

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Hradec Králové 2007

Marie Metelková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vliv kombinační terapie MDOCTM a statinu
na aterogenní proces u experimentálního modelu
aterosklerózy

Konzultant: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

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

Hradec Králové 2007

Marie Metelková

Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D., za odborné vedení rigorózní 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 práce na této katedře.

Obsah

Seznam použitých zkratek	5
1 Úvod.....	6
2 Teoretická část.....	7
2.1 Mikroskopická anatomie cév	7
2.2 Funkce endotelu za fyziologických podmínek	9
2.3 Endoteliální dysfunkce	12
2.4 Ateroskleróza	14
2.4.1 Rizikové faktory.....	14
2.4.1.1 Neovlivnitelné rizikové faktory.....	14
2.4.1.2 Ovlivnitelné rizikové faktory	15
2.4.2 Patofyziologie.....	16
2.5 Adhezní molekuly, VCAM-1	20
2.6 Statiny v léčbě hypercholesterolemie.....	21
2.6.1 Mechanismus účinku statinů	22
2.6.2 Pleiotropní účinky statinů	23
2.6.3 Atorvastatin	23
2.7 MDOC	25
2.7.1 Molekulární a strukturní vzorec	25
3 Cíl práce.....	29
4 Experimentální část	30
4.1 Zvířata a předepsaná dieta	30
4.2 Biochemická analýza	31
4.3 Elisa analýza.....	31
4.4 Imunohistochemie	31
4.5 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí	34
4.6 Statistická analýza	35
5 Výsledky.....	36
5.1 Biochemická analýza	36
6 Diskuse	40
7 Závěr.....	44
8 Literatura.....	45

Seznam použitých zkratk

ADP	adenozindifosfát
AP-1	aktivátor proteinu 1
EDGF	endotelový růstový faktor (endothelium-driven growth factor)
eNOS	syntáza oxidu dusnatého
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high-density lipoproteins)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low-density lipoproteins)
MDGF	monocytový růstový faktor (monocyte-driven growth factor)
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PAF	destičkový aktivační faktor (platelet-activating factor)
PBS	phosphate saline buffer
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
TF	tkáňový faktor (tissue factor)
TNF	faktor nekrotizující tumor (tumor necrosis factor)
TXA ₂	tromboxan A ₂
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins)

1 Úvod

Ateroskleróza je nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech Evropy a USA, více než 50% všech úmrtí. Na počátku 20. století byla ateroskleróza v ČR poměrně vzácným postižením, pak ale začal její výskyt prudce stoupat až do dnešní doby, kdy patří ČR v úmrtnosti na komplikace aterosklerózy na přední místa ve světě.

Ve 20. století došlo k vývoji řady teorií, které byly schopny, díky rozvoji molekulární biologie a dalších metod, více objasnit děje, které probíhají v ateromatózním plátu. Na základě těchto poznatků nepohlížíme dnes na aterosklerotický plát jako na nejasnou skupinu molekul, ale jako na dynamickou lézi, kterou lze ovlivnit.

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 rigorózní práce byla zaměřena na sledování změn exprese vybraných markerů endoteliální dysfunkce u myšního modelu aterosklerózy po podávání kombinace MDOC a atorvastatinu.

2 Teoretická část

2.1 Mikroskopická anatomie cév

Cévní stěna je složena ze tří koncentrických vrstev neboli tunik. Vnitřní **tunika intima** je tvořena vrstvou endotelových buněk, které lemují lumen cévy, a vrstvou subendotelovou. **Tunika media** obsahuje převážně cirkulárně uspořádaná vlákna hladké svaloviny. Periferní vrstva **tunika adventitia** je tvořena kolagenním vazivem. Najdeme zde fibroblasty a adipocyty, mohou se zde vyskytnout i hladké svalové buňky. Převažují zde longitudinálně uspořádaná kolagenní a elastická vlákna.

Kapiláry, artérie a vény jsou svou stavbou přizpůsobeny své funkci. Stěna **kapilár** se skládá z jedné vrstvy endotelových buněk, které se stáčíjí do trubičky a jsou obklopené bazální laminou. Endotelové buňky jsou ploché polygonální epitelové buňky mezenchymového původu. Jsou vzájemně spojeny mezibuněčnými komplexy (včetně zonulae occludentes) tak, že tvoří trubici. Na různých místech se podél kapilár vyskytují pericyty, buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými částečně obklopují buňky endotelové. Vytvářejí vlastní bazální laminu, která může někdy splývat s bazální laminou buněk endotelových. Pericyty jsou mezenchymové kmenové buňky, mohou kontrahovat a diferencovat se v různé typy buněk.

Artérie mají vyvinuty všechny tři vrstvy. **Tunika intima** je tvořena vrstvou endotelových buněk a vrstvou subendotelovou. Mezi tunika intima a tunika media je membrana elastica interna, která je v artériích malého a středního kalibru viditelná, zatímco ve velkých tepnách se nedá odlišit od ostatních

elastických blanek, které se vyskytují v **tunika media** a nazývají se membranae fenestratae. V této vrstvě se nachází hladké svalové buňky, dále vlákna retikulární a základní amorfní hmota, která obsahuje proteoglykany obsahující chondrotinsulfát. Membrana elastica externa je vyvinuta jen v některých artériích. **Tunika adventitia** je tvořena longitudinálně uspořádanými kolagenními a elastickými vlákny, dále zde nalezneme fibroblasty a nepříliš četné adipocyty.

Srovnáme-li artérii a vėnu, pak při stejném průměru má artérie vždy silnější stěnu. Artérie má nejsilnější tunika media, zatímco vėna tunika adventitia. U **venul a malých a středních vėn** je **tunika intima** tvořena endotelem, pod kterým je jen velmi málo subendotelového vaziva. **Tunika media** je tenká, sestává se jen z několika málo vrstev hladkých svalových buněk. **Tunika adventitia** je nejtlustší vrstvou tvořenou longitudinálně uspořádanými kolagenními vlákny, mohou se vyskytnout i hladké svalové buňky. Struktura **velkých vėn** se mění v závislosti na lokalizaci cévy v organizmu. **Tunika intima** je většinou dobře vyvinuta, subendotelová vrstva je silnější než u malých vėn. Jsou zde i hladké svalové buňky. **Tunika media** je tenká. Svalovina je redukována, převládá tkáň vazivová. **Tunika adventitia** představuje nejtlustší vrstvu stěny velkých vėn. Ve vėnách, ležících pod úrovní srdce, obsahuje tato vrstva svazky longitudinálně uspořádaných hladkých svalových buněk. V malých a středně velkých vėnách jsou vyvinuty **chlopně**. Jsou to párové kapsovité výchlipky tunika intima tvořené elastickou vazivovou tkání lemovanou po obou stranách endotelem (1).

2.2 Funkce endotelu za fyziologických podmínek

1. Význam endotelu spočívá mimo jiné v jeho funkci bariéry. Různé elementy regulují integritu endotelu a tím i jeho permeabilitu. Ty zahrnují mezibuněčné spoje, buněčné povrchově vážící proteiny, elektrostatický náboj endotelové membrány a složení bazální membrány. Nejdůležitější jsou mezibuněčná spojení, která tvoří fyzikální vazbu mezi dvěma kontinuálními buněčnými membránami (2).

Byly identifikovány tři hlavní typy buněčných spojení mezi endotelovými buňkami: tight junctions, gap junctions a adherens junction. Systém endotelových spojení je vysoce dynamický a reverzibilní, takže umožní prostup krevních komponent do tkání. Endotelové spoje jsou tvořeny transmembránovými proteiny napojenými na cytoplazmatické a cytoskeletární proteiny (3).

Některé biologické faktory mohou ovlivnit endotelové spoje a tak ovlivnit permeabilitu endotelu. Rychle ji mohou zvýšit mediátory zánětu jako trombin a histamin. Mezi možné mechanismy ovlivnění permeability patří fosforylace proteinů zapojených do struktury endotelových spojů s úsekem aktin-myosin, dostředivá odtažení endotelových buněk a nárůst gap junctions (4).

2. Endotel hraje dvojí roli v regulaci vasomotorického tonu. Produkuje a uvolňuje jak relaxační tak konstriční faktory. V normálním endotelu převažuje vliv vazodilatačních faktorů nad vazokonstričními.

