

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**Vliv podávání MDOCTM na aterogenní proces u experimentálního
modelu aterosklerózy.**

(rigorózní práce)

Konzultant: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

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

Leden, 2007

Pavla Tomalová

Děkuji panu PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při sestavování rigorózní práce. Poděkování patří taktéž kolektivu Katedry biologických a lékařských věd FaF UK za odbornou i jinou spolupráci na experimentu.

Obsah.....	strana
1. ÚVOD.....	4
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1 Fyziologická funkce endotelu	8
2.1.1 Endotel a permeabilita	8
2.1.2 Interakce mezi krevními elementy a cévní stěnou.....	8
2.1.3 Vasoregulace.....	10
2.1.4 Angiogeneze	12
2.2 Dysfunkce endotelu	13
2.2.1 Vlastnosti endotelu při ateroskleróze.....	14
2.3 Ateroskleróza	15
2.3.1 Rizikové faktory aterosklerózy	15
2.3.2 Patogeneze aterosklerózy.....	19
2.4 Adhezní molekuly.....	24
2.4.1 Selektiny	24
2.4.2 Integriny.....	24
2.4.3 Imunoglobulinová skupina	25
2.4.4 Kadheriny.....	26
2.5 ApoE model aterosklerózy.....	27
2.6 MDOC (Modifikovaná oxidovaná celulóza)	29
2.6.1 Struktura.....	29
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 Zvířata a předepsaná dieta	32
3.2 Biochemická analýza	33
3.2.1 ELISA analýza.....	33
3.3 Imunohistochemie.....	34
3.3.1 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí	36
3.4 Statistická analýza.....	36
4. VÝSLEDKY	37
4.1 Biochemická analýza	38
4.1.1 ELISA analýza.....	39
4.2 Imunohistochemie.....	41
4.2.1 Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu	41
4.2.2 Stereologická analýza exprese endoglinu u ApoE deficientních myší	43
5. DISKUSE	44
6. ZÁVĚR	48
7. POUŽITÉ ZKRATKY	50
8. LITERATURA.....	52

1. ÚVOD

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 a dalšími změnami v medii artérií. Postihuje velké a střední artérie tvorbou subintimálního ztlustění (ateromu), které může vést k redukci nebo až obstrukci krevního průtoku. (1)

Z názvoslovného hlediska se vymezují následující pojmy:

- a. **Ateroskleróza** – tvorba sklerotických plátů (ateromů) ve velkých elastických, ale i muskulárních artériích
- b. **Arterioskleróza** – tvorba ateromů ve velkých elastických artériích
- c. **Arteriolskleróza** – aterosklerotické poškození tepének

Podíváme-li se do historie, na počátku 19. století objevil Lobstein příčinu infarktu a zavedl pojem arteriosclerosis = tvrdnutí tepen, později, na konci 19. století Marchand zobecnil tento výraz a zavedl pojem atherosclerosis. Pojem atheroma = kaše zavedl Virchow, který aterosklerózu řadil k zánětům. (2) Ateroskleróza a její důsledky v organismu, jako infarkt myokardu, cévní mozkové příhody či ischemická choroba dolních končetin, představují jeden z nejrozsáhlejších problémů ve vyspělých zemích a patří tedy k tzv. civilizačním onemocněním. Na počátku 20. století byla v ČR poměrně vzácným postižením, pak ale začal její výskyt prudce stoupat až do dnešní doby, kdy patříme v úmrtnosti na její komplikace na přední místa ve světě. Z hlediska celkové úmrtnosti tvoří kardiovaskulární onemocnění zapříčiněné aterosklerózou přes 50% (vztaženo na Evropu a USA), proto není divu, že lidská společnost investuje do její léčby a jejího studia nemálo, protože celkové částky vynaložené na léčbu následků aterosklerózy mnohonásobně tyto náklady převyšují.

Toto onemocnění je tedy natolik závažné, že postihuje nejen zdraví konkrétního jedince, ale způsobuje komplexní ekonomicko-zdravotně-sociální problém pro každou vyspělou zemi. Proto i já se v této své práci aspoň částečně podílím na celosvětovém výzkumu, když ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd zkoumáme vliv hypolipidemik na expresi vybraných buněčných adhezních molekul ve stěně cévy u experimentálních *myších* modelů aterosklerózy.

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit potencionální hypolipidemické a protizánětlivé účinky MDOC. Jako model byly použity apoE deficientní myši, kterým byla podávána aterogenní dieta. Byly sledovány hladiny lipidů a sérové koncentrace zánětlivých markerů v krvi. Pro zobrazení exprese VCAM-1 byly využity

imunohistochemické metody a ke kvantifikaci jeho exprese stereologické metody a endoteliální exprese VCAM-1.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 FYZIOLOGICKÁ FUNKCE ENDOTELU

O endotelu se dlouho dobu myslelo, že je pouhou inertní vrstvou připomínající semipermeabilní celofán, která kryje povrch cévní stěny a zajišťuje její permeabilitu. Krátce poté, co William Harvey objevil krevní oběh, v roce 1628, popsal Malphigi systém cévní sítě v těle jako oddělený systém od ostatních tkání. Později v 19. století von Reckingausen prohlásil, že cévy nejsou jen provrtané skulinky skrz tkáň, ale že to jsou samostatné celky utvořené z vlastních buněk. V roce 1896 přichází Starling s teorií kapilárního systému, kde endotel je selektivně propustná bariéra, která je po celý život konstantní ve své propustnosti, tato teorie je později roku 1891 doplněna Heidenhahnem, že na endotelových buňkách dochází též k aktivnímu transportu. Na významu v roce 1953 přidaly Paladovy histologické studie cévní stěny s využitím elektronového mikroskopu, jakož i fyziologická pozorování Gowana v roce 1959, která jednoznačně prokázala interakce mezi endotelem a lymfocyty. To doslova vyprovokovalo vlnu nejrůznějších dalších studií, díky nimž je dnes endotel viděn jako složitý, dynamický a heterogenní systém umožňující vylučovací, syntetické, metabolické a imunologické funkce. (3)

2.1.1 Endotel a permeabilita

Jednou ze základních funkcí endotelu je zajištění řízené propustnosti mezi krví a okolními tkáněmi. Endotel kontroluje prostup jak pro buněčné elementy, tak pro nebuněčné krevní komponenty. Nebuněčné komponenty využívají pro svou cestu jak paracelulární, tak transcelulární transportní mechanismy.

2.1.2 Interakce mezi krevními elementy a cévní stěnou

Endoteliální buňky obsahují na svém povrchu makromolekuly, tzv. **buněčné adhezní molekuly** (cellular adhesion molecule, CAM), které napomáhají fyziologické migraci leukocytů skrz cévní stěnu do konkrétních tkání a orgánů. Tato migrace je pak umocněna a zacílena na popud nejrůznějších markerů zánětu např. interleukinů IL-6 či IL-8. V poslední době se ukázalo, že tyto „cévní průchody“ hrají též určitou roli při adhezi trombocytů a erytrocytů.

