly vytvořeny k navození vysokých hladin těchto aterogenních lipoproteinů. (Piedrahita et al 1992) Při nízkocholesterolové a nízkotučné dietě mají tyto myši hladinu cholesterolu v plasmě dvakrát větší než normální myši, většinou se zvýšenou IDL a LDL lipoproteinovou frakcí. Tato odchylka v lipoproteinové systému je však nedostatečná k vyvolání aterosklerózy. Když však byly LDL receptor-deficitní myši krmeny stravou s velkým množstvím cholesterolu a s obsahem kyseliny cholové, hladiny cholesterolu vzrostly na více než 38,8 mmol/l a způsobily rozsáhlé léze s lipoidními proužky. Léze byly složeny z nekrotických jader obsahujících lipidy a v některých lézích byly pozorovány i pěnové buňky. Fibrózní pláty nebyly nalezeny. LDL receptor-knockoutované myši byly krmeny západním typem stravy a jejich cholesterolové hladiny vzrostly na 31,0 mmol/l, což způsobilo léze obsahující převážně lipoidní proužky. (Gudev 1996).

2.6 Statiny

Problému vysoké hladiny cholesterolu v současnosti čelí více než 25 milionů lidí. Statiny patří v kardiologii mezi nejpoužívanější léky a v současné době jsou považovány za nejúčinnější hypocholesterolemika (Vaughan et al 2000). Plazmatická hladina cholesterolu při léčbě statiny klesá až o 35%, současně dochází k mírnému vzestupu HDL-cholesterolu a poklesu hladin triglyceridů. Jejich význam ale nespočívá jen ve snížení hladiny cholesterolu, ale především ve snížení mortality a zlepšení prognózy u pacientů s kardiovaskulární nemocí. Ukázalo se, že léčba statiny chrání před infarktem myokardu i ty pacienty, kteří mají normální hladinu cholesterolu v plazmě, a u nichž protektivní působení nemůže být založeno na snížení hladin lipidů (Auer et al 2002).

Statiny jsou účinné kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu – HMG-CoA reduktázy. Což má za příčinu snížení syntézy cholesterolu v jaterních buňkách. Pokles cholesterolu v játrech pak vede ke zvýšenému vychytávání LDL a prekursorů LDL z plasmy, čímž dochází k rychlejšímu odstraňování LDL-cholesterolu z oběhu. Statiny také vedou k inhibici syntézy apolipoproteinu B v játrech a snižují sekreci lipoproteinů s vysokým obsahem triglyceridů (McFarlane et al 2002) ..

Statiny jsou ale rovněž léky, které mohou mít závažné komplikace. Opatrnosti je třeba dbát zejména při kombinaci s jinými léky jako jsou fibráty, niacin, cyklosporin, erytromycin a itrakonazol. Zvyšují také plazmatické koncentrace kumarinů (LaRosa 2001). Jejich riziko můžeme omezit správnou indikací, opatrností při užívání s fibráty či jinými léky. Nezbytná je pravidelná kontrola jaterních testů a u pacientů se symptomy svalového postižení také kreatin kinázy. Při dodržování těchto pravidel efekt statinů vysoce převyšuje jejich riziko (Vaughan et al 1996).

V posledních letech se zkoumají i další účinky statinů. Patří mezi ně např. snížení cytotoxicity, omezení zánětlivé reakce, onkoprotektivní účinek navozený apoptózou některých typů nádorových buněk a zlepšení funkcí endotelu. Statiny také omezují tvorbu trombů a tím snižují riziko tromboembolické nemoci, mění aktivitu enzymů podílejících se na tvorbě anuloиду β a příznivě tím ovlivňují průběh Parkinsonovy choroby (Farmer 2000). Podle mnohých studií se rovněž ukazuje, že statiny mají protektivní vliv na vznik Alzheimerovy choroby. Mechanismus tohoto působení není zatím zcela objasněn. Může k tomu docházet ovlivněním cholinergního systému prostřednictvím snížení syntézy ApoE (Comparato et al 2001).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit možný benefit podávání kombinace MDOC a atorvastatinu na vybrané parametry lipidů a markerů zánětu u apoE deficientního kmene aterosklerózy. Byly sledovány hladiny krevních lipidů. Pro zobrazení exprese ICAM-1 a VCAM-1 byly využity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci jejich exprese stereologické metody.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samci kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}), vážící 15–20 gramů, byli laskavě poskytnuti Prof. Polednem (IKEM, Praha, Česká Republika), byli ustájeni v SEMEDu (Praha, Česká Republika).

4.1 Zvířata a předeepsaná dieta

Všechny myši byly v 5 týdnech života ostaveny od matky, náhodně rozděleny do 2 skupin.

ApoE deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení aterogenní dietou s obsahem 1,25% cholesterolu po dobu 4 týdnů (kontrolní skupina). V MDOC skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 50 mg/kg MDOC denně. V atorvastatinové skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 10 mg/kg atorvastatinu denně. V kombinační atorvastatin MDOC skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 10 mg/kg atorvastatinu a 50 mg/kg MDOC denně.

Každá z myší v atorvastatinové skupině byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g 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 euthanasie 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 média (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při – 80°C.

4.2 Biochemická analýza

Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické

analýzy (cholesterol v 510 nm, triglyceridy, v 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

4.3 Imunohistochemie

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce (7 μm) na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, které byly předem upravené 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 15 minutovém 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 jednu hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do roztoku 3% H_2O_2 (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (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 Laboriem). K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách) a sklíčka zamontována do eukittu.

Byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse VCAM-1 – zředění 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse ICAM-1 – zředění 1/200

Všechny protilátky byly zakoupeny ve firmě BD Pharmingen (California, USA)

Pracovní postup imunohistochemického barvení

1. nechat uschnout řezy	60 minut
2. fixace aceton (uschovaný v – 20 stupních)	15 minut
3. usušit	15 minut
4. PBS	10 minut
5. 10% zvířecí serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	30 minut
6. inkubace s avidin D	15 minut
7. oplach v PBS	5 minut
8. inkubace s biotinem	15 minut
9. PBS	oplach
10. primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
11. PBS	2x5 minut
12. 10% serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	15 minut
13. sekundární protilátka (+ mouse serum v PBS)	30 minut
14. PBS	5 minut
15. 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
16. PBS	2x5 minut
17. ABC komplex elite	30 minut
18. PBS	5 minut
19. DAB (podle návodu)	nutno určit čas
20. destilovaná voda	oplach
21. aceton	oplach
22. aceton-xylen (10:1)	3 minuty
23. aceton-xylen (1:10)	3 minuty
24. 3x xylen	2 minuty
25. Eukitt – montování krycího sklíčka	

4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie

Plochy endoteliální exprese ICAM-1, VCAM-1 a PECAM-1 byly kvantifikovány pomocí stereologických metod (Nachtigal et al 2004). Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7µm (0,385mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez byl pro každé

imunohistochemické barvení vybrán náhodně, a pak se vybral každý jedenáctý řez, takže bylo pro každé barvení použito pět řezů ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 200 průsečíků mezi body sítě a aterosklerotickým plátem na jednu cévu (Gundersen et al 1988). Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P$$

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

Protilátka PECAM-1 byla použita jako marker přítomnosti endotelu. Takže plocha exprese VCAM-1 v endotelu byla vztažena k expresi PECAM-1 a vypočítána jako:

$$estP = \frac{area(x)}{area(PECAM)} * 100\%$$

kde x je plocha VCAM-1 v endotelu a plocha $PECAM$ je plocha PECAM-1 v endotelu.