Hlavní vazodilatační faktor produkovaný endotelovými buňkami je **oxid dusnatý (NO)**. V endotelu je syntetizován syntázou oxidu dusnatého (eNOS) (5). Je produkován jako odpověď na změny průtoku krve, tenzi kyslíku a různé další stimuly. Mimoto může být produkce NO stimulována hormony jako je

acetylcholin a vasopresin (6), dále bradykininem a histaminem, destičkovými faktory, jako serotoninem a adenosindifosfátem (ADP). Bylo také prokázáno, že zánětlivé cytokiny jako TNF a LDL snižují expresi eNOS a tím i syntézu NO (7).

Dysregulace metabolismu NO je detekována u řady cévních chorob zahrnujících aterosklerózu, hypercholesterolemii, diabetes a hypertenzi (8).

Termín eikosanoidy je souhrnný název pro prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany, leukotrieny a kyselinu hydroxyeikosatetraenovou, která může vznikat z různých polynenasycených dvacetihlíkatých mastných kyselin. Nejčastější a biologicky významné eikosanoidy jsou deriváty kyseliny arachidonové (kyselina 5, 8, 11, 14-eikosatetraenová) (9).

Tromboxan A₂ (TXA₂), produkovaný primárně destičkami, působí proti účinku PGI₂. Hlavní biologické účinky TXA₂ jsou vazokonstrikce a agregace destiček, zprostředkované TX receptorem (10).

Endoteliny jsou vazokonstrikční polypeptidy produkované různými tkáněmi jako tři izoformy: ET-1, ET-2 a ET-3. Jako první byl v roce 1988 objeven ET-1, když byl izolován z kultury endotelových buněk (11). Vazokonstrikční síla ET-1 a ET-2 je srovnatelná ale zároveň větší než ET-3. Endoteliny jsou nejsilnější známé konstriktory, přibližně stokrát silnější než angiotenzin II, navíc ET-1 a katecholaminy vzájemně potencují vazokonstrikční účinek. Primární místo vazokonstrikčního účinku ET-1 je na malých cévách (12).

3. Hemostatická a fibrinolytická funkce endotelových buněk

Jednou z hlavních funkcí endotelu je udržení netrombogenního rozhraní mezi krví a tkání.

Destičky hrají kritickou roli ve vzniku trombóz a spolu se zvýšenou hladinou krevního cholesterolu také v rozvoji aterosklerózy.

Hypercholesterolémie vede k aktivaci destiček a vzrůstu interakce mezi destičkami a cévním endotelem. Tento proces je zprostředkovaný von Willebrandovým faktorem a fibulin-fibrinogen komplexem. Degranulace destiček vede k uvolnění silných vazoaktivních faktorů a růstových hormonů, které mohou přispět k poškození endotelových buněk (např. serotonin) nebo stimulovat proliferaci hladkosvalových buněk (např. destičkový růstový faktor PDGF) (13). Navíc aktivované destičky stimulují přilnavost leukocytů k endotelu a přispívají k oxidaci LDL. Endotelové buňky mohou regulovat aktivitu destiček produkcí a uvolněním faktoru aktivující destičky (PAF). Ten je ale také produkován neutrofily, monocyty, makrofágy, bazofily, eozinofily a mastocyty. Stimulační efekt destičkové aktivace mohou inhibovat produkty endotelových buněk. Například NO i PGI₂ projevují inhibiční účinek na aktivaci destiček. V pokročilých stádiích aterosklerózy může vést zvýšená interakce mezi destičkami a endotelem k utváření trombu. Navíc destičky přispívají k masivní trombotické odezvě spojené s rupturou zralého aterosklerotického plátu (13).

Tkáňový faktor (TF) je integrální membránový protein, jehož extracelulární doména funguje jako receptor pro faktor VII/VIIa. TF se akumuluje v poškozených cévách a aterosklerotických plátech. Domníváme se, že akumulace TF je odpovědná za trombogenicitu plátů (14).

2.3 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi vazomotorickými a hemokoagulačními mechanismy. Dochází k převaze vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů s proaterogenním účinkem. Endoteliální dysfunkce hraje důležitou roli v patogenezi cévní aterosklerózy, arteriální hypertenze, diabetu nebo srdečního selhání (15).

Působení aterogenních lipidů je provázeno sníženou aktivitou endoteliálního NO při jeho degradaci tvořenými kyslíkovými radikály, to pak vede k uplatnění růstových faktorů, průniku monocytů a LDL částic subendoteliálně a k tvorbě pěnových buněk. Přítomnost lipoproteinu inhibuje fibrinolýzu a přispívá ke vzniku trombotických komplikací.

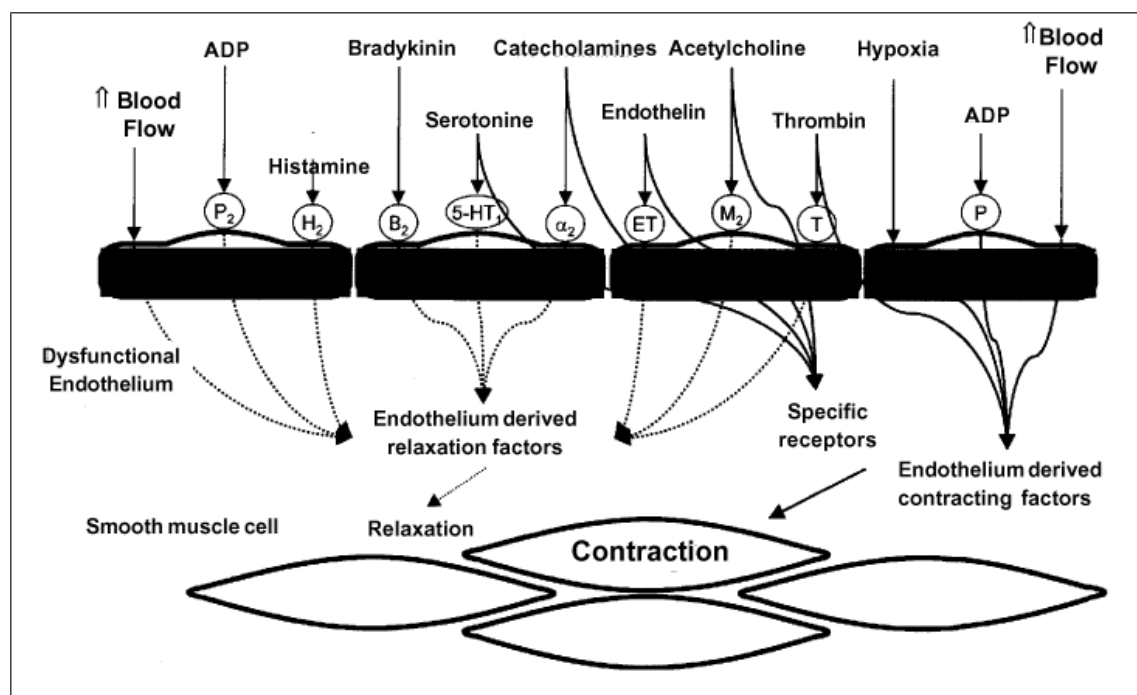
Ke strukturálním změnám endotelu, k hypertrofii a hyperplazii hladkých svalových buněk dochází u nemocných s arteriální hypertenzí. Hlavní roli zde hraje zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron a snížená aktivita vazodilatačních působků (NO, prostacyklinu). Dochází ke zvýšení permeability endotelu a expresi adhezních molekul (E-selektinu, ICAM-1, VCAM-1), což umožní adhezi a průnik zánětlivých buněk do cévní stěny (16).

Ke zvýšení permeability endotelu pro aterogenní lipidy vede i hyperglykémie, která je spojená s glykosylací lipoproteinů a glykací bílkovin. Hyperglykémie aktivuje endotel k expresi adhezních molekul, a takto dochází k průniku monocytů přes endotel. Dále k rozvoji endoteliální dysfunkce přispívá zvýšená syntéza kontraktiních a růst stimulačních faktorů (endotelin, angiotensin II, tromboxan A₂, PDGF).