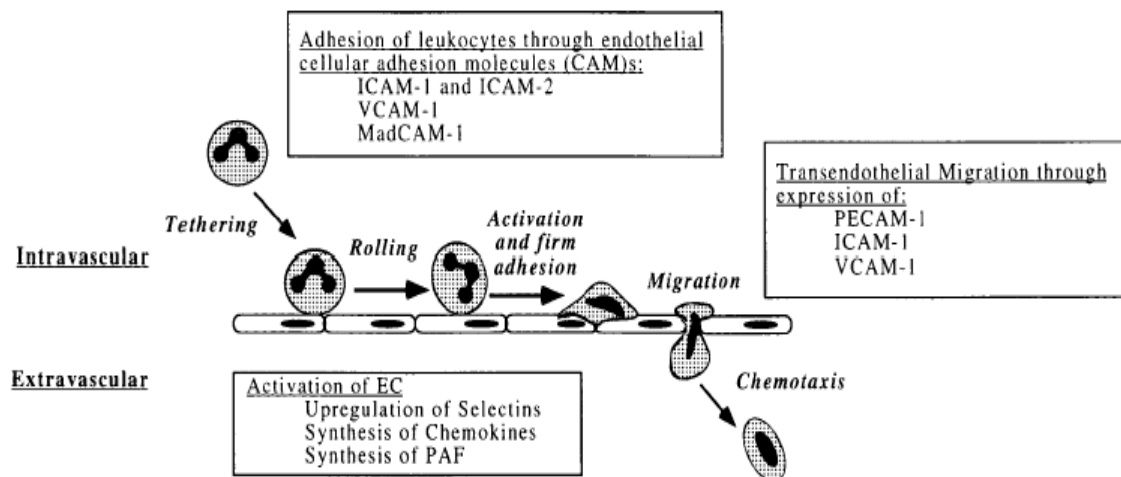
Volně plovoucí leukocyty a krevní destičky mohou přilnout ke specifickým oblastem endotelu nebo k odhaleným subendoteliálním součástem anebo k sobě navzájem při imunitním „dozoru“ či zánětlivém procesu. Tyto buněčné interakce jsou nezbytným předstupněm pro spuštění hemostatické kaskády či tzv. fyziologického zánětlivého procesu. Na druhou stranu nekontrolované ulpívání leukocytů a trombocytů na stěně cévní přispívá k rozvoji zánětlivého procesu či trombotizaci.

Průnik se realizuje pomocí buněčných adhezních molekul, CAM (viz též kapitulu 2.4). Proces probíhá převážně v postkapilárních venulách, kde jsou menší unášivé krevní proudy. Oba typy krevních elementů, leukocyty i trombocyty interagují s cévní stěnou resp. buněčnými adhezními molekulami a pronikají přes ní.

Tento proces zahrnuje několik kroků, které jsou ukázány na obrázku 1.

- (1) aktivace endotelové buňky
- (2) zpomalení pohybu krevních elementů a tzv. jejich kutálení (rolling)
- (3) vytvoření ireverzibilního komplexu: adhezní molekula-krevní buňka
- (4) transendoteliální migrace krevní buňky do intimy cévy

Obrázek 1. *Fyziologická interakce leukocytů s endotelem.* Leukocytární adheze a migrace skrz cévní stěnu vyskytující se během zánětu převážně v postkapilárních venulách, kde je nejslabší smykové tření krevního proudu. (2)



2.1.3 Vasoregulace

Endotel neslouží pouze jako prostá bariéra mezi krví a okolní tkání, ale buňky endotelu také samozřejmě produkují mediátory, které mají za fyziologických podmínek vliv na hemodynamiku (viz tabulka č. 1). Buňky endotelu přispívají k regulaci průtoku krve a s ním i ruku v ruce jdoucího krevního tlaku, ať už se jedná o *vazodilatační* působky – oxid dusný (NO), prostacyklin (PGI₂), či *vazokonstrikční* látky – trombocyt aktivující faktor (PAF), endothelin (ET). Tyto chemicky značně odlišné sloučeniny nejsou skladovány v intracelulárních granulích. Jejich biologické účinky jsou zprostředkované díky specifickým receptorům na hladkosvalových buňkách cévy, buď spuštěním rychlé biochemické kaskády, nebo na úrovni genetické transkripce. Oxid dusný je tvořen nepřetržitě, ale jeho produkce je regulována velkým množstvím fyzikálně-chemických podnětů, zatímco ostatní zmíněné mediátory jsou tvořeny primárně v závislosti na změnách vnějšího prostředí. (4)

Tabulka 1.

VASOREGULAČNÍ PŮSOBKY VYTVÁŘENÉ ENDOTELEM

Působek	Typ sloučeniny	Její prekursor	Hlavní účinek	Ostatní účinky	Způsob sekrece
NO (oxid dusný)	volný radikál	L-arginin	vazodilatace	udržuje bazální cévní tonus; inhibuje adhezi leukocytů, inhibuje adhezi, aktivaci a agregaci destiček a zároveň podporuje jejich desagregaci; inhibuje proliferaci hladkosvalových buněk cévy	<i>parakrinní</i> , deponován v konstitutivní formě, indukován trombinem, ADP, bradykininem, substancí P, muscarinovými agonisty, mechanickým napínáním, cytokiny
PGI₂ (prostacyklin)	eikosanoid	kyselina arachidonová	vazodilatace	blokuje nános krevních destiček a jejich shlukování	<i>parakrinní</i> , indukován v místech cévní odchylky
PAF (trombocyty aktivující faktor)	fosfolipid	kyselina arachidonová	vazokonstrikce	napomáhá adhezi leukocytů na povrchu endotelu	<i>juxtakrinní</i> , indukovaný
ET-1 (endothelin-1)	peptid tvořen 21 AK	preproendothelin 1 (203 AK)	vazokonstrikce	podporuje proliferaci hladkosvalových buněk cévy, moduluje účinky ostatních působků	<i>parakrinní</i> , indukovaný hypoxií, mechanickým napínáním a ischemií

2.1.4 Angiogeneze

Endotel může zasahovat i do reparačních procesů a angiogeneze. Reparační pochody v cévní stěně jsou kontrolovány řadou cytokinů. Mezi **růstové faktory** a cytokiny endoteliálního původu jsou řazeny například transformující růstový faktor beta (TGF- β), fibroblastový růstový faktor, destičkový růstový faktor, interleukin-1 (IL-1) a endothelin-1 (ET-1). Tyto mitogeny stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendoteliálního prostoru z medie s následnou hyperplazií intimy, a hypertrofii cévní stěny. Naopak velmi významným antimitogenem je NO, který inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny a zabraňuje hypertrofii cévní stěny. (5)

2.2 DYSFUNKCE ENDOTELU

Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími, resp. stimulujícími působky. Kromě selektivního zvýšení permeability se projevuje sklonem k vazospasmu, resp. nedostatečnou vazomotorickou odpovědí na endotel-dependentní podnět (někdy dokonce paradoxní vazokonstrikci), tendencí k trombóze a nedostatečnou inhibicí subendoteliální proliferace. Představuje časnou, morfologicky němou fázi aterosklerózy, ale podílí se i na vývoji morfologicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy. Hraje rovněž důležitou roli v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, renálního selhání, komplikací diabetes mellitus, sepse a dalších chorob. (6)

Existuje řada příčin endoteliální dysfunkce. Většina z nich jsou známé rizikové faktory aterosklerózy. Mezi *hlavní příčiny* patří arteriální hypertenze, hyperlipoproteinémie (zejména hypercholesterolémie a především zvýšená hladina LDL, přičemž nejnebezpečnější jsou oxidované či glykované LDL), hyperglykémie, hyperinzulinémie, hypoxie, hyperhomocysteinémie, kouření, ionizující záření, cytostatika, stárnutí, imunokomplexy a různé infekce. Je zřejmé, že například u diabetu působí navzájem několik rizikových faktorů, které vznik endoteliální dysfunkce akcelerují. K těmto systémovým faktorům se mohou přidat *lokálně působící faktory*, jako jsou turbulence krevního toku (bifurkace cévy, její menší fixace k okolí), vrozené nebo získané cévní anomálie či intravaskulární výkony – angioplastika. (7)