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

4.5 Statistická analýza

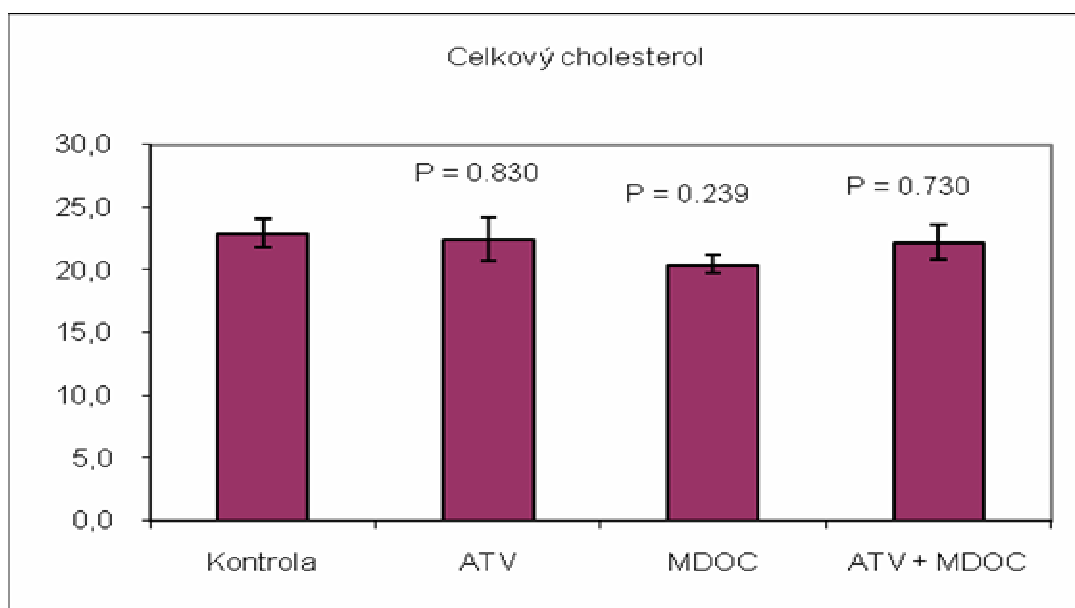
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru GraphPad Prism verze 4.0. Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$ kde $\alpha = 0,05$.

5 VÝSLEDKY

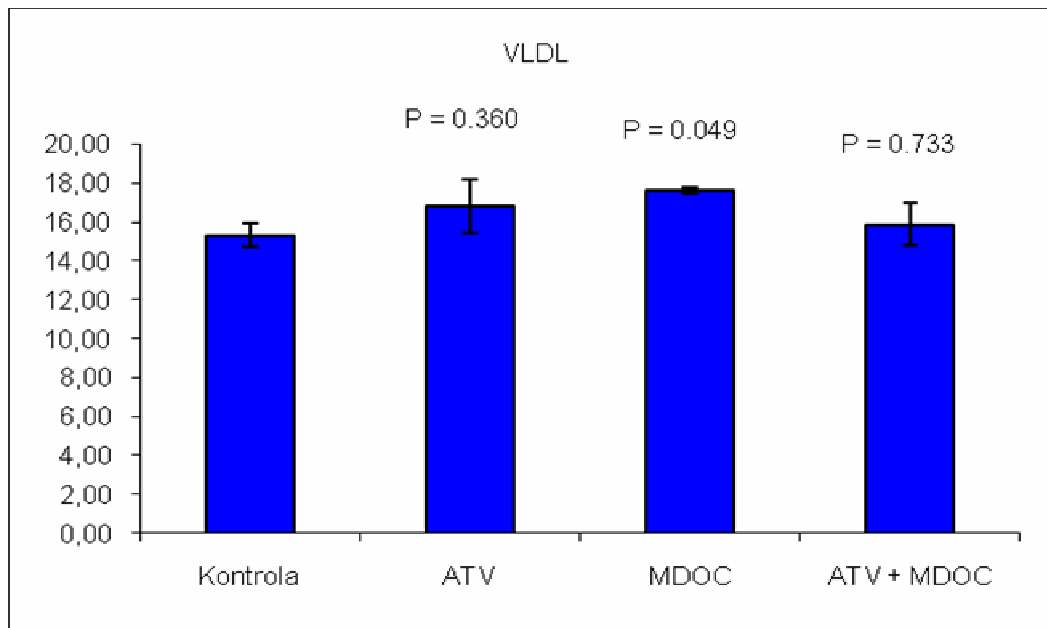
5.1 Biochemická analýza

Výsledky biochemické analýzy neprokázaly vliv atorvastatinu, MDOC ani jejich kombinace na hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu (viz Obrázek č. 8). Naproti tomu LDL cholesterol byl snížen u všech 3 experimentálních skupin ve srovnání se skupinou kontrolní (pouze aterogenní dieta). Podávání MDOC navíc vedlo ke zvýšení hladiny HDL cholesterolu nicméně tento benefit nebyl zjištěn ani po podávání atorvastatinu ani po jeho kombinaci s MDOC.