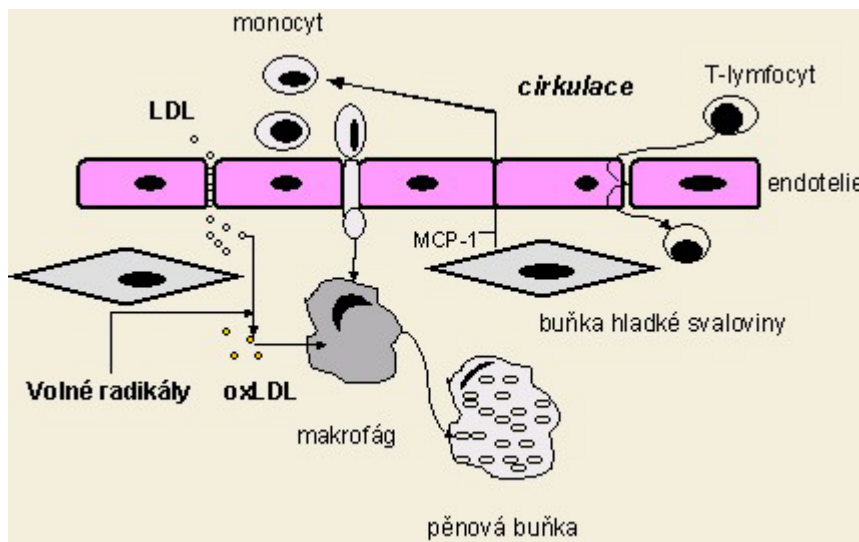
K průkazu endoteliální dysfunkce se může použít řada metod mezi které patří: 1. sledování cévní reaktivity na vazoaktivní podněty, kdy sledujeme vazorelaxační schopnosti cév na farmakologické podněty. 2. laboratorní stanovení markerů endoteliální dysfunkce (jako jsou endothelin-1, NO, adhezní molekuly E a P-selektin, ICAM-1, VCAM-1, hemokoagulační faktory (PAI, t-PA, vWf) a zánětlivé mediátory – CRP) a 3. sledování metabolismu značených prekurzorů (17).

Obr. 1 popisuje působení různých činitelů na dysfunkčním endotelu.

Při endoteliální dysfunkci dochází ke snížení působení relaxačních endoteliálních faktorů a převaze vazokonstrikčních podnětů. (H_2 – histaminový receptor, α_2 - adrenergní receptor, 5-HT – serotoninový receptor, B – bradykininový receptor, M – muskarinový receptor, ET – endothelinový receptor, T – trombinový receptor)



Obr. 2 schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu



2.4 Ateroskleróza

Ateroskleróza je podle WHO definována jako variabilní kombinace změn intimy artérií spojená s ukládáním lipidů (cholesterolu), polysacharidů a krevních elementů a v dalším vývoji tvorbou fibrózní tkáně provázenou ukládáním vápenatých sloučenin, se změnami v medii artérií. Postihuje velké a střední artérie tvorbou subintimálního ztlustění (ateromu), které může vést k omezení nebo až obstrukci krevního průtoku (18).

2.4.1 Rizikové faktory

Rizikové faktory pro vznik aterosklerózy můžeme rozdělit na endogenní, tedy potenciálně neovlivnitelné, a na ty, které je možné vhodným zásahem ovlivnit.

2.4.1.1. Neovlivnitelné rizikové faktory

Mezi neovlivnitelné faktory patří *vyšší věk, mužské pohlaví a rodinná dispozice.*

2.4.1.2. Ovlivnitelné rizikové faktory

Sem řadíme *dyslipoproteinemii, hypertenzi, kouření, diabetes mellitus, obezitu, infekci, nedostatek pohybu, nedostatek estrogenů, nedostatek antioxidantů, nenasycených mastných kyselin a vlákniny, nadbytek přijímané energie, cholesterolu, nasycených mastných kyselin* (19).

Dyslipoproteinemie je nejvýznamnějším rizikovým faktorem. Významná je především zvýšená koncentrace LDL-cholesterolu a zároveň snížená koncentrace HDL-cholesterolu. Především kouření, obezita a nedostatek pohybu má vliv na snížení hladiny HDL-cholesterolu (10).

Kouření zvyšuje riziko postižení periferních tepen, ICHS, cerebrovaskulárních chorob a reokluzí po revaskulizačních výkonech. Na endotel působí toxicky především nikotin a CO. Další látky obsažené v kouři způsobují zvětšenou přilnavost trombocytů a zvýšenou propustnost endotelu. Kouření zvyšuje hladinu LDL-cholesterolu a snižuje HDL-cholesterol (20)

Diabetes mellitus působí prostřednictvím dyslipoproteinemie a glykosylace pojivové tkáně. Hyperinzulinemie poškozuje cévní endotel (21).

Hypertenze. Angiotenzin II přispívá k rozvoji aterogeneze stimulací proliferace buněk cévní hladké svaloviny a k oxidačnímu stresu.

Ukázalo se, že i **chronická infekce** má souvislost s rozvojem aterogeneze. V ateromových plátech byla dokázána přítomnost herpetických virů a *Chlamydia pneumoniae* a zvýšený titr protilátek proti různým infekčním agens.

2.4.2 Patofyziologie

Na patogenezi aterosklerózy se podílí několik faktorů, mezi které patří jednak poškození cévní stěny mechanickými, chemickými nebo infekčními vlivy (vysoký krevní tlak, nikotin, viry, toxiny), tak vysoké hladiny krevních lipidů.

Ateroskleróza se vyvíjí v několika charakteristických stádiích.

První stádium je charakterizované **lipidními proužky**, vyskytuje se pravděpodobně u všech lidí a vzniká již v dětském věku. Lipidní proužky jsou tvořeny shluky pěnových buněk (15).

Aterogenní proces se vyvíjí na základě endoteliální dysfunkce. Reakcí na aterogenní faktory je zvýšené vychytávání lipidů do cévní stěny, adheze monocytů a trombocytů. Monocyty pronikají do intimy, pod vlivem růstových faktorů jako EDGF (endothelium-derived growth factor) nebo faktorů stimulujících tvorbu kolonií jako např. M-CSF dochází k jejich transformaci na makrofágy, které produkují kyslíkové radikály, které mají agresivní účinky na buňky endotelu a blokují účinnost endotelem vytvářeného NO. Tím dochází ke snížení dostupnosti a účinku NO, což vede zejména ke zvýšené adhezi trombocytů a monocytů na endotel a k inhibici jeho antiproliferativního a vazodilatačního působení na hladkou svalovinu cév. Kyslíkovými radikály jsou vcestovalé LDL oxidativně modifikovány, vážou se na subendoteliální proteoglykany a kolagen (10). Oxidované LDL přímo aktivují endotel, působí chemotakticky na monocyty a zvyšují endoteliální expresi P-selektinu, VCAM-1 a ICAM-1. Výsledkem je aktivace cirkulujících monocytů a T lymfocytů a jejich vstup do intimy cév (13). Oxidované LDL, které nemohou být vychytávány cestou LDL receptorů, jsou fagocytovány makrofágy a vznikají tzv. pěnové buňky a jejich nahromaděním lipidní proužky. Vstup leukocytů

do subendoteliálních prostor se nazývá „kutálení po endotelu“ a spočívá v interakci mezi lektinovými receptory leukocytů a selektiny. Vytvoření pevné vazby je zprostředkováno interakcí mezi adhezními molekulami VCAM-1 a ICAM-1 a integriny. Transmigraci leukocytů umožňuje molekula PECAM-1, která se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk a interaguje s PECAM-1 molekulou na leukocytech (22).

Druhým stádiem vývoje aterosklerózy je **fibromuskulární plát**, pro který je charakteristická migrace hladkosvalových buněk z medie do intimy a proliferace extracelulární matrix. Makrofágy, podílející se na tvorbě lipidních proužků, produkují řadu látek, které ovlivňují další formování aterosklerotické léze. Ve velké míře produkují chemokin MCP-1, který zesiluje chemotaxi a podílí se na další akumulaci makrofágů v lézi. Dále produkují společně s endotelem destičkový růstový faktor (PDGF), monocytový růstový faktor (MDGF) a zánětlivé IL-1 β a IL-8, které přispívají ke změně kontraktálního fenotypu hladkosvalových buněk na fenotyp syntetický a také podporují proliferaci a migraci hladkosvalových elementů. TNF- α produkovaný aktivovanými makrofágy společně s IL-1 β zvyšuje expresi adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 (23).

V této fázi vstupují do procesu aterogeneze hladkosvalové buňky. Normálně se nacházejí v kontraktálním stavu, podílejí se na udržení cévního tonu, na syntéze extracelulární matrix v medii a na reparaci cévní stěny při různých poraněních. Po změně na syntetický fenotyp (pomocí růstových faktorů a chemokinů makrofágů a T lymfocytů) dochází k rozrušení bazální membrány a změně exprese některých adhezivních molekul. Hladkosvalové buňky se uvolní z vazby na extracelulární matrix v medii a transmigrují

do intimy, kde se vážou prostřednictvím VCAM-1 a ICAM-1 molekul na endotelové buňky, makrofágy a leukocyty. V intimě začínou hladkosvalové buňky produkovat složky extracelulární matrix, zejména kolagen.