Endoteliální dysfunkce se podílí na vývoji jak časných, tak i pozdních fází aterosklerózy. Sama její přítomnost i bez morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí je dnes akceptovaná jako iniciální fáze aterosklerotického procesu. Dysfunkční endotel umožňuje vyšší průnik aterogenních lipidů. Zvýšenou expresí adhezních molekul a produkcí některých cytokinů usnadňuje také kumulaci monocytů v cévní stěně, jejich přeměnu v makrofágy a pěnové buňky. Nedostatečná produkce NO vede k uplatnění řady růstových faktorů, stimulujících buňky hladkého svalstva k migraci do subendoteliálních prostor a k produkci extracelulárních vazivových komponent aterosklerotických lézí. Už v těchto fázích, kdy morfologické změny cévy nejsou přítomné, anebo jsou hemodynamicky nevýznamné, se může

klinicky manifestovat sklon k vazospasmům, například formou mikrovaskulární anginy pectoris či tranzitorní mozkové ischemie (*amaurosis fugax*).

I v pozdějších fázích endoteliální dysfunkce akceleruje vývoj aterosklerózy. Podílí se na kumulaci makrofágů a pěnových buněk v aterosklerotickém plátu, a prostřednictvím metaloproteináz, které mohou rozrušovat fibrózní čepičku plátu, zvyšuje jeho vulnerabilitu. Nedostatečná produkce NO, prostacyklinu a dalších působků inhibujících adhezi a agregaci destiček, a naopak zvýšená exprese von Willebrandova a tkáňového faktoru navozují protrombogenní stav. Tak může ruptura i hemodynamicky nevýznamného plátu s nasedající trombózou vést k rychlému uzavření tepny zvláště, když endoteliální dysfunkci provází snížená fibrinolýza. K úplnému uzavěru tepny může také přispět už zmíněný zvýšený sklon k vazospasmům.

Předpokládá se, že detekce endoteliální dysfunkce by mohla přispět k identifikaci zatím asymptomatického jedince se zvýšeným rizikem manifestace aterosklerózy. To by umožnilo jeho časnou dispenzarizaci a eventuální zahájení preventivních opatření s cílem pozastavit nebo dokonce navodit regresi aterosklerotického procesu a oddálit tak jeho klinickou manifestaci. (8)

2.2.1 Vlastnosti endotelu při ateroskleróze

Jak již bylo řečeno, ateroskleróza je nejvíce se vyskytující cévní onemocnění ve vyspělých zemích. Před zhruba dvaceti lety bylo zjištěno, že riziko aterosklerózy roste v závislosti na poškození endotelu a zároveň byly objeveny lipidní proužky jako první krok k tomuto poškození s tím, že následná zjevná „obnažení“ cévy, jsou pokročilejší stádium této choroby. (Hasig et al, 1996) Brzy poté přišly důkazy o tom, že morfologicky abnormální endotel není funkční a přispívá k dalšímu rozvoji cévní léze. (Munro & Citran, 1988) Tyto objevy neposkytují pouze informace o patogenezi aterosklerózy, ale také dávají konkrétní doporučení k tomu, jak monitorovat progresi lézí a zefektivňovat léčbu.

Shrnuto ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění s řadou predisponujících faktorů jako je kouření, diabetes, hyperlipidémie, hypertenze, mechanický stres a záněty cév. Jako různorodý a komplexní proces může vést k trvalému endoteliálnímu poškození, popřípadě může vyvolat řadu omezených reparativních mechanismů, které sice vedou k rekonstrukci endotelu, avšak s jeho limitovanou funkčností.

2.3 ATEROSKLERÓZA

2.3.1 Rizikové faktory aterosklerózy

2.3.1.1 Neovlivnitelné faktory

Věk

„Člověk je tak mladý jako jeho cévy.“

Professor Gotthard Schettler (†1996), Univerzita Heidelberg, SRN

Každý člověk stárne, někdo rychleji, někdo pomaleji, ale s ním rovněž stárnou i jeho cévy. Projevuje se zde nejen fyziologické opotřebení, ale i snížená funkce reparativních procesů. Tím, že se lidská populace dnes dožívá poměrně vysokého věku, tím se také setkáváme jako zdravotníci se „staršími“ cévami. Snižují se endoteliální funkce a objevuje se ateroskleróza, což se pak projevuje zvýšeným výskytem ischemickým chorob hlavně u lidí mezi 65. a 85. rokem. Riziko mozkového apoplexu je u 85letého člověka 1000krát vyšší než u 45letého. (9)

Pohlaví

Riziko aterosklerózy se prudce zvyšuje o mužů nad 45 let a u žen nad 55 let. Přitom do 60. roku věku jsou muži postiženi častěji než ženy. Po 60. roku se riziko u obou pohlaví vyrovnává a ženy začnou muže rychle dohánět, až je dokonce předeženou, takže po 75. roce je incidence koronární aterosklerózy vyšší než u stejně starých mužů! Důvodem pro tyto rozdíly specifické pro pohlaví je ženský pohlavní hormon, který ženám poskytuje přirozenou „ochranu“, tzn., že snižuje hladinu LDL a zvyšuje hladinu HDL. Ta je po přechodu stále nižší – s poklesem produkce estrogenu stoupá onemocnění žen dvakrát až třikrát. U žen kuřáček nastává pokles estrogenu přibližně o dva roky dříve a současně se v důsledku rizikového faktoru kouření zvyšuje riziko vzniku aterosklerózy. (10)

Dědičnost

Lidé, jejichž rodiče trpěli aterosklerózou, hypertenzí, rodinnou hypercholesterolemií nebo jinými kardiovaskulárními chorobami, mají výrazně vyšší

riziko výskytu některé z těchto chorob. Potomek je pro nemoc predisponován - může ji, ale nemusí dostat.

Jedna americká studie prokázala, že riziko mozkové mrtvice u mužů, jejichž matka zemřela na mozkovou mrtvici, se trojnásobně zvýšilo. (11)

2.3.1.2 Ovlivnitelné faktory

Výživové faktory

Cholesterol v krvi

Určitá hladina cholesterolu je pro tělo zcela nezbytná, protože cholesterol je důležitou součástí membrán, je základní substancí pro hormony nadledvin, pohlavní hormony a je základní substancí pro žlučové kyseliny. Koncentruje se v nadledvinách, v mozku, v kožním tuku a ve slezině, vaječnicích, v krevním séru a červených krvinkách. Ovšem toto potřebné množství si je schopné tělo syntetizovat samo. Člověk přijímá cholesterol také exogenně s potravou (v ČR průměrně 460mg!!!). Tím klesá produkce endogenně syntetizovaného cholesterolu. Tento regulační mechanismus, udržující stabilní hladinu cholesterolu, je vázán jednou podmínkou: vlastní produkce cholesterolu a exogenní přísun musí být v určité rovnováze. Jestliže přísun z venku příliš stoupne (nad 300mg/den), je možné část cholesterolu ještě odbourat v játrech, ale později dojde k poškození jaterních receptorů. Dojde ke zvyšování cholesterolu v krvi a k poruše cholesterolové výměny a nakonec k hypercholesterolémii. Cholesterol je tedy škodlivý, pouze když je ho mnoho.