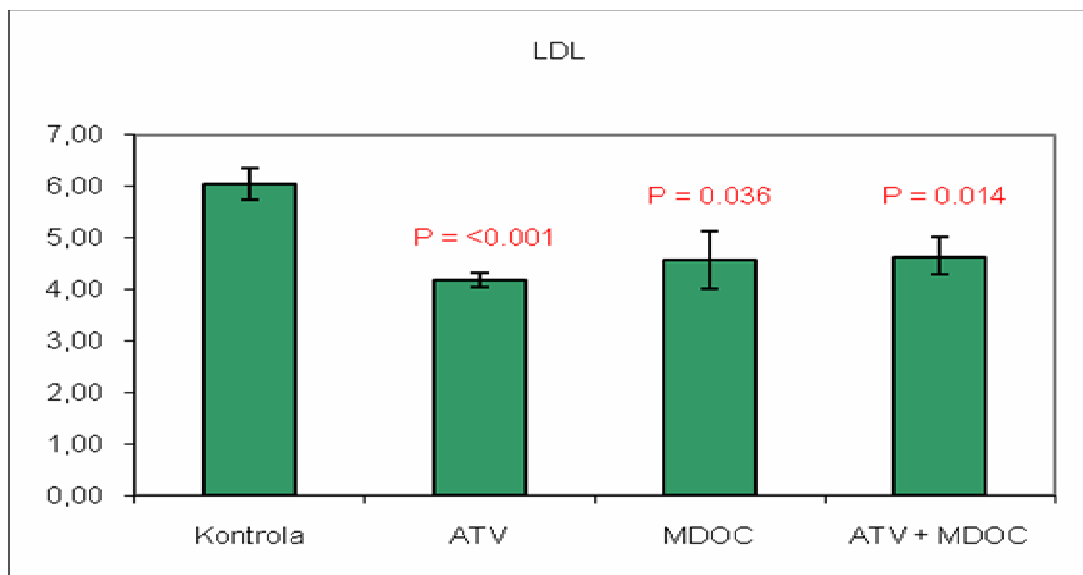
Obrázek č. 8: Hladiny celkového cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou.



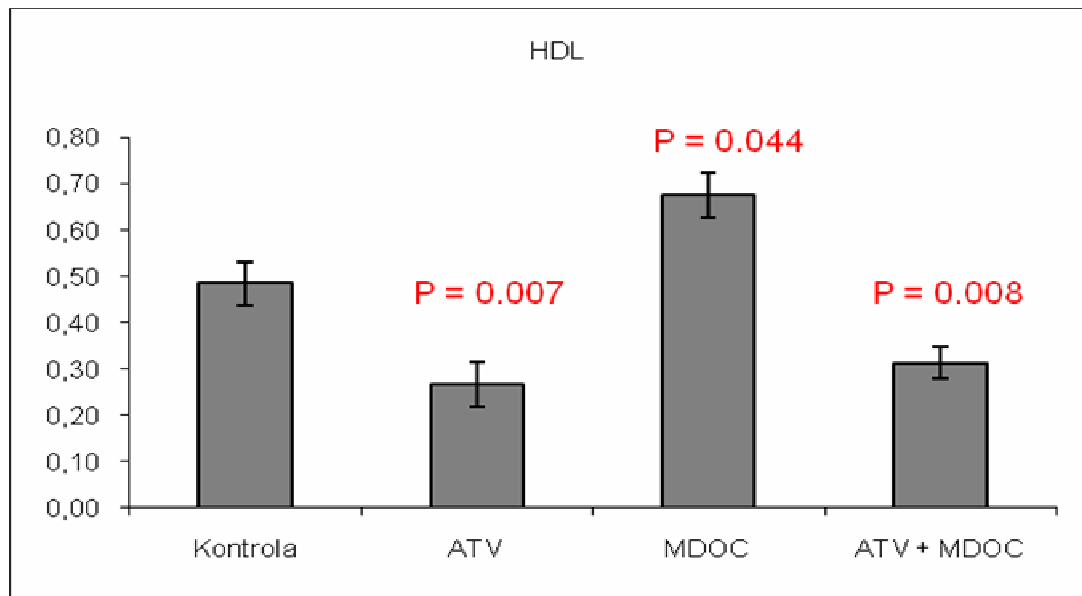
Obrázek č. 9: Hladiny VLDL cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou.



Obrázek č. 10: Hladiny LDL cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Statisticky významný pokles byl pozorován po podání atorvastatinu, MDOC i jejich kombinaci a to vše ve srovnání s kontrolní skupinou.



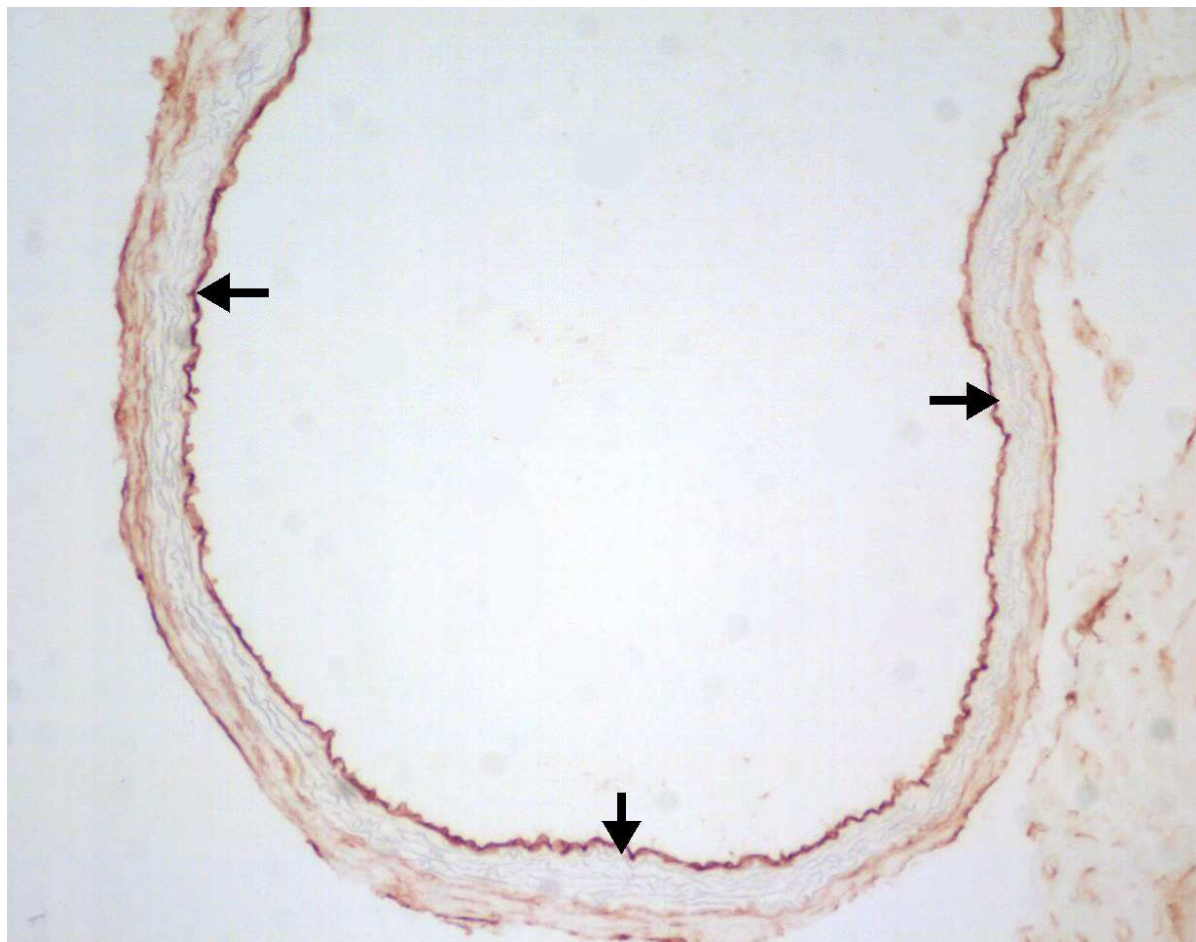
Obrázek č. 11: Hladiny HDL cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Statisticky významný nárůst HDL cholesterolu byl pozorován pouze u MDOC skupiny. Naopak u atorvastatinové a kombinační skupiny byl pozorován statisticky významný pokles HDL cholesterolu.