Kolagen je v aterosklerotických lézích tvořen nejen hladkosvalovými buňkami, ale i endoteliálními buňkami a fibroblasty. Syntéza kolagenu souvisí jak se změnou fenotypu, migrací a proliferací hladkosvalových buněk, tak s řadou lokálních i systémových činitelů (TGF- β , PDGF, angiotensin II, IL-1, homocystein a mechanické napětí stimulují tvorbu kolagenu).

Za předpokladu, že aterogenní faktor přestane v tomto stadiu působit, endotelové buňky ještě mohou regenerovat a postupně obnovit svou funkci. Výsledkem je pouhé ztluštění intimy, která obsahuje pouze jednu nebo dvě vrstvy myocytů, které se zde normálně nevyskytují. Pokud aterogenní faktory stále působí, onemocnění se dále rozvíjí.

Ateromový plát – je to již pokročilá aterosklerotická léze, kde došlo k vytvoření nekrotického lipidového jádra, zformování fibromuskulární čepičky a ukládání vápenatých iontů.

Makrofágy dále pohlcují lipoproteinové částice a částečně dochází k jejich kumulaci ve střední části plátu. Zvýšeně akumulují volný cholesterol, zatímco v počátečních stádiích pohlcovaly estery cholesterolu. Cytotoxické účinky volného cholesterolu zřejmě vedou k odumírání makrofágů. Po zániku makrofágů se lipidy akumulují extracelulárně, uvolní se hydrolytické enzymy a zánětlivé substance a vytvoří se nekrotické lipidové jádro (24).

Také migrace hladkosvalových buněk z intimy do medie pokračuje, a to směrem k povrchu aterosklerotického plátu přes lipidové jádro. Stále syntetizují extracelulární matrix, zejména kolagen, elastin a proteoglykany. Všechny tyto

děje vedou k vytvoření tzv. fibromuskulární čepičky na povrchu aterosklerotického plátu. V nekrotických oblastech plátu navíc dochází k ukládání vápníku a mineralizaci.

Pokročilé aterosklerotické léze jsou vždy potenciálně velmi nebezpečné, protože často způsobují stenózu cévy. Pokud se propustnost cévy zmenší pod 15%, dochází často k projevům ischemie, nejčastěji anginy pectoris. Klinické komplikace aterosklerózy jako je infarkt myokardu, ale nezávisí na stupni cévní obstrukce, vznikají především jako následek trombózy.

Vznik trombu – Toto stadium je vlastně již klinickou komplikací aterosklerózy. Ke vzniku trombu může dojít buď při erozi endotelu, nebo při ruptuře plátu. Na vzniku trombózy se podílí celá řada faktorů, které často patří mezi obecné rizikové faktory aterosklerózy. Jsou to hyperlipidémie, hyperhomocysteinémie, diabetes, zvýšená koagulační aktivita, snížená fibrinolytická aktivita, atd (25).

Malá eroze endotelu znamená expozici kolagenu a tkáňového faktoru destičkám, čímž vznikají mikrotromby. Vznik těchto mikrotrombů nemá žádný klinický význam. Pokud je eroze a destrukce endotelu větší, dochází ke vzniku tzv. červeného trombu, který obsahuje velké množství destiček, červených krvinek a fibrinu. Tento trombus postupně uzavírá lumen cévy a může dojít až k úplné okluzi. Kromě toho se v místě vzniku trombu rozvíjí zánětlivá reakce s akumulací makrofágů a T lymfocytů.

Ruptura fibromuskulární čepičky plátu má za následek styk krve s nejvíce trombogenní oblastí plátu, kterou je kašovitá hmota s velkou koncentrací tkáňového faktoru, který je produkován makrofágy, hladkosvalovými i endotelovými buňkami. Trombus se vytváří v intimě, kde dochází k jeho

inkorporaci do plátu. Pokud je ruptura plátu malá, průtok krve rychlý a vysoká fibrinolytická aktivita, trombus se může uvolnit a dochází k embolizaci nebo může být postupně degradován a žádné klinické komplikace se neobjeví.

Ruptura aterosklerotického plátu je způsobena hlavně mechanickými silami, které působí na plát, a které převáží nad mechanickými vlastnostmi plátu. Stabilitu plátu významně oslabují makrofágy a T lymfocyty produkcí zánětlivých cytokinů a proteolytických enzymů (metaloproteináz), které snižují syntézu a zvyšují degradaci extracelulární matrix. Stabilita je oslabena také kumulací lipidů, degradací kolagenu, apoptózou a sníženou migrační a proliferační aktivitou hladkosvalových buněk (26).

2.5 Adhezní molekuly, VCAM-1

Mediátory zánětlivé reakce endotelové buňky

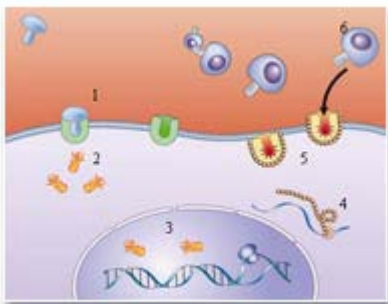
Rozvoj zánětlivé reakce na cévním endotelu je normální obranný mechanismus jako odpověď na poškození nebo aktivaci cévní stěny. Fyziologický význam takové reakce spočívá v udržování normální struktury a funkce cévní stěny a celého organismu. Ukázalo se, že myši s deficitem exprese adhezních molekul postihují rekurentní infekce. Na druhou stranu, četné iniciace zánětlivé reakce s následujícím rozvojem pozitivní zpětné vazby zánětlivého cyklu mohou vést k těžkému poškození tkáně a to je spojeno s cévní patologií, zahrnující rozvoj aterosklerotických plátů (27).

VCAM-1 stimuluje adhezi lymfocytů a monocytů na povrch cévního endotelu. VCAM-1 mohou vázat eozinofily a bazofily, nikoli však neutrofile. Tato adhezní molekula je primárně exprimována na endotelových buňkách; ale

mohou ji produkovat i buňky hladkých svalů cév nebo buňky kostní dřeně (28). Mezi nejznámější induktory VCAM-1 exprese patří TNF, IL-1 a oxidovaný LDL. Transkripční regulace VCAM-1 vyžaduje nukleární faktor kappa B (NF- κ B) a aktivátor proteinu-1 (AP-1). Exprese VCAM-1 je také zvýšena podáváním vysokocholesterolové diety u experimentálních modelů aterosklerózy (29). Exprese na endotelu se objevuje již po týdnu krmení, kdežto exprese v hladkých svalových buňkách se objevuje až po 6 týdnech.

Obr. 3 Aktivace VCAM-1

- 1 zánětlivé agens se naváže na receptor na povrchu buňky
- 2 receptor začne vysílat oxidační signály do buňky
- 3 oxidační signály stimulují gen k produkci VCAM-1
- 4 buňka produkuje VCAM-1
- 5 VCAM-1 migruje na povrch buňky
- 6 bílé krvinky se vážou na VCAM-1 na povrchu buňky



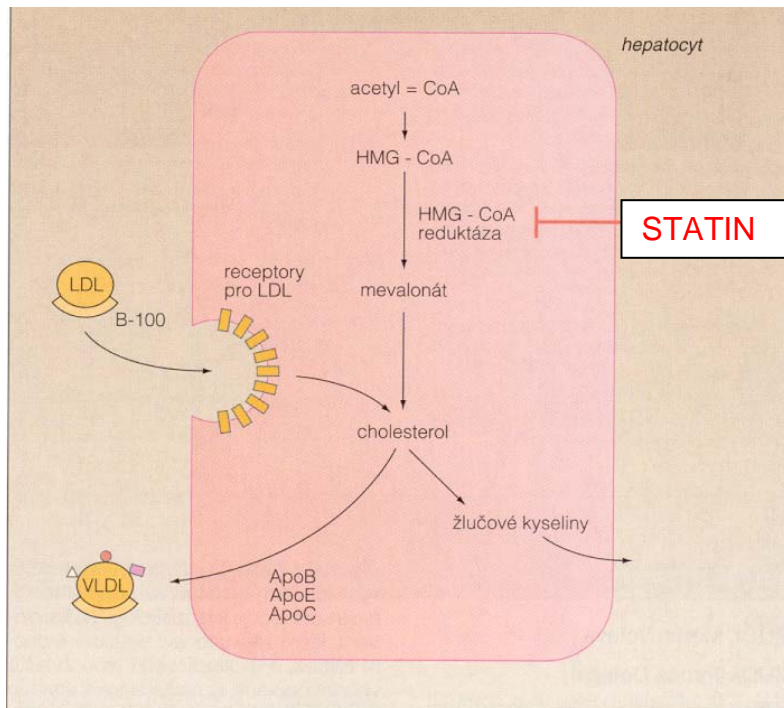
2.6 Statiny v léčbě hypercholesterolemie

Podávání statinů, které jsou v současnosti považovány za nejúčinnější hypolipidemika, představuje jednu z možných cest léčby hypercholesterolemie. Léčba by však měla být komplexní, zaměřená především na celkovou životosprávu. Při dlouhodobém podávání statinů bylo pozorováno snížení výskytu koronárních příhod a celkové snížení mortality. Výhodou této skupiny hypolipidemik je relativně malý výskyt nežádoucích účinků (30).