Celkový cholesterol má hraniční hodnoty koncentrace v krvi 200–239 mg/dL, přičemž hodnota 200 mg/dL je hraniční mezi „normálním“ a „zvýšeným“ cholesterolem. Tato hodnota udává informace o celkovém cholesterolu a triacylglycerolech. Pokud ovšem udáváme hladinu v jiných jednotkách a to v mmol/l, musíme rozlišovat mezi údaji o cholesterolu a triacylglycerolech. Přepočtení je $200\text{mg/dL}=5,2\text{ mmol/l}$ u cholesterolu a pro triacylglyceroly je to $200\text{mg/dL}=2,28\text{mmol/l}$. Hladina *LDL* by se měla u dospělého člověka pohybovat v rozmezí 130–159 mg/dL. Závisí také na tom, jestli pacient vykazuje ještě některé další rizikové faktory.

Velmi důležité je znát kromě hodnoty celkového cholesterolu také poměr mezi množstvím *LDL* a *HDL*. Hodnota *HDL* by měla být vyšší než 35 mg/dL. Hodnoty *HDL*

se snižují také při kouření cigaret, nadváze, poruchách štítné žlázy a při zvýšených hodnotách triacylglycerolů. (12)

Triacylglyceroly v krvi

Triacylglyceroly (Tg) slouží buňkám těla jako zásobník energie, ochrana orgánů a tepelná izolace. Nadbytek Tg se ukládá do tukové tkáně jako deponovaný tuk. Stejně jako cholesterol si může tělo Tg vyrábět samo (v tukové tkáni nebo v játrech, také syntézou ze sacharidů). Mnoho Tg ale přichází společně s potravou. V krvi jsou Tg vázány hlavně na *VLDL* a vzniká tak jejich transportní forma. Krevní hladina Tg je optimální kolem 200 mg/dL.

Hlavními rizikovými faktory pro příliš vysokou hladinu Tg jsou cukry a alkohol. Dodávají do těla příliš mnoho kalorií (1 gram alkoholu dodá 7,2 kcal). Alkohol je také velmi rychle přeměňován na tuk a zpomaluje odbourávání tuku a cholesterolu v játrech. (12)

Cukry a diabetes mellitus

Trvale vysoké hodnoty krevního cukru (nalačno nad 120mg/dL a po jídle nad 200mg/dL) poškozují v krátké době cévní stěny, usnadňují pronikání cholesterolu do buněk a příznivě ovlivňují proces aterosklerózy s těžkými následky. U diabetiků je také jiné složení lipoproteinů než u zdravých lidí. Vyskytují se u nich ve zvýšené míře malé aterosklerózu podporující částičky, takže zvýšení hodnot cholesterolu je u nich ještě větším rizikovým faktorem než u lidí netrpících cukrovkou. Diabetici umírají na infarkt třikrát častěji než nediabetici.

Pokud není při cukrovce dobře vyregulován krevní cukr, stoupají hodnoty krevních tuků, cholesterolu a triacylglycerolů. Proto je diabetes značným rizikem aterosklerózy. Vysoké hodnoty krevního cukru podporují usazování cholesterolu ve velkých tepnách, které zásobují kyslíkem mozek a srdce. Ještě jednoznačnější je souvislost s onemocněním malých srdečních a mozkových artérií. Zde dochází k houstnutí spojovací tkáně, které nakonec končí uzavřením cévy. (13) Mezi osobami dlouhodobě nemocnými cukrovkou se také často vyskytuje hypertenze. U diabetiků typu 1 koreluje výskyt hypertenze s délkou onemocnění, u diabetiků typu 2 nikoliv. Redukce hmotnosti často vede nejen k úpravě diabetu, ale i hypertenze.

Glukóza a produkty neenzymové glykace jsou výkonnými lapači radikálu NO. Glukóza tak může způsobit endoteliální dysfunkci a může se podílet na jejím dalším zhoršování.

Faktory mimo výživu

Nedostatek pohybové aktivity – nadváha a obezita

Lidé, kteří jsou pravidelně fyzicky aktivní, mají jen poloviční riziko výskytu cévních onemocnění. Vytrvalostní fyzická aktivita nejen snižuje hladinu LDL, triacylglyceroly a krevní tlak, ale i zvyšuje HDL. Výsledkem je zřetelné snížení rizika aterosklerózy.

Nadváha vzniká, jakmile člověk přijímá více energie, než spotřebuje. Potřeba výživných látek závisí na fyzické aktivitě, věku a pohlaví. Ženy obecně potřebují o něco menší příjem než muži a starší lidé podstatně méně než mladí.

Obezita je spojena s řadou metabolických poruch, jako jsou dyslipidémie, inzulinorezistence, endoteliální dysfunkce a další. Metabolické abnormality, které provázejí obezitu, jsou známými rizikovými faktory závažných organických (aterosklerotických) změn. (9)

Hypertenze

Tak zvaná primární neboli esenciální hypertenze (hypertenze z neznámých příčin) tvoří asi 95% všech případů. Trpí jí zhruba každý pátý dospělý občan.

Vyšší hodnota krevního tlaku než je 140/90 mmHg výrazně zatěžuje srdce a poškozuje endotel cévy. Hodnota nad 160/95 mmHg je již hodnocena jako vysoký krevní tlak.

Kouření

Asi čtvrtina všech onemocnění cév je způsobena kouřením. Při kouření cigaret se uvolňují volné radikály, které napadají částičky LDL, vzniká tak oxidační stres, který urychluje rozvoj aterosklerózy. Kouření také podporuje proces stárnutí, což platí hlavně u žen, ty také přicházejí o dva roky dříve do přechodu.

Kouření zužuje malé arterie v mozku, takže tlumí jeho zásobení krví. Kombinace kouření a vysokého krevního tlaku vede v souladu s tím ke značnému zvýšení rizika mozkové mrtvice. Je také prokázáno, že kouření zesiluje sklon krevních

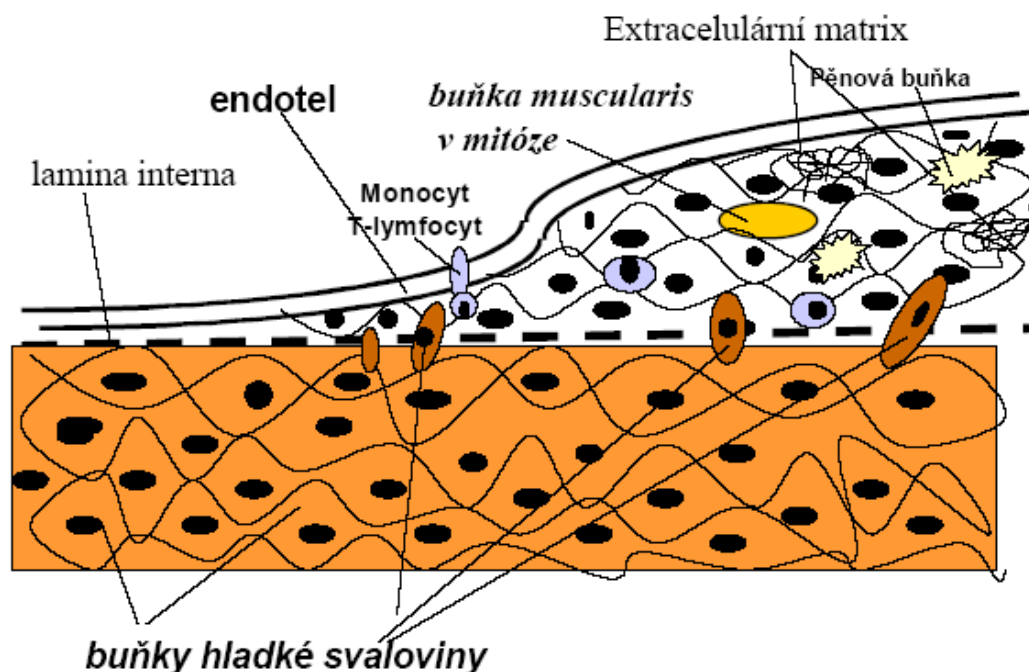
destiček ke shlukování a nepříznivě ovlivňuje složení krevních tuků, navíc podporuje vývoj aterosklerotických usazenin na velkých arteriích, které zásobují mozek.