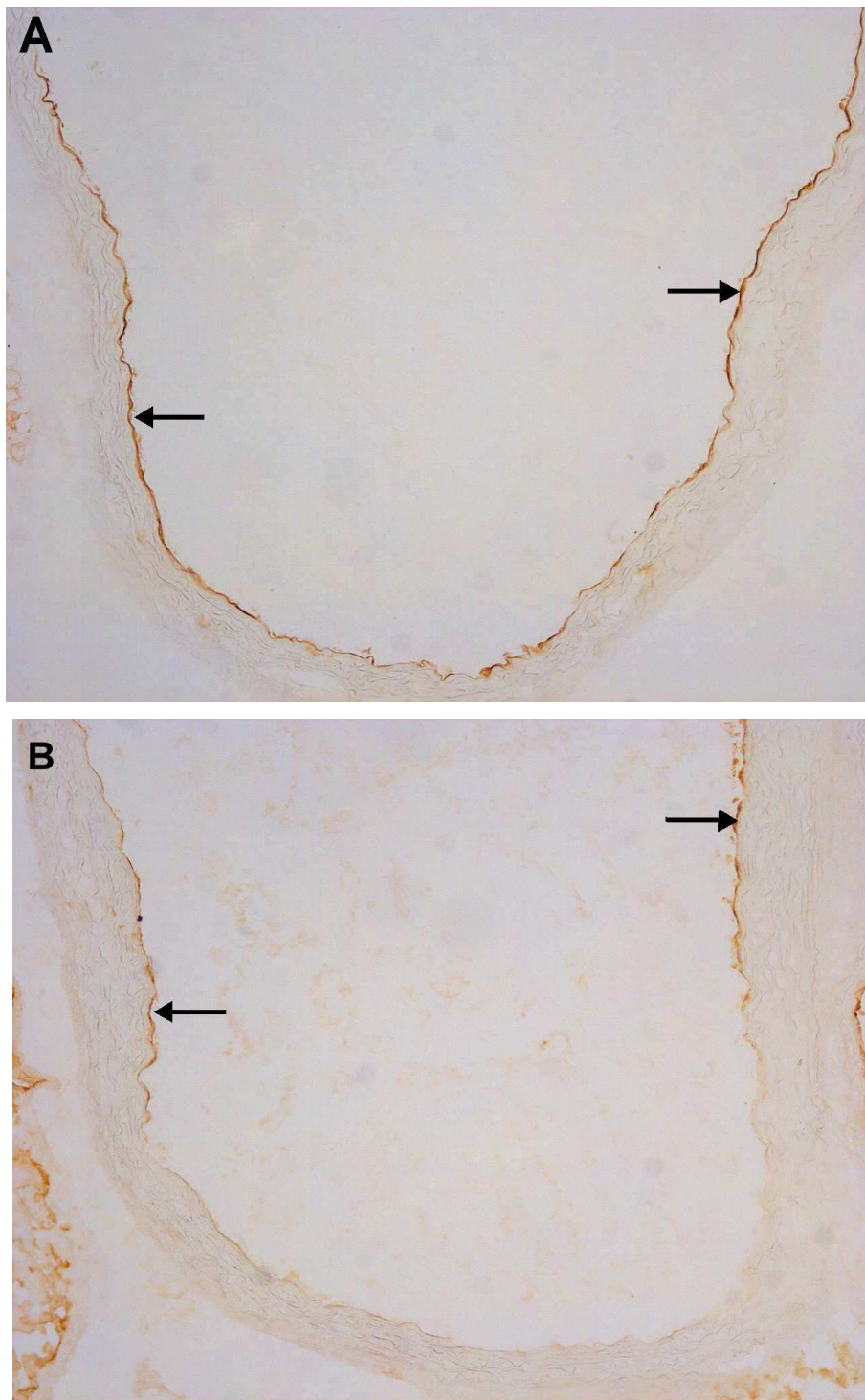
5.2 Imunohistochemická detekce VCAM-1 a ICAM-1 v aortálním oblouku

U žádné z experimentálních skupin nebyl pozorován výskyt aterosklerotických lézí. Expres obou markerů byla tedy pozorována pouze v cévním endotelu. Expres VCAM-1 nebyla výrazně změněna u žádné experimentální skupiny ve srovnání se skupinou kontrolní (viz Obrázek č. 12). Expres ICAM-1 byla vizuálně nižší u skupiny, které byla podávána kombinační dieta atorvastatin + MDOC ve srovnání s kontrolní skupinou (viz Obrázek č. 13).

Obrázek č. 12: Imunohistochemické barvení VCAM-1 (šípky) ukazující jeho endoteliální expresi v aortálním oblouku u myši z kontrolní skupiny. U žádné experimentální skupiny nebyly pozorovány aterosklerotické pláty. Ve všech skupinách byla tedy pozorována pouze endoteliální exprese VCAM-1 přičemž intenzita barvení byla velmi podobná ve všech experimentálních skupinách i ve srovnání se skupinou kontrolní. Zvětšení 100x.



Obrázek č. 13: Imunohistochemické barvení ICAM-1 ukazující na pokles exprese ICAM-1 v aortálním oblouku u skupiny léčené kombinací atorvastatin+MDOC (B) ve srovnání s kontrolní skupinou (A). Exprese ICAM-1 nebyla u dalších experimentálních skupin změněna ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení 100x.