2.6.1 Mechanismus účinku statinů

Statiny jsou kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu – HMG-CoA reductázy, který katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát, což je jeden z časných kroků v syntéze cholesterolu, ale i dalších důležitých molekul nesteroidní povahy. Inhibice tohoto enzymu vede k snížení syntézy cholesterolu především v jaterních buňkách (31). Snížení dostupnosti cholesterolu v hepatocytech vede ke zvýšení exprese receptorů pro LDL na povrchu hepatocytů a tím ke zvýšenému vychytávání LDL-částic z krevního oběhu, což vede k poklesu těchto částic v krvi. Snížení množství cholesterolu v hepatocytech způsobuje také snížení produkce VLDL-částic v játrech, to vede ke snížení plazmatické koncentrace triglyceridů, druhotně také ke snížení přeměny VLDL-částic na LDL-částice a tím opět ke snížení koncentrace LDL-cholesterolu (32).

Obr. 4 mechanismus účinku statinů



2.6.2 Pleiotropní účinky statinů

U statinů byly prokázány ještě další, tzv. pleiotropní účinky. Mezi ně patří antiproliferační, antioxidantní, protizánětlivé (snižují hladinu CRP) a imunomodulační účinky. Statiny zvyšují stabilitu aterosklerotického plátu a jsou odpovědné za pokles trombotického potenciálu (snižují aktivaci destiček, protrombinu, faktoru XIII, štěpení fibrogenu). Výsledky klinických studií dále prokazují pokles cévní mozkové příhody a prevalence Alzheimerovy nemoci je u pacientů léčených statiny o 60% nižší (33).

2.6.3 Atorvastatin

Atorvastatin je hypolipidemikum ze skupiny inhibitorů HMG-CoA-reduktázy. Je indikován především k léčbě izolované hypercholesterolemie a smíšené lipoproteinemie s převahou zvýšení cholesterolu. Atorvastatin je jako jediný

ze statinů indikován u nemocných s homozygotní formou familiární hypercholesterolemie. Dále se využívá v kombinaci s jinými hypolipidemiky k léčbě dalších typů dyslipidemií (34).

Chemicky je atorvastatin 7-[3-fenyl-4-fenylkarbamoyl-2-fluorofenyl-5-(2-propyl)pyrrol-1-yl]-(2R,4R)-2,4-dihydroxyheptanová kyselina. Jedná se o plně syntetický lipofilní statin.

Atorvastatin je po perorálním podání rychle absorbován (asi z 30 %), podléhá výraznému „first-pass“ efektu v játrech, takže jeho biologická dostupnost je přibližně 14 %. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 1–2 hodinách.

Atorvastatin je z 98 % vázán na plazmatické proteiny, jeho distribuční objem činí 5,8 l/kg. Je metabolizován cytochromem P-450 3A4, z velké části na biologicky aktivní metabolity, sám je též biologicky aktivní. Avšak 70% jeho inhibiční aktivity vůči HMG-CoA-reduktáze je způsobeno jeho aktivními metabolity. Atorvastatin i jeho metabolity jsou vylučovány převážně žlučí. Biologický poločas eliminace je přibližně 14 hodin. Poločas inhibiční aktivity HMG-CoA-reduktázy je však 20–30 hodin, vzhledem k přítomnosti a delšímu eliminačnímu poločasu jeho aktivních metabolitů. Při jaterní nedostatečnosti je plazmatická koncentrace atorvastatinu výrazně zvýšena (35).

Mezi nejčastější nežádoucí účinky při léčbě statiny patří dyspepsie, nauzea, flatulence, bolesti břicha, zácpa, bolesti hlavy, vzácněji zvracení, závratě, parestezie, alopecie. Nutno však podotknout, že léčba statiny je bezpečná a její profit je podstatně vyšší než její rizika. Potenciálně nejzávažnějším nežádoucím účinkem je myopatie. Lehčí myalgie a svalové

křeče se vyskytují u 1–2 % pacientů, závažnější myopatie se vyskytují zřídka.
 Klinicky nejzávažnější se rابدomyolýza, která je zcela ojedinělá(36).

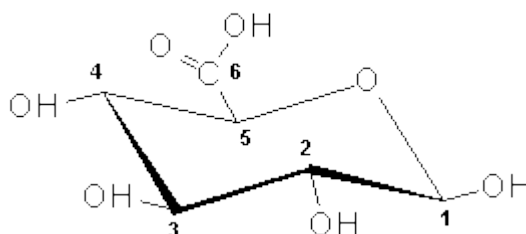
Tab. 1 Farmakokinetika atorvastatinu

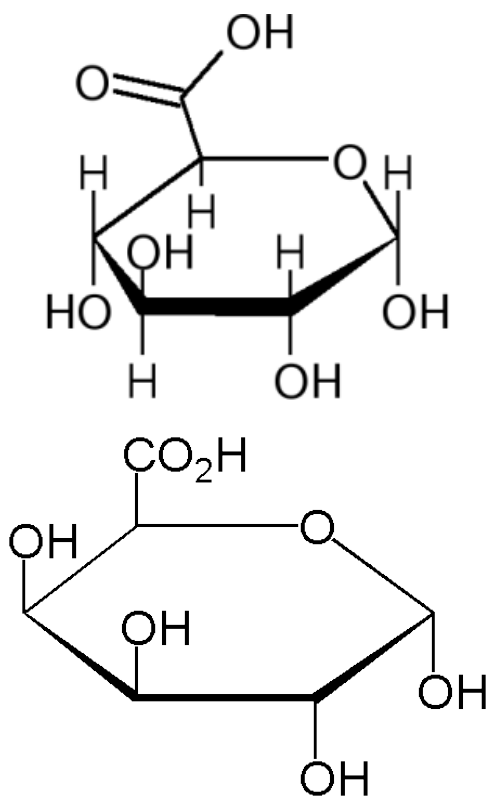
biologický poločas $t_{1/2}$ (h)	15 – 30
čas potřebný k dosažení maximální koncentrace v plazmě t_{max} (h)	1 – 3
vazba na plazmatické bílkoviny (%)	98
renální exkrece (%)	2
exkrece stolicí (%)	70
metabolismus v játrech	CYP-450 3A4

2.7 MDOC

2.7.1 Molekulární a strukturní vzorec

Oxidovaná celulóza

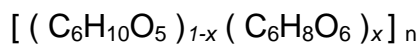




Základní funkční jednotka oxicelulózy je kyselina anhydroglukuronová (dle názvosloví IUPAC -D-glucopyranuronic acid), ve strukturním vzorci číslice 1 – 6 zobrazují konvenčním číslováním uhlíkové atomy pyranosového kruhu.

Jestliže je celulóza popsána jako polyanhydroglukóza, „oxidovaná celulóza“, připravená selektivní oxidací primárních alkoholických skupin na C6 na karboxylové, může být obecně popsána jako statistický kopolymer složený z anhydroglukosových jednotek a jednotek kyseliny anhydroglukuronové.