Následkem kouření je také vzestup krevního cholesterolu. Poměr mezi HDL a LDL cholesterolem je nižší než u nekuřáků. (14)

2.3.2 Patogeneze aterosklerózy

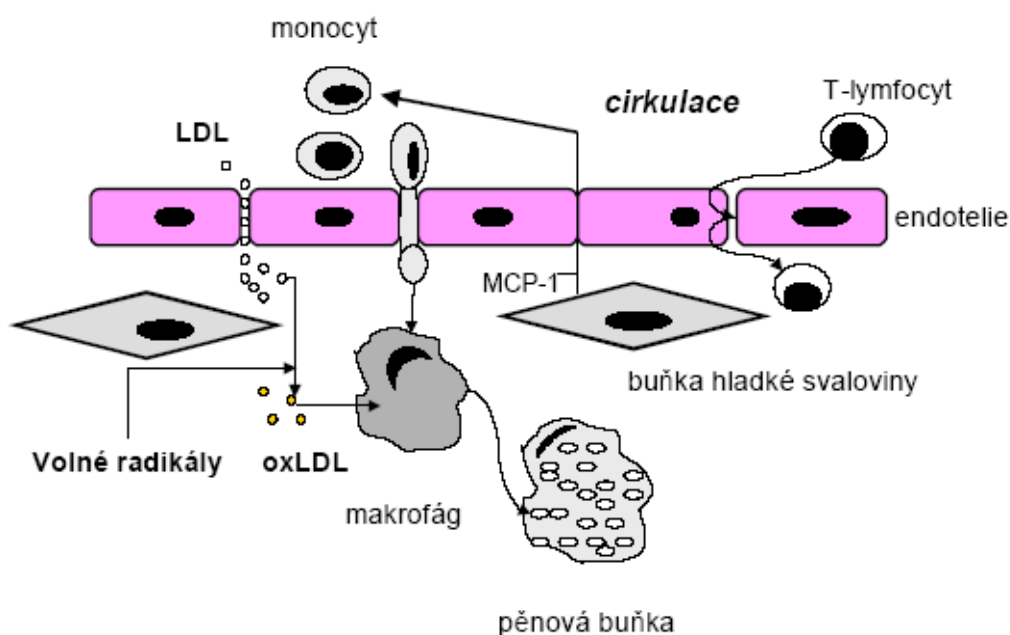
Ateroskleróza, jak již bylo několikrát řečeno, je systémové onemocnění postihující cévy tepenného řečiště (velké a střední); z klinického hlediska mají největší význam léze srdečních věnčitých tepen, extrakraniálních tepen zásobujících mozek, eventuálně dalších orgánů (ledviny). Na patogenезi aterosklerózy se podílí komplex po sobě jdoucích událostí, zahrnujících rozvoj *chronického zánětlivého procesu* stěny arterií jako odpověď na hemodynamické poškozování cévní stěny v nejvíce namáhaných místech, jejíž příčina nebyla odstraněna a proces nebyl neutralizován. To způsobuje nejprve dysfunkci cévního endotelu s tvorbou cytokinů, adhezních molekul a růstových faktorů. Aktivované endotelové buňky přitahují do místa léze monocyty/makrofágy a T-lymfocyty z krevní cirkulace, buňky hladké svaloviny z medie, subendotelový prostor se postupně zvětšuje a současné zvýšení permeability endotelové výstelky umožňuje pronikání lipoproteinových částic do tohoto prostoru. Dochází v nich k lipoperoxidaci působením reaktivních forem kyslíku a dusíku, které nebyly zneškodněny antioxidačním mechanismem. Uvolněný cholesterol je pohlcován makrofágy za vzniku pěnových buněk; stěna cévy se v místě poškození ztlušťuje (migrací a proliferací buněk hladké svaloviny, tvorbou extracelulární matrix, nekrotickými depozity z rozpadlých pěnových buněk), a dostává prokoagulační vlastnosti. Celý proces vyúsťuje do *tvorby aterómu* (aterómového plátu). Klinické příznaky se projeví, až když se pokročilé léze cévní stěny komplikují rupturou obalu aterómového plátu, krvácením do plátu, vznikem trombózy nebo embolu.

Obrázek 2. Schéma ztlušťování artérie v průběhu aterosogeneze (převzato z internetových stránek: <http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



Příčiny endotelové dysfunkce vedoucí k ateroskleróze zahrnují hemodynamickou zátěž, zvýšení a modifikaci LDL-částic, tvorbu reaktivních forem kyslíku a dusíku, zvýšený arteriální tlak, diabetes mellitus, genové alterace kódující progresi zánětlivé a reparační odpovědi, zvýšenou hladinu homocysteinu a také přítomnost infekčních agens jako jsou herpetické viry, cytomegalovirus, virus Epsteinova a Barrova, Hemophilus influenzae, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae nebo Helicobacter pylori. Dysfunkce endotelu, způsobená těmito vlivy, vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti cévního endotelu. Zvyšuje se adhezivita endotelových buněk vzhledem k leukocytům nebo krevním destičkám, roste permeabilita cévní stěny, endotelie získávají prokoagulační vlastnosti namísto antikoagulačních a zvyšuje se produkce vazoaktivních molekul, cytokinů, chemokinů i růstových faktorů. (15)

Obrázek 3. Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu (převzato z internetových stránek: <http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