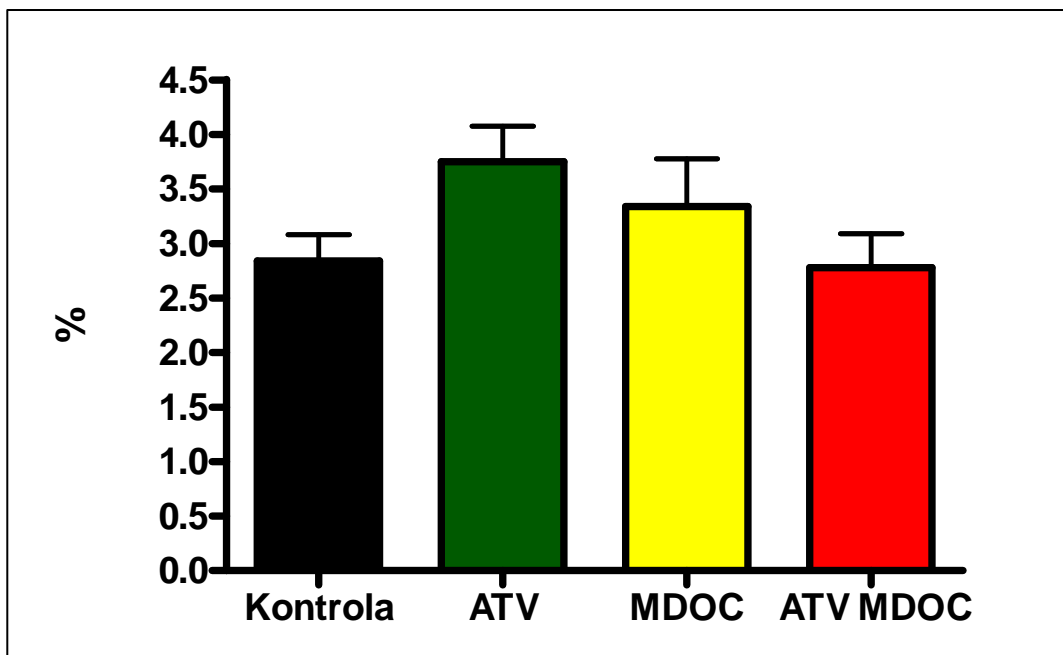
5.3 Stereologická analýza exprese VCAM-1 a ICAM-1 v aortálním oblouku

Kvantitativní stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 a ICAM-1 byla vztažena k expresi PECAM-1 na endotelu, který vyjadřuje 100%-ní přítomnost endoteliálních buněk. Výsledky tedy vyjadřují procento aktivovaných buněk barvených VCAM-1 nebo ICAM-1.

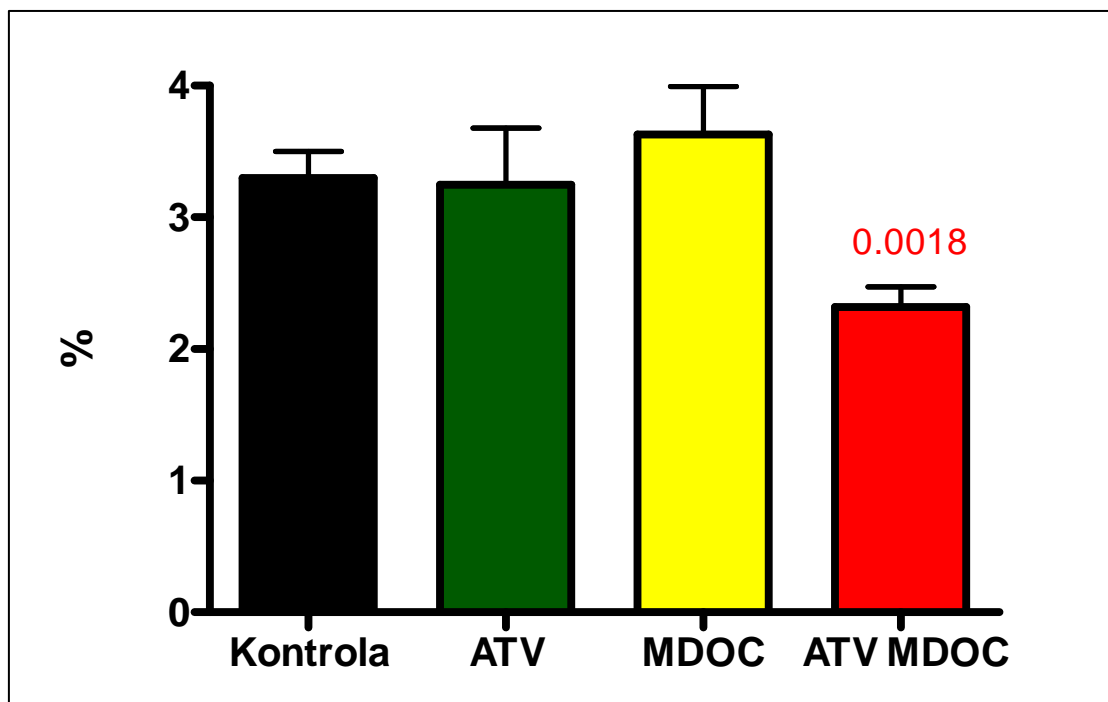
Výsledky stereologické analýzy potvrdily vizuální nálezy. Exprese VCAM-1 nebyla signifikantně ovlivněna podáváním žádné substance ve srovnání s kontrolní skupinou.

Naproti tomu exprese ICAM-1 byla statisticky významně snížena po podávání kombinace atorvastatin + MDOC (P=0,002).

Obrázek č. 14: Stereologická analýza imunohistochemického barvení VCAM-1. Výsledky ukázaly, že exprese VCAM-1 nebyla signifikantně změněna u žádné experimentální skupiny.



Obrázek č. 15: Stereologická analýza imunohistochemického barvení ICAM-1. Výsledky prokázaly statisticky významné snížení endoteliální exprese ICAM-1 pouze u kombinální terapii MDOC atorvastatin.



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 (Ross 1999).

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE) (Nakashima et al 1994). ApoE lipoproteiny jsou tvořeny primárně v játrech, mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myší se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneuryzmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly (Hofker & Breuer 1998).

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 (van Nieuw Amerongen et al 2000). Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

Nicméně se ukazuje, že použití kombinační terapie s jiným hypolipidemikem s rozdílným mechanismem účinku může výrazně zlepšit účinek statinů a snížit incidenci jejich nežádoucích účinků (Czuriga & Edes 2006).