Odpovídající molekulární vzorec může být napsán jako:



kde a je stupeň polymerizace, a $x \in \langle 0, 1 \rangle$ je průměrný stupeň oxidace získaný jako:

$$x = \frac{M_{\text{Glu}}}{(M_{\text{COOH}}/W_{\text{COOH}}) - (M_{\text{Glc}} - M_{\text{Glu}})}$$

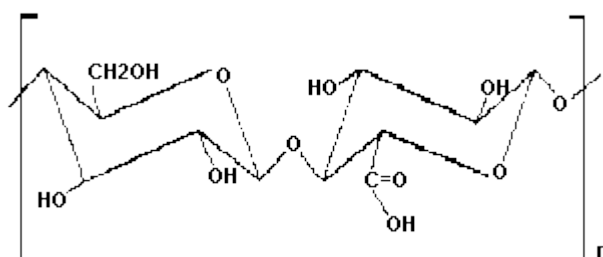
kde M_{Glu} = molární hmotnost glukosové jednotky (162 g/mol)

M_{Glc} = molární hmotnost jednotky kyseliny glukuronové (176 g/mol)

M_{COOH} = molární hmotnost karboxylové skupiny (45 g/mol)

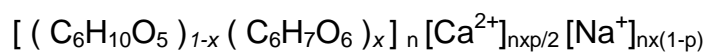
W_{COOH} = hmotnostní zlomek karboxylových skupin (obsah karboxylu v %
b/w dělený 100)

Tak například, když $x=0$ jde o čistou celulózu, $x=1$ značí úplně oxidovanou celulózu s karboxylovou skupinou obsaženou okolo 25,6% m/m, zatímco $x=0,5$ odpovídá 1:1 kopolymeru s karboxylovou skupinou obsaženou z 13,3% m/m. Strukturální vzorec kopolymeru můžeme napsat:



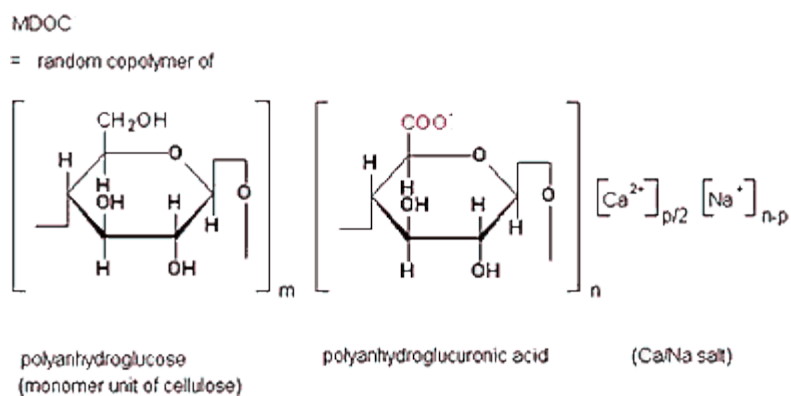
Měl by být správně chápán tak, že oxidovaná celulóza není zcela popsána výše uvedeným vzorcem. Je založena na přirozeně nehomogenním přírodním surovém materiálu, který když je oxidovaný selektivně, nicméně ne výlučně, na C6 atomu uhlíku, získáme oxidovaný produkt, který ale také obsahuje produkty vytvořené jinými oxidačními postupy. Sekundární alkoholické skupiny mohou být rovněž oxidovány a některé glukózové kruhy se mohou otevřít a poté mohou být předmětem další oxidace.

Obecný vzorec pro konečnou látku MDOC™, vápenato-sodnou sůl oxidované celulózy, může být napsán jako



kde p a $(1-p) \in <0,1>$ znamená molární zlomek Ca^{2+} a Na^+ iontů

nebo jinak, strukturálně,



tentokrát , $x = n/(n+m)$, $x \in <0,1>$, slouží jako indikátor stupně oxidace.

3 Cíl práce

Cílem této rigorózní 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 lipidů, sérové koncentrace zánětlivých markerů v krvi. 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 předepsaná dieta

Všechny myši byly v 5 týdnech života odstaveny 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 vylačněna 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 media (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 Elisa analýza

Analýza hladin IL-6 v krevním seru byla provedena na Ústavu klinické imunologie a alergologie. Byla využita standardní sendvičová enzymatická technika za využití konvenčních kitů pro stanovení IL-6 a VCAM-1 od firmy (R&D Systems, Inc., MN, USA).

4.4 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 nescifická 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 Laboratoriem). 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

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 1	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 3	5 minut
15. 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
16. PBS 4	2x5 minut
17. ABC komplex elite	30 minut
18. PBS 5	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

4.5 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí

Plochy endoteliální exprese ICAM-1, VCAM-1 a PECAM-1 byly kvantifikovány pomocí stereologických metod (37). Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μ m (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 (38). 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.

Protílátka 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 LUCIA verze 4.82 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

4.6 Statistická analýza

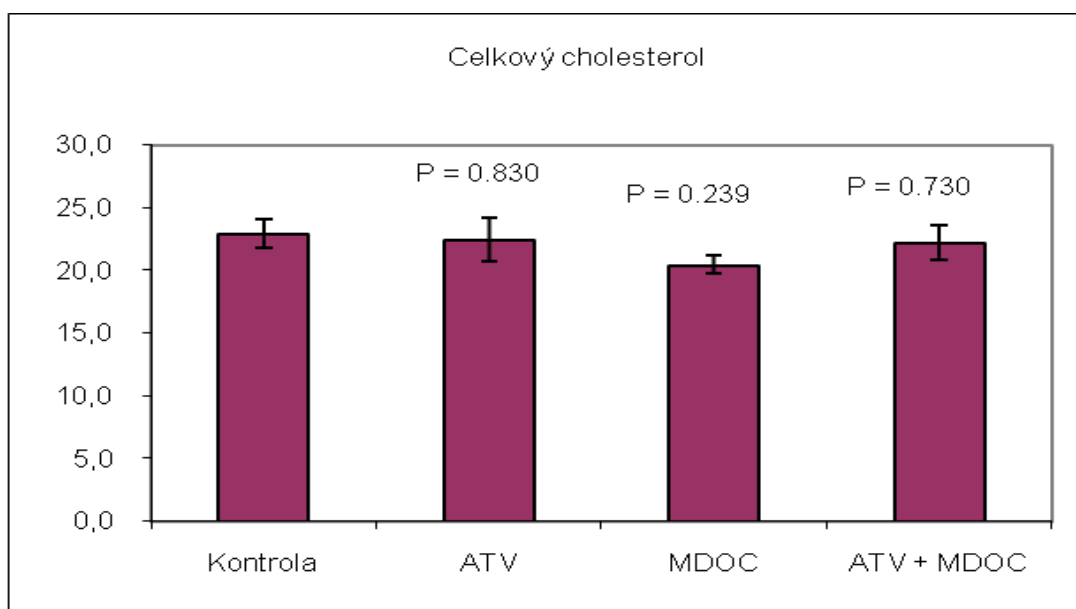
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$ kde $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky

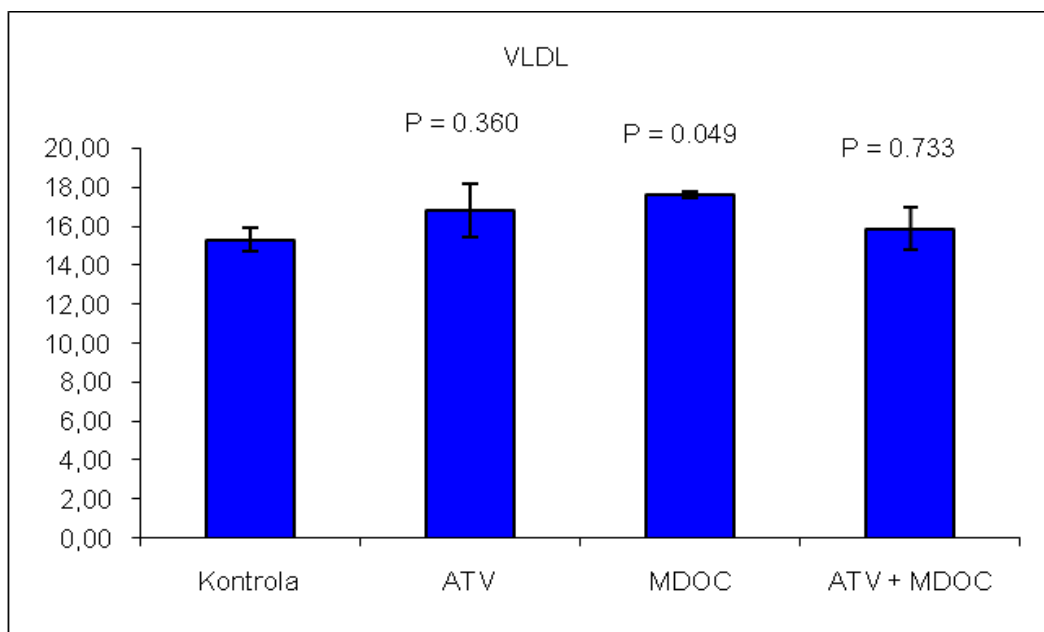
5.1 *Biochemická analýza*

Výsledky biochemické analýzy neprokázaly vliv atorvastatinu, MDOC ani jejich kombinace na hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu (viz obr.). 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.