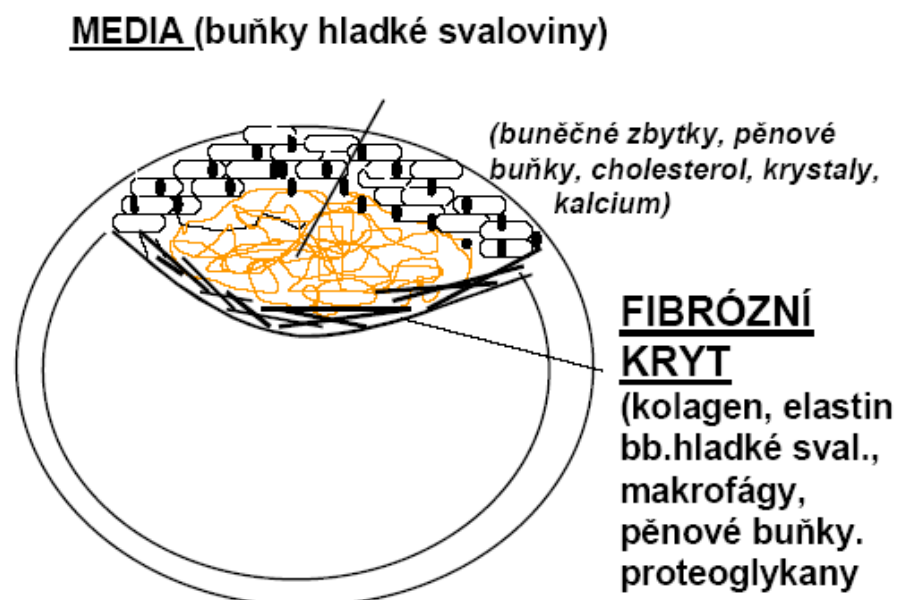
Když tato zánětlivá odpověď nedokáže vyvolávající příčiny odstranit a není-li účinně neutralizována nebo potlačena obrannými mechanismy, postupuje ve svých účincích dále. Migrace a proliferace buněk hladké svaloviny pokračuje; myocyty pronikají do oblastí zánětu, dochází k jejich aktivaci, tvorbě extracelulární matrix. Dochází k nakupení makrofágů a T-lymfocytů v subendotelovém prostoru ve stěně cévy, která se takto ztlušťuje. Toto *ztluštění* je nejprve kompenzováno dilatací a lumen cévy zůstává zpočátku nezměněno (fenomén remodelace). Pokračující zánět zvyšuje počet makrofágů a lymfocytů, které se sem dostávají z krevního oběhu nebo vznikají na místě léze proliferací. Makrofágy fagocytují oxidované LDL-částice, které pronikly do intimy a vznikají z nich *pěnové buňky*. Aktivace makrofágů a T-lymfocytů vede k dalšímu uvolňování cytokinů, chemokinů (monocytový chemoatraktant-protein 1 = MCP-1), hydrolytických enzymů a růstových faktorů, které navozují další poškození, eventuálně způsobují ložiskovou nekrózu. A tak postupující akumulace monocytů/makrofágů, migrace a proliferace buněk hladké svaloviny a tvorba fibrózní tkáně vede k dalšímu rozšiřování a restrukturalizaci léze, která se pokrývá vazivovou čepičkou, zakrývající lipidové jádro s nekrotickými hmotami (*ateromový plát*). To je stádium pokročilé komplikující léze arteriální stěny. Od určité doby arterie nemůže kompenzovat lézi pronikající do lumen cévy dilatací, které se zmenšuje, což vede ke

snížení průtoku cirkulující krve. Na zhrubnělém povrchu léze (ateromového plátu) adherují trombocyty. Jejich aktivací se uvolňují granula obsahující cytokiny a růstové faktory, které spolu s trombinem přispívají k další migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny a monocytů. Aktivací destiček také vzniká *arachidonová kyselina*, která se přeměňuje (působením cyklooxygenázy 1) na prostaglandiny jako je tromboxan A₂, který je velice potentním vazokonstriktorem a látkou agregující trombocyty; z arachidonové kyseliny také vznikají (působením lipooxygenázy) leukotrieny, amplifikující zánětlivou reakci.

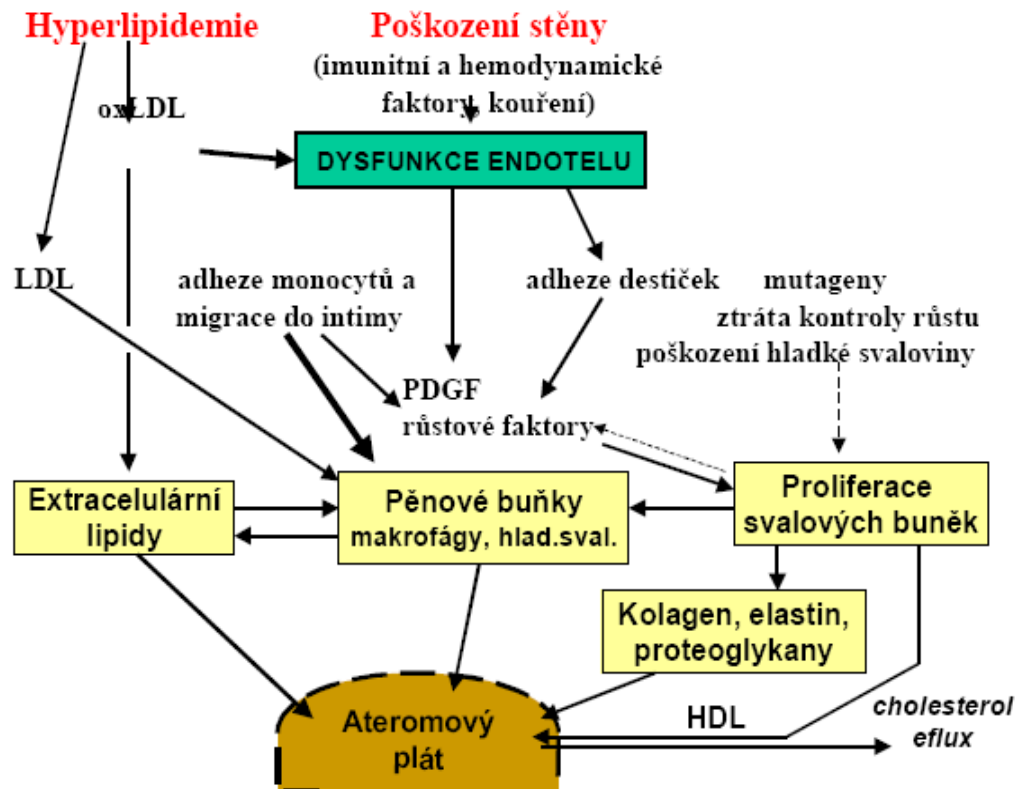
Pokud fibrózní čepička pokrývající ateromový plát zůstává dostatečně tlustá, nehrozí takové nebezpečí z obturace lumen artérie. Jakmile však dojde k jejímu ztenčování působením metaloproteináz (kolagenáz, elastáz, stromelyzín) uvolňovaných z makrofágů po aktivaci T-lymfocyty, vzniká tak stádium *nestabilního plátu*, kdy hrozí ruptura plátu, průnik krve do jeho nitra a vznik obturujícího trombu. Uzavěr lumen cévy vede k akutní hypoxii, se všemi jejími důsledky pro zásobenou tkáň.

(16)

Obrázek 4. *Schéma ateromového plátu* (převzato z internetových stránek: <http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



Obrázek 5. Schéma mechanismu rozvoje aterosklerózy (převzato z internetových stránek: <http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



2.4 ADHEZNÍ MOLEKULY

Adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Nepůsobí pouze jako pasivní lepidlo, ale účastní se také přenosu signálů mezi buňkami a podílí se tak na interakci buněk s okolním prostředím. Adhezní molekuly se účastní řízení řady fyziologických dějů, jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciace, hojení ran, či obnova tkání. Uplatňují se ale také při patologických procesech, kde se např. podílejí na interakcích mezi složkami imunitního systému. (17)

Podle strukturálních vlastností je můžeme rozdělit do čtyř základních skupin. Jsou to **selektiny, integriny, imunoglobulinová skupina a kadheriny**.

2.4.1 Selektiny

Jsou známy 3 základní typy selektinů: **L** (leukocytární), **E** (endoteliální), **P** (destičkové). Strukturou jsou to proteiny obsahující na svém N-konci lektinovou nebo lecitinovou doménu, která se účastní interakce s příslušnými ligandy (nejčastěji sacharidovými). Obecně mají význam při počátečních fázích zachycování leukocytů na endoteliích.