Navíc bylo také prokázáno, že podávání dietní vlákniny má pozitivní vliv na kardiovaskulární systém a to včetně hladiny cholesterolu (Ryzhenkov et al 1991). Dietní vláknina je tvořena požitelnou částí rostlinných nebo obdobných sacharidů, které jsou rezistentní trávení a absorpci v lidském tenkém střevě s kompletní nebo částečnou fermentací v tlustém střevě. Dietní vláknina se vyskytuje v zelenině, ovoci, obilninách, a dřevě (Campbell 2001). Vlákninu můžeme rozdělit na nestravitelné oligosacharidy (inulin), trávení rezistentní škrob, nerozpustnou dietní vlákninu (celulosa, beta-glukany), a rozpustnou dietní vlákninu (pektin). Vláknina vykazuje řadu pozitivních účinků, ke kterým patří pozitivní vliv na trávicí procesy, např. urychlí střevní pasáž, pozitivně podporuje peristaltiku, absorbuje vodu, změkčí stolicu, působí prevenci divertikulů a zácpy, podílí se na absorpci toxických látek. Mezi velmi důležité účinky patří také vliv na metabolismus živin. Rozpustná dietní vláknina se podílí na snížení resorpce tuků, snížení zpětné resorpce žlučových kyselin, snížení energetického obsahu diety, zpomalení resorpce sacharidů, snížení glykémie a insulinemie, potlačení syntézy cholesterolu v játrech zvýšením přívodu kyseliny propionové portálním oběhem do jater (Bennett & Cerda 1996).

MDOC tedy modifikovaná oxidovaná celulosa je chemicky *de facto* polyanhydroglukurunová kyselina. Z výsledků některých prací na Katedře biologických a lékařských věd vyplývá, že dle svého chování v gastrointestinálním systému experimentálních zvířat se může MDOC zařadit mezi tzv. rozpustnou vlákninu. Proto bylo cílem této diplomové práce zjistit, zda podávání MDOC společně s atorvastatinem bude mít větší benefit než podávání těchto substancí jednotlivě.

Podávání atorvastatinu i MDOC vedlo ke snížení hladin LDL cholesterolu. Po podání MDOC se ještě navíc došlo ke zvýšení hladiny HDL cholesterolu. Společné podávání MDOC a atorvastatinu vedlo ke snížení hladiny LDL ale bohužel i HDL cholesterolu. Navíc snížení LDL cholesterolu nelze považovat za aditivní účinek společné terapie obou substancí. Dále bylo zjištěno že společné podávání atorvastatinu a MDOC neovlivnilo hladiny IL-6 a VCAM-1 v krevním séru a ani expresi VCAM-1 na endotelu. Jediný pozitivní účinek společného podávání MDOC a atorvastatinu tak spočíval ve snížení endoteliální exprese ICAM-1, které

nebylo pozorováno ani po podávání atorvastatinu a ani po podávání MDOC. Tyto výsledky tedy zatím naznačují, že společné podávání atorvastatinu a MDOC nevykazuje žádný výrazný pozitivní efekt na aterogenezi u apoE-deficientních myší.

7 ZÁVĚR

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit potenciální benefit společného podávání atorvastatinu a MDOC, tedy léčiv s jiným hypolipidemickým mechanismem účinku na vybrané parametry lipidů a některé prozánětlivé markery.

Podávání MDOC s atorvastatinem snížilo signifikantně hladiny LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou nicméně nejednalo se o aditivní účinek v porovnání s podáváním těchto substancí jednotlivě.

Podávání MDOC s atorvastatinem statisticky významně snížilo endoteliální expresi ICAM-1. Vzhledem k dalším výsledkům biochemické však nemáme pro tento efekt zatím žádné vysvětlení.

Dále bylo zjištěno, že společná terapie nevede ke snížení celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu, dále exprese VCAM-1 na cévním endotelu.

Z dosavadních výsledků vyplývá, že společné podávání MDOC s atorvastatinem nevede k významnějšímu pozitivní vlivu na aterogenní proces u apoE-deficientního kmene myší.

8 ABSTRAKT

Ateroskleróza a její pozdější komplikace jsou příčinou více než poloviny všech úmrtí v západních průmyslových státech. Buněčné adhezní molekuly jsou exprimovány na povrch všech tkání organismu. Účastní se jak fyziologických (hojení ran, obnova tkání, buněčný růst), tak patologických (účast na interakci mezi složkami imunitního systému) procesů v organismu. Superrodina imunoglobulinů zahrnuje širokou škálu molekul s rozmanitými Ig doménami. Mezi nejvýznamnější zástupce z hlediska podílu na aterogenezi patří vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1).

MDOC (mikrodisperzní oxidovaná celulóza) je polymer glukuronové kyseliny. Vyskytuje se ve formě Ca/Na soli rozpustné ve vodě, přičemž Ca sůl vytváří pouze koloid. Metabolizuje se na glukuronovou kyselinu, jejíž oligomery přecházejí pravděpodobně do krve. Statiny jsou účinné kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu – HMG-CoA reduktázy, což nakonec vede ke snižování hladiny cholesterolu.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit možný benefit podávání kombinace MDOC a atorvastatinu na vybrané parametry lipidů a markerů zánětu u apoE deficientního kmene aterosklerózy.

ApoE deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení aterogenní dietou s obsahem 1,25% cholesterolu po dobu 4 týdnů (kontrolní skupina). V MDOC skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 50 mg/kg MDOC denně. V atorvastatinové skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 10 mg/kg atorvastatinu denně. V kombinační atorvastatin MDOC skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 10 mg/kg atorvastatinu a 50 mg/kg MDOC denně. Dále byla provedena biochemická analýza krve a imunohistochemická a stereologická analýza exprese VCAM-1 a ICAM-1 v aortálním oblouku.

Výsledky biochemické analýzy neprokázaly vliv atorvastatinu, MDOC ani jejich kombinace na hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu. Naproti tomu LDL cholesterol byl snížen u všech 3 experimentálních skupin ve srovnání se skupinou kontrolní.

Výsledky imunohistochemického barvení a stereologické analýzy ukázaly, že exprese VCAM-1 nebyla signifikantně ovlivněna podáváním žádné substance ve srovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu exprese ICAM-1 byla statisticky významně snížena po podávání kombinace atorvastatin + MDOC (P=0,002).

Z dosavadních výsledků vyplývá, že společné podávání MDOC s atorvastatinem nevede k významnějšímu pozitivní vlivu na aterogenní proces u apoE-deficientního kmene myší.

9 ABSTRACT

Atherosclerosis and its complications are cause of more than half of mortality in western industrial countries. Cell adhesion molecules are expressed on surface of all tissues. They participates both physiological (healing stroke, regeneration of tissues, cellular growth) and pathological (participation on interaction between parts of immune system) processes in organism. The immunoglobulin superfamily includes a broad range of molecules with multiple Ig-like domains. In light of share in atherogenesis are the most remarkable members: vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1).

MDOC (microdispersed oxidised cellulose) is copolymer of glucuronic acid. It occurs in the form of Ca/Na salt which is soluble in water, whereas Ca salt makes only colloid. It metabolises on glucuronic acid, whose oligomers propably float into blood. Statins are effective competitive inhibitor of key enzyme in biosynthesis of cholesterol - HMG-CoA reductase, which finally leads to reduce cholesterol level.