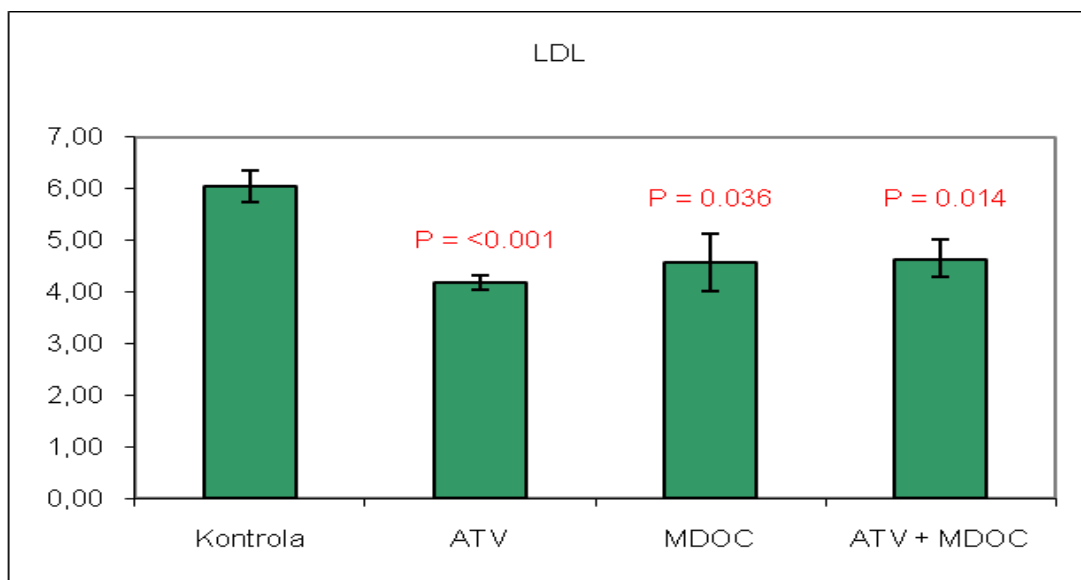
Obr. 5 Hladiny celkového cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou.



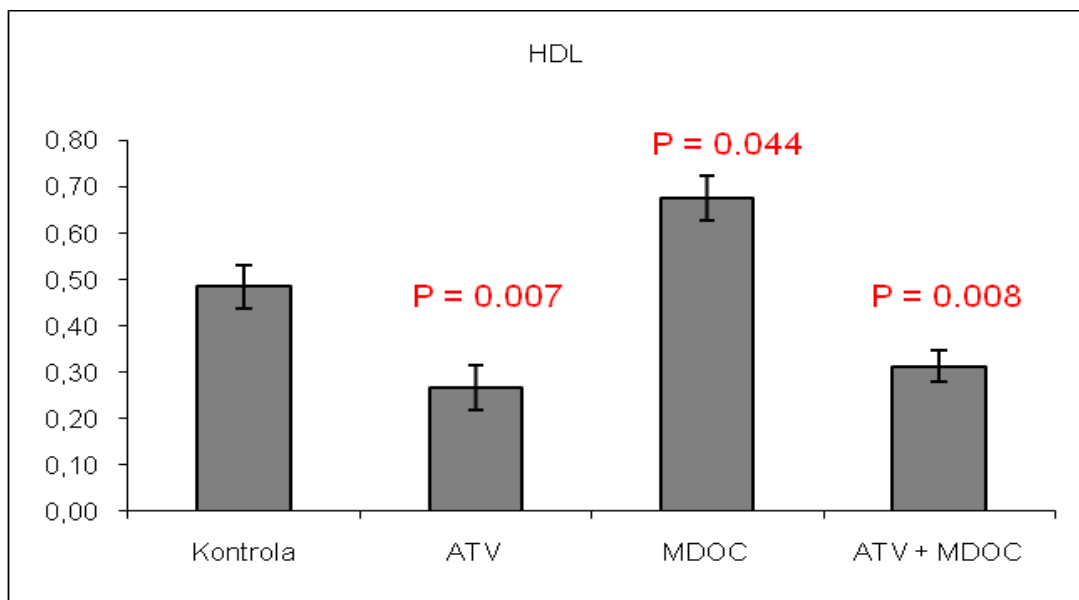
Obr. 6 Hladiny VLDL cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou.



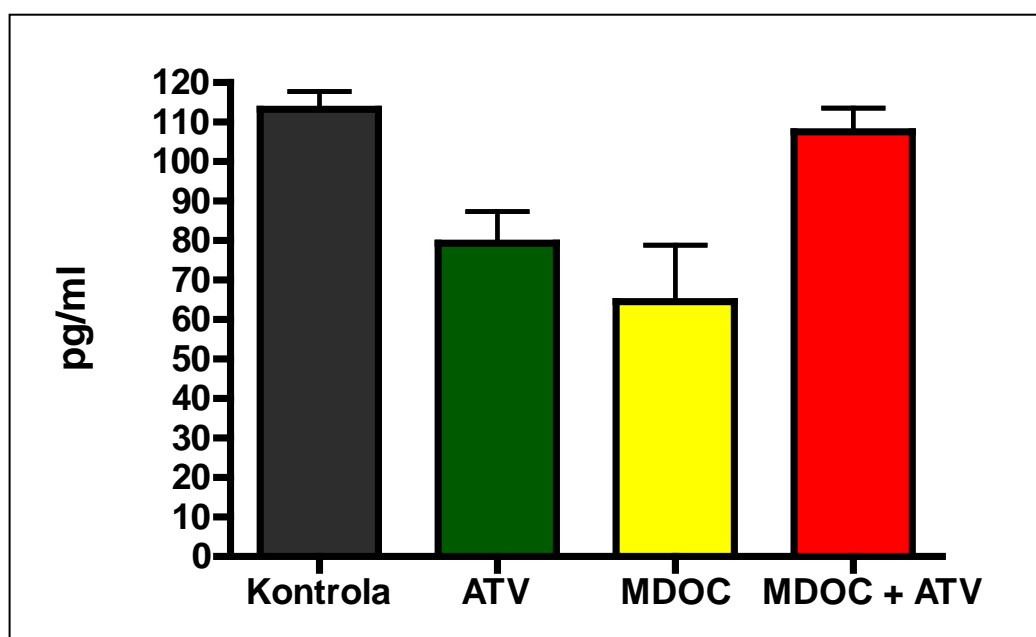
Obr. 7 Hladiny LDL cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Statisticky významný pokles byl pozorován po podání atorvastatinu, MDOC i jejich kombinaci a to vše ve srovnání s kontrolní skupinou.



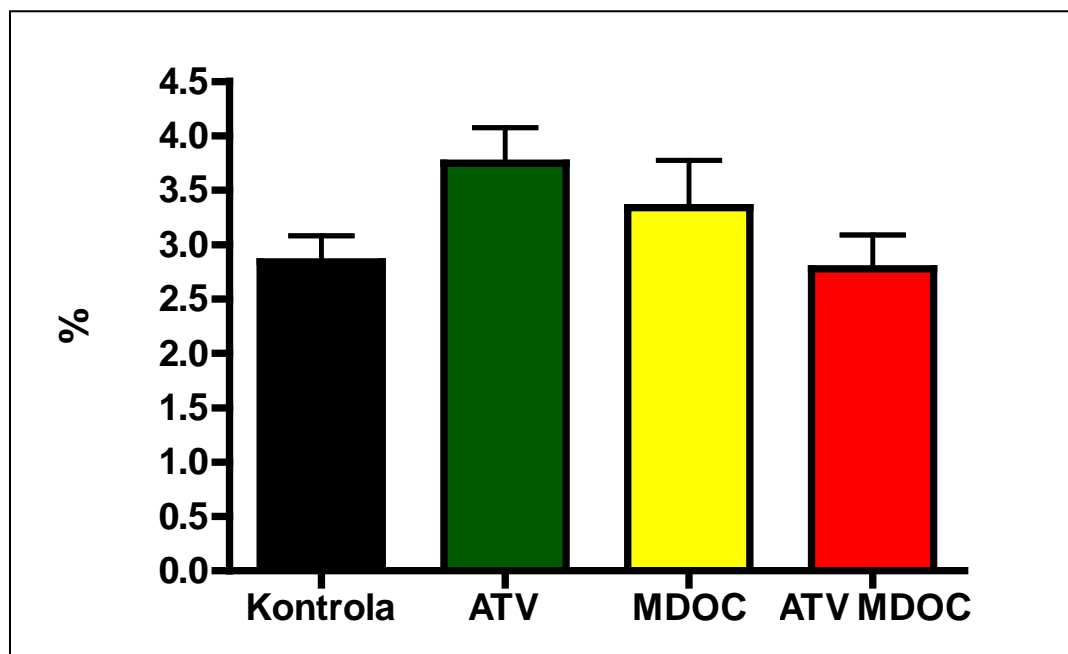
Obr. 8 Hladiny HDL cholesterolu v mmol/l u všech skupin zvířat. Statisticky významný nárůst HDL cholesterolu byl pozorován pouze u MDOC skupiny. Naopak u atorvastatinové a kombinační skupiny byl pozorován statisticky významný pokles HDL cholesterolu.