2.4.2 Integriny

Jejich strukturu tvoří transmembránové glykoproteiny se dvěma nekovalentně asociovanými podjednotkami α a β , obsahují N-konec, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Dodnes je popsáno nejméně 16 α podjednotek a 8 β podjednotek, které mohou vytvořit až 20 heterodimerních kombinací. Jsou exprimovány na leukocytech, trombocytech i endotelu. (18)

Jejich funkce spočívá v tom, že vážou složky mezibuněčné hmoty, kolagen, fibronectin a laminin. Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou významné.

2.4.3 Imunoglobulinová skupina

Imunoglobulinová skupina adhezních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se imunoglobulinovými doménami z beta řetězců.

Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu v buňce druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce). (19) Patří sem celá řada adhezních molekul jako antigenně specifické receptory T a B lymfocytů (TCR, BCR), koreceptory T lymfocytů (CD4 a CD8), které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci vascular cell adhesion molecule-1 (**VCAM-1**), intercellular cell adhesion molecule-1 (**ICAM-1**) a platelet cell adhesion molecule-1 (**PECAM-1**).

Exprese VCAM-1 a ICAM-1

VCAM-1 i ICAM-1 jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami. (18) Studie na králících a myších prokázaly, že VCAM-1 je endoteliálními buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů; a to v oblastech, které jsou predispoziční ke vzniku lézí, přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především shear stresem. ICAM-1 je exprimován ve stejných oblastech jako VCAM-1, ale exprese ICAM-1 je pozorována i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí. (20) U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován především endoteliálními buňkami, přičemž VCAM-1 je exprimován i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován většinou buněk, které se nacházejí v intimě cév. Přesto se ukazuje, že VCAM-1 je exprimován především v oblastech výskytu lézí, zatímco ICAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami i mimo aterosklerotickou lézi.

Exprese těchto adhezních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Hypercholesterolémie, oxidované LDL a diabetes zvyšují expresi jak ICAM-1, tak VCAM-1. (21) Také kouření, hyperhomocysteinémie, hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi

VCAM-1 a ICAM-1. Exprese obou těchto molekul je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- α nebo IL-1.

PECAM-1

PECAM-1 je exprimován konstitučně na klidovém cévním endotelu, leukocytech, trombocytech, podílí se na angiogenezi a na transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostorů.

2.4.4 Kadheriny

Kadheriny představují hlavní strukturální glykoproteidy, které tvoří adherentní mezibuněčné spoje zvané zonula adhaerens (adherens junctions). Jsou tvořeny 5 extracelulárními doménami, jejichž vazba je stabilizována vápenatými ionty, transmembránovou oblastí a cytoplazmatickou doménou.

Obecně se podílí na diferenciaci, proliferaci a migraci buněk, na angiogenezi a na reparaci poškozené tkáně. Ve vztahu k ateroskleróze mají největší význam epiteliální (**E**)-**kadherin** a vaskulární-endoteliální (**VE**)-**kadherin**. (22)

2.5 APOE MODEL ATEROSKLERÓZY

ApoE-deficientní myš je považována za jeden z nejrelevantnějších modelů pro aterosklerózu, protože je hypercholesterolemická a rozvíjí spontánně arteriální léze. Přirozeně mívají myši vysoké hladiny HDL a nízké hladiny LDL, na rozdíl od lidí, kteří mají vysoký LDL a nízký HDL. Navíc myši zjevně postrádají enzym cholesterylestertransfer-protein, jenž transportuje ester cholesterolu z HDL do VLDL a LDL. Přes tyto rozdíly mají apoE-deficientní myši fenotypy podobné těm u apoE-deficientních lidí. ApoE-deficientní myš vykazuje úplné spektrum lézí pozorovaných během aterosklerózy a byla prvním myším modelem v rozvoji lézí podobných těm lidským. Tento model poskytuje příležitost ke studiu patogeneze a terapie aterosklerózy u malých, geneticky definovaných zvířat. Složitost lézí u apoE-deficientních myši spolu s prospěšností využití myši jako modelu lidské choroby vytvářejí vhodný systém ke studiu obou environmentálních a genetických determinant aterosklerózy. Data taktéž naznačují, že kromě histologické podobnosti s člověkem, vykazuje myší model odezvu na environmentální podněty podobně jako je tomu u lidí.

Chronologická analýza aterosklerózy u apoE-deficientních myši odhalila následující děje ve *tvorbě lézí* na tomto modelu. Již 5 až 6-ti týdenní zvířata mají monocytární adheze k endoteliálnímu povrchu aorty, což lze snadno hodnotit elektronovou mikroskopií. Ta také demonstrovala transendoteliální migraci krevních monocytů u přibližně starých myši. Ve věku 6 až 10-ti týdnů jsou u většiny apoE-deficientních myši vyvinuty léze tukových proužků, skládajících se primárně z pěnových buněk s migrujícími hladkosvalovými buňkami. Tyto proužkové léze rychle progredují v pokročilé léze, sice heterogenní, avšak typicky složené z nekrotického jádra, obklopeného proliferujícími hladkosvalovými buňkami a lišícími se v množství extracelárního matrix, zahrnujícího kolagen a elastin. Tyto léze mají dobře vytvořenou fibrózní čepičku z hladkosvalových buněk a extracelárního matrixu, často se skupinou pěnových buněk. U zánětlivých lézí není neobvyklá eroze hluboko do mediální stěny aorty, u některých z těchto zvířat se vyvinou aneurysmata aorty. Mnoho těchto lézí u starších myši rozvíjí kalcifikační ohnisko.

Léze u apoE-deficientních myši jako i u lidí mají tendenci se vyvíjet ve větvičích se místech cév a postupují ze stádia pěnových buněk do fibroproliferativního s dobře ohraničenými fibrózními čepičkami a nekrotickými lipidovými jádry, a to i přesto, že právě ruptura plátu nebyla pozorována u apoE-deficientních myši či dalších myších

modelů. Progrese lézí se objevuje v rychlejším poměru než u lidské aterosklerózy, rychlost progrese lézí může být výhodná za mnoha experimentálních situací. Hlavním rozdílem tohoto myšího modelu, což je případ většiny dalších modelů experimentální aterosklerózy, je, že není pozorována ruptura plátu, zatímco ruptura plátu je zcela běžná u lidí a může vést k srdečním atakám. Jedním možným důvodem chybění ruptury u myši je průměr aorty, který je menší než 1 mm, což je dokonce méně než průměr hlavních koronárních artérií u člověka. S poklesem průměru cév vzrůstá exponenciálně povrch; proto může být u myši tak značný povrch, že není pravděpodobný výskyt ruptury plátu.

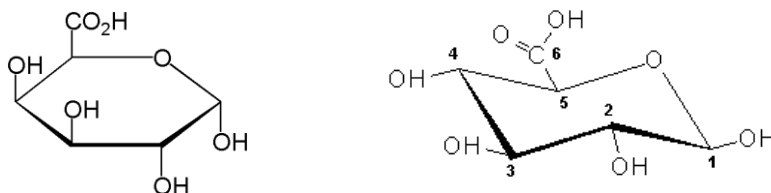
Další charakteristiky těchto lézí u apoE-deficientních myši, jako jsou známky *oxidačního poškození*, zasluhují stejnou pozornost. Aterosklerotické léze u těchto myši obsahují oxidačně-specifické epitopy. U mladých lézí jsou tyto epitopy přednostně lokalizovány v místech bohatých na makrofágy, kdežto v pokročilých lézích se nacházejí v nekrotických oblastech. Navíc se u apoE-deficientních myši nacházejí v plazmě vysoké titry protilátek proti oxidovaným epitopům.