The aim of this thesis was found out a possible benefit of combination treatment of MDOC and atorvastatin on lipid parameters and inflammatory markers in apoE deficient mice model of atherosclerosis.

ApoE-deficient mice (n=8) were fed by atherogenic diet containing 1,25 % of cholesterol during 4 weeks (control group). In the group of MDOC mice were fed by the same atherogenic diet, supplemented with 50 mg/kg MDOC daily. In the group of atorvastatin treated mice were fed by the same atherogenic diet, supplemented with 10 mg/kg atorvastatin daily. In the combination group of MDOC and atorvastatin mice were fed by the same atherogenic diet, supplemented with 10 mg/kg atorvastatin and 50 mg/kg MDOC daily. In the following biochemical analysis of blood and immunohistochemical and stereological analysis of expression VCAM-1 and ICAM-1 was performed in the aortis sinus and aortic arch.

Results of biochemical analysis did not show any effect of atorvastatin, MDOC and even their combinations treatment on the total cholesterol and VLDL cholesterol levels. On the other hand LDL cholesterol was reduced in all 3 experimental groups in comparison with control group.

Results of imunohistochemical staining and stereological analysis showed, that expression of VCAM-1 was not significant influence by treatment in comparison with control group. On the other hand endothelial expression of ICAM-1 was significantly reduced after treatment combination of atorvastatin and MDOC (P=0,002).

The results of this thesis demonstrated that combination treatment MDOC and atorvastatin does not possess important benefits when compared with either MDOC or atorvastatin single treatment in apoE-deficient mice.

10 LITERATURA

- Auer, J., Berent, R., Weber, T., and Eber, B. 2002. Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem.* **9**: 1831-1850.
- Bennett, W. G., and Cerda, J. J. 1996. Benefits of dietary fiber. Myth or medicine? *Postgrad Med.* **99**: 153-156, 166-158, 171-152 passim.
- Bourdillon, M. C., Poston, R. N., Covacho, C., Chignier, E., Bricca, G., and McGregor, J. L. 2000. ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-)/ICAM-1(-)) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**: 2630-2635.
- Brasen, J. H., Hakkinen, T., Malle, E., Beisiegel, U., and Yla-Herttuala, S. 2003. Patterns of oxidized epitopes, but not NF-kappa B expression, change during atherogenesis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis.* **166**: 13-21.
- Campbell, A. P. 2001. Health benefits of dietary fiber for people with diabetes. *Diabetes Educ.* **27**: 511-514.
- Cannon, R. O., 3rd 1998. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* **44**: 1809-1819.
- Comparato, C., Altana, C., Bellost, S., Baetta, R., Paoletti, R., and Corsini, A. 2001. Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **11**: 328-343.
- Czuriga, I., and Edes, I. 2006. [Lowering cholesterol: how low is low enough?]. *Orv Hetil.* **147**: 1349-1356.
- Doherty, T. M., Fisher, E. A., and Arditi, M. 2006. TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis. *Trends Immunol.* **27**: 222-227.
- Egorova, M. O. 2002. [Increased serum level of the acute inflammation phase parameter CRP and the high level of low density lipoprotein cholesterol--factors of increased risk of development of atherosclerosis and its complications (a literature review)]. *Klin Lab Diagn.* 3-6.
- Farmer, J. A. 2000. Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep.* **2**: 208-217.
- Fuhrman, B., Volkova, N., and Aviram, M. 2002. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density

- lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*. **161**: 307-316.
- Goff, D. C., Jr., Brass, L., Braun, L. T., Croft, J. B., Flesch, J. D., Fowkes, F. G., Hong, Y., Howard, V., Huston, S., Jencks, S. F., Luepker, R., Manolio, T., O'Donnell, C., Robertson, R. M., Rosamond, W., Rumsfeld, J., Sidney, S., and Zheng, Z. J. 2007. Essential features of a surveillance system to support the prevention and management of heart disease and stroke: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Stroke, and Cardiovascular Nursing and the Interdisciplinary Working Groups on Quality of Care and Outcomes Research and Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease. *Circulation*. **115**: 127-155.
- Gudev, A. 1996. [The role of the oxidative modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Mol Med (Sofia)*. **1**: 31-38.
- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., and et al. 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. **96**: 857-881.
- Hallan, S., de Mutsert, R., Carlsen, S., Dekker, F. W., Aasarod, K., and Holmen, J. 2006. Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis*. **47**: 396-405.
- Hernandez-Presa, M. A., Ortego, M., Tunon, J., Martin-Ventura, J. L., Mas, S., Blanco-Colio, L. M., Aparicio, C., Ortega, L., Gomez-Gerique, J., Vivanco, F., and Egido, J. 2003. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res*. **57**: 168-177.
- Hofker, M. H., and Breuer, M. 1998. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol*. **110**: 63-78.
- Chepelenko, G. V. 2003. [Pathogenesis of atherosclerosis in patients with lipid metabolism disturbances: hypothesis on cholesterol utilization and atheromatous plaque formation]. *Angiol Sosud Khir*. **9**: 20-25.
- Jang, Y., Lincoff, A. M., Plow, E. F., and Topol, E. J. 1994. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. **24**: 1591-1601.
- Jelinkova, M., Briestensky, J., Santar, I., and Rihova, B. 2002. In vitro and in vivo immunomodulatory effects of microdispersed oxidized cellulose. *Int Immunopharmacol*. **2**: 1429-1441.

- Jensen, L. O., Mintz, G. S., Carlier, S. G., Fujii, K., Moussa, I., Dangas, G., Mehran, R., Stone, G. W., Leon, M. B., and Moses, J. W. 2006. Intravascular ultrasound assessment of fibrous cap remnants after coronary plaque rupture. *Am Heart J.* **152**: 327-332.
- Joseph-Silverstein, J., and Silverstein, R. L. 1998. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest.* **16**: 176-182.
- Karapanayiotides, T., and Devuyst, G. 2006. Fibrous cap thickness and stability of carotid atheromata. *Stroke.* **37**: 2451; author reply 2452.
- Khan, B. V., Parthasarathy, S. S., Alexander, R. W., and Medford, R. M. 1995. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* **95**: 1262-1270.
- Krejsek, J., Kunes, P., Andrys, C., Holicka, M., Novosad, J., Kudlova, M., and Kolackova, M. 2005. [Innate immunity, receptors for exogenous and endogenous danger patterns in immunopathogenesis of atherosclerosis--part II: TLR receptors, significance of genetic polymorphism of danger signals receptors]. *Cas Lek Cesk.* **144**: 790-794.
- LaRosa, J. C. 2001. Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. *Am J Cardiol.* **88**: 291-293.
- Ley, K., and Huo, Y. 2001. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest.* **107**: 1209-1210.
- Libby, P., and Li, H. 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest.* **92**: 538-539.
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., Fradelizi, D., and Tedgui, A. 2001. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* **89**: 930-934.
- Mareckova, Z., Heller, S., and Horoky, K. 1999. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek.* **45**: 46-50.
- Marui, N., Offermann, M. K., Swerlick, R., Kunsch, C., Rosen, C. A., Ahmad, M., Alexander, R. W., and Medford, R. M. 1993. 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**: 1866-1874.