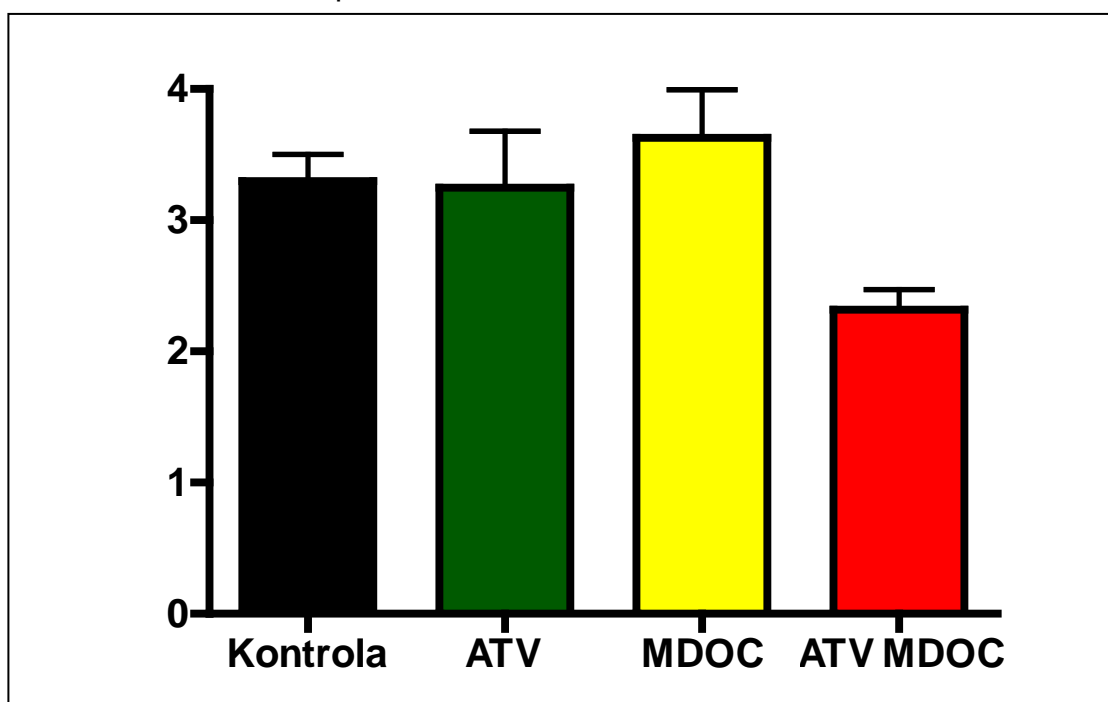
Obr. 9 Hladiny interleukinu-6 u všech skupin zvířat. Hladiny IL-6 byly signifikantně sníženy po podání atorvastatinu a MDOC nicméně u kombinační skupiny tento efekt nebyl pozorován.



Obr. 10 Stereologická analýza imunohistochemického barvení VCAM-1. Výsledky ukázaly, že exprese VCAM-1 nebyla signifikantně změněna u žádné experimentální skupiny.



Obr. 11 Stereologická analýza imunohistochemického barvení ICAM-1. Výsledky prokázaly statisticky významné snížení endoteliální exprese ICAM-1 pouze u kombinační 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 (10).

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE) (39). 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 aneurysmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly (40).

V terapie 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 (41). 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 (42).

Navíc bylo také prokázáno, že podávání dietní vlákniny má pozitivní vliv na kardiovaskulární systém a to včetně hladiny cholesterolu (43). 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 (44). 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 stolicí, působí prevenci divertiklů 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 (45).

MDOC tedy modifikovaná oxidovaná celulosa je chemicky de facto polyanhydroglukurunová kyselina. Svými vlastnostmi se pravděpodobně může řadit mezi 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 a ELISA analýzy však nemáme pro tento efekt zatím žádné vysvětlení

Dále bylo zjištěno, že společná terapie nevede ke snížení celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu, dále ani hladin IL-6 a VCAM-1 v krvi a na 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 Literatura

1. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79(1):181-213.
2. Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):44S-54S.
3. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 1999;252(1):13-19.
4. Blann AD, McCollum CN. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1994;72(1):151-154.
5. Cannon RO, 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44(8 Pt 2):1809-1819.
6. Vanhoutte PM. [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1997;90 Spec No 6:9-19.
7. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97(12):1129-1135.
8. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270(19):11025-11028.
9. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999;107(1):85-97.
10. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-126.

11. Ishizuka T, Takamizawa-Matsumoto M, Suzuki K, Kurita A. Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1999;369(2):237-245.
12. Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Heucke L et al. Increased endothelin plasma concentrations in patients with coronary artery disease or hyperlipoproteinemia without coronary events. *Res Exp Med (Berl)* 1993;193(4):225-230.
13. Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3(1):63-68.
14. Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K et al. The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 1998;4(3):135-139.
15. Najemnik C, Sinzinger H, Kritz H. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca* 1999;26(5):148-153.
16. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997;158(4):1825-1832.
17. Mysliwiec M, Borawski J, Naumnik B, Rydzewska-Rosolowska A. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia--possibilities of intervention. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004;49:151-156.
18. Shiomi M, Ito T, Tsukada T et al. Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ. An immunohistochemical study. *Arterioscler Thromb* 1994;14(6):931-937.

19. Muntner P, He J, Astor BC et al. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(2):529-538.
20. McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW et al. Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation* 2001;103(11):1546-1550.
21. Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes* 1997;46(3):327-334.
22. Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988;60(6):459-464.
23. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13(2):197-204.
24. Underwood RS, Mohiaddin RH. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic vascular disease. *Am J Hypertens* 1993;6(11 Pt 2):335S-339S.
25. van Haelst PL, van Doormaal JJ, Asselbergs FW et al. Correlates of endothelial function and their relationship with inflammation in patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2003;104(6):627-632.
26. Keaney JF, Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 2000;21(4-5):99-166.

27. Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC et al. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002;106(11):1390-1396.
28. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(5):842-851.
29. Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(10):1209-1210.
30. Ahmed M, Griffiths P. Statins and secondary prevention of coronary heart disease. *Br J Community Nurs* 2004;9(4):160-165.
31. Davignon J, Mabile L. [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2001;62(1 Pt 2):101-112.
32. Bellosta S, Ferri N, Arnaboldi L et al. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care* 2000;23 Suppl 2:B72-78.
33. Gotto Jr AM, Jr., Farmer JA. Pleiotropic effects of statins: do they matter? *Curr Opin Lipidol* 2001;12(4):391-394.
34. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101(12):2711-2719.
35. Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91(10):3527-3561.

36. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(1):1-10.
37. Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M et al. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 2004;200(3):219-229.
38. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988;96(10):857-881.
39. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Tromb* 1994;14(1):133-140.
40. Hofker MH, Breuer M. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 1998;110:63-78.
41. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P et al. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 2000;102(23):2803-2809.
42. Czuriga I, Edes I. [Lowering cholesterol: how low is low enough?]. *Orv Hetil* 2006;147(29):1349-1356.
43. Ryzhenkov VE, Remezova OV, Beliakov NA. [Dietary fiber and synthetic nonspecific enterosorbents: their hypolipidemic and anti-arteriosclerotic effects]. *Vopr Pitan* 1991(5):11-18.
44. Campbell AP. Health benefits of dietary fiber for people with diabetes. *Diabetes Educ* 2001;27(4):511-514.

45. Bennett WG, Cerda JJ. Benefits of dietary fiber. Myth or medicine?
Postgrad Med 1996;99(2):153-156, 166-158, 171-152 passim.