- McFarlane, S. I., Muniyappa, R., Francisco, R., and Sowers, J. R. 2002. Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab.* **87**: 1451-1458.
- Mehta, J. L., Saldeen, T. G., and Rand, K. 1998. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **31**: 1217-1225.
- Muntner, P., He, J., Astor, B. C., Folsom, A. R., and Coresh, J. 2005. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 529-538.
- Nachtigal, P., Pospisilova, N., Pospechova, K., Jamborova, G., Kopecky, M., Jaynes, R., Briestensky, J., Santar, I., Smahelova, A., Solichova, D., Zdansky, P., and Semecky, V. 2006. MDOC and atorvastatin have potential antiinflammatory effects in vascular endothelium of apoE^{-/-} mouse model of atherosclerosis. *Life Sci.* **78**: 1983-1989.
- Nachtigal, P., Semecky, V., Kopecky, M., Gojova, A., Solichova, D., Zdansky, P., and Zadak, Z. 2004. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract.* **200**: 219-229.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., and Ross, R. 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Tromb.* **14**: 133-140.
- Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L., and Ross, R. 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **18**: 842-851.
- Nishina, P. M., Lowe, S., Verstuyft, J., Naggert, J. K., Kuypers, F. A., and Paigen, B. 1993. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res.* **34**: 1413-1422.
- Nylaende, M., Kroese, A., Strandén, E., Morken, B., Sandbaek, G., Lindahl, A. K., Arnesen, H., and Seljeflot, I. 2006. Markers of vascular inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med.* **11**: 21-28.
- Paigen, B., Morrow, A., Holmes, P. A., Mitchell, D., and Williams, R. A. 1987. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* **68**: 231-240.

- Paiker, J. E., Raal, F. J., Veller, M., von Arb, M., Chetty, N., and Naran, N. H. 2000. Cell adhesion molecules - can they be used to predict coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolaemia? *Clin Chim Acta.* **293**: 105-113.
- Palinski, W., and Napoli, C. 2002. Unraveling pleiotropic effects of statins on plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**: 1745-1750.
- Pedraza, A. 1993. [Hyperlipoproteinemia in the production of atherosclerosis. Risk factors: diagnosis and treatment]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* **51**: 21-33.
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M., and Maeda, N. 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 4471-4475.
- Quarfordt, S. H., Oswald, B., Landis, B., Xu, H. S., Zhang, S. H., and Maeda, N. 1995. In vivo cholesterol kinetics in apolipoprotein E-deficient and control mice. *J Lipid Res.* **36**: 1227-1235.
- Raines, E. W., and Ross, R. 1993. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J.* **69**: S30-37.
- Reddick, R. L., Zhang, S. H., and Maeda, N. 1994. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Tromb.* **14**: 141-147.
- Rosenblum, W. I., Nelson, G. H., Wormley, B., Werner, P., Wang, J., and Shih, C. C. 1996. Role of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) in platelet adhesion/aggregation over injured but not denuded endothelium in vivo and ex vivo. *Stroke.* **27**: 709-711.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* **340**: 115-126.
- Ryzhenkov, V. E., Remezova, O. V., and Beliakov, N. A. 1991. [Dietary fiber and synthetic nonspecific enterosorbents: their hypolipidemic and anti-arteriosclerotic effects]. *Vopr Pitan.* 11-18.
- Shantaram, V. 1999. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens.* **21**: 69-77.
- Schneider, W., and Undeutsch, W. 1967. [Uncommon blood vessel tumors of the skin. Clinical picture, pathological anatomy and histology as well as classification]. *Hautarzt.* **18**: 437-445.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., and Wissler, R. W. 1994. 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**: 840-856.
- Strutt, K., Caplan, R., Hutchison, H., Dane, A., and Blasetto, J. 2004. More Western hypercholesterolemic patients achieve Japan Atherosclerosis Society LDL-C goals with rosuvastatin therapy than with atorvastatin, pravastatin, or simvastatin therapy. *Circ J.* **68**: 107-113.
- Tarbell, J. M. 2003. Mass transport in arteries and the localization of atherosclerosis. *Annu Rev Biomed Eng.* **5**: 79-118.
- Trostdorf, F., Buchkremer, M., Harmjanz, A., Kablau, M., Jander, S., Geiger, K., Schmitz-Rixen, T., Steinmetz, H., and Sitzer, M. 2005. Fibrous cap thickness and smooth muscle cell apoptosis in high-grade carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* **29**: 528-535.
- van Nieuw Amerongen, G. P., Vermeer, M. A., Negre-Aminou, P., Lankelma, J., Emeis, J. J., and van Hinsbergh, V. W. 2000. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation.* **102**: 2803-2809.
- Vanhoutte, P. M. 1996. Endothelium-dependent responses and inhibition of angiotensin-converting enzyme. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **23**: S23-29.
- Vanhoutte, P. M. 1997. [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **90 Spec No 6**: 9-19.
- Vaughan, C. J., Gotto, A. M., Jr., and Basson, C. T. 2000. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* **35**: 1-10.
- Vaughan, C. J., Murphy, M. B., and Buckley, B. M. 1996. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet.* **348**: 1079-1082.
- Velican, C. 1981. A dissecting view on the role of the fatty streak in the pathogenesis of human atherosclerosis: culprit or bystander? *Med Interne.* **19**: 321-337.
- Watt, S. M., Gschmeissner, S. E., and Bates, P. A. 1995. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma.* **17**: 229-244.
- Wissler, R. W. 1992. Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerosis and the mechanisms of clinical effects. *Arch Pathol Lab Med.* **116**: 1281-1291.
- Xu, H., and Chen, K. J. 2007. [Inspection on advantage and cut-in point of integrative chinese and western medicine from view of cognitive transition on atherosclerosis]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* **27**: 5-7.

- Yan, S. F., Ramasamy, R., Naka, Y., and Schmidt, A. M. 2003. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res.* **93**: 1159-1169.
- Yuan, C., Zhang, S. X., Polissar, N. L., Echelard, D., Ortiz, G., Davis, J. W., Ellington, E., Ferguson, M. S., and Hatsukami, T. S. 2002. Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation.* **105**: 181-185.