Úvodní studie zkoumaly efekty očividně **rozdílné stravy** na vnímavost k ateroskleróze u těchto zvířat. Tyto studie potvrdily platnost myši jako modelu lidské aterosklerotické nemoci a položily základy pro budoucí dietní studie. Hayek et al. vyvinuli pro studie myši fyziologičtější dietu „západního typu“, než je Paigenova dieta, - je podobná ve složení průměrné americké stravě před několika lety (složením 21% tuku z hmotnosti, 0,15% cholesterolu a žádné kyseliny cholové). Pokud se krmí touto stravou, mají kontrolní myši 2x zvýšenou hladinu cholesterolu v plazmě, zatímco apoE-deficientní myši více než 3x (až kolem 2000 mg/dL) – většinou do bVLDL, ale také vzrůst LDL. Postprandiální clearance lipoproteinů odvozených ze střeva je dramaticky narušena u apoE-deficientních myši.

ApoE-deficientní myš odpovídá přiměřeněji lidské stravě „západního typu“. Na této stravě je tvorba léze značně urychlena a velikost léze roste. U 10-ti týdenních zvířat krmených touto stravou pouze po 5 týdnů je pozorovaná velikost lézí 3-4x větší než u myši krmených nízkotučnou dietou. Navíc se monocytární adheze a pokročilé léze rozvíjejí ve zřetelně časnějším věku. Výsledky tohoto dietárního problému demonstrují, že myší model odpovídá vhodnějším způsobem, tj. zvýšený tuk vede k vzrůstu plazmatického cholesterolu, jenž zase vede k vzestupu aterosklerózy.

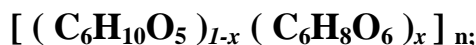
2.6 MDOC (MODIFIKOVANÁ OXIDOVANÁ CELULÓZA)

2.6.1 Struktura



Základní funkční jednotka oxidované celulózy je anhydroglukuronová kyselina (IUPAC nomenklatura: -D-glucopyranuronic acid) se strukturálním vzorcem, kde malé číslice 1 až 6 znázorňují konvenční číslování uhlíkových atomů s pyranózovým cyklem. Kdyby byly všechny anhydroglukózové jednotky na otevřeném celulóзовém řetězci oxidovány tímto způsobem, byl by obsah COOH skupin kolem 25,6% hmotnosti. Současné lékopisné články (USP XXIII, str. 318-9; BP 1993, str. 1281) specifikují obsah COOH na rozmezí od 16 (či 18) do 24% b/w; s ohledem na fakt, že ne všechny anhydroglukózové jednotky jsou nutně oxidovány.

Je-li celulóza popsána jako polyanhydroglukóza, „oxidovaná celulóza“, připravená selektivní oxidací primárních alkoholických skupin (C₆) na karboxyly, pak může být obecně popsána jako statisticky náhodný kopolymer z jednotek anhydroglukózy a anhydroglukuronové kyseliny. Odpovídající **molekulární vzorec** může být napsán takto:



kde n je stupeň polymerizace, a $x \in <0,1>$ je průměrný stupeň oxidace daný:

$$\chi = \frac{M_{Glu}}{(M_{COOH} / W_{COOH}) - (M_{GlAc} - M_{Glu})};$$

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

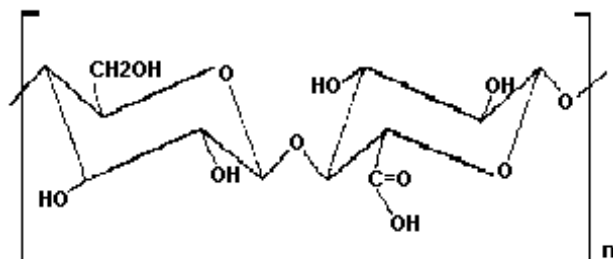
M_{GlAc} = molární hmotnost glukuronové kyseliny (176 g/mol)

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

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

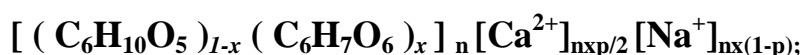
Takto například $x=0$ popisuje čistou celulózu, $x=1$ plně oxidovanou celulózu s obsahem karboxylových skupin kolem 25,6%, je-li $x=0,5$ odpovídá to 1:1 kopolymeru s karboxylovým obsahem 13,3% m/m.

Strukturální vzorec tohoto **kopolymeru** je:



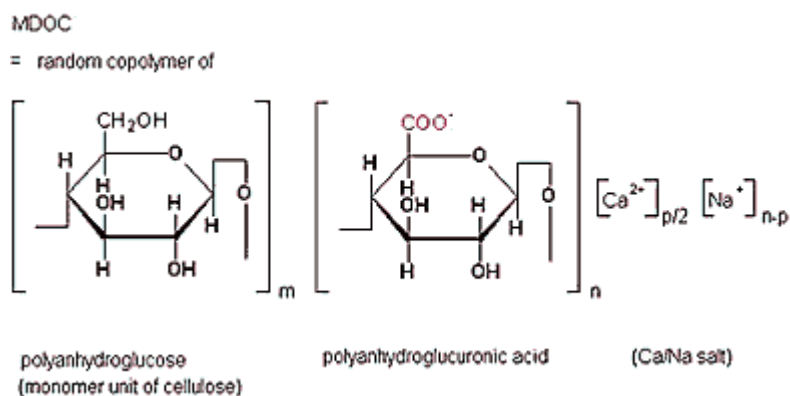
Mělo by být pochopitelné, že oxidovaná celulóza není plně popsána výše uvedeným vzorcem. Je založena na vrozeně nehomogenním, přírodním, nezpracovaném materiálu, který je-li selektivně, ne zcela, oxidován na C₆ uhlíku, povede k oxidovanému produktu, také obsahujícímu vedlejší produkty jiných oxidačních cest. Sekundární alkoholické skupiny mohou být taktéž oxidovány a některé glukózové cykly otevřeny, a tyto cykly pak podrobeny další oxidaci.

Ve světle předchozího může být napsán **obecný vzorec** MDOCTM produktu – vápenaté/sodné soli oxidované celulózy:



kde p a $(1-p) <0,1>$ představují molární frakci Ca^{2+} a Na^+ iontů, respektive i dalších;

Strukturálně:



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

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Samci myši 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). Všechny myši byly v 5-ti 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.

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.

3.2 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).

3.2.1 ELISA analýza

Analýza hladin IL-6 a VCAM-1 v krevním séru 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).

3.3 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, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 1 hodinu inkubovaly 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 diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách) 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 CD106 (VCAM-1) – zředění 1/100

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

Pracovní postup

1. oschnutí řezů	60 minut
2. fixace v acetonu (uschovaný v – 20 stupních)	15 minut
3. usušení	15 minut
4. PBS	10 minut
5. 10% zvířecí sérum v PBS (900 μ l PBS + 100 μ l séra)	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% sérum v PBS (900 μ l PBS + 100 μ l séra)	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	

3.3.1 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí

Plochy endoteliální exprese endoglinu, VCAM-1 a PECAM-1 byly kvantifikovány pomocí stereologických metod. (23) Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μm (0,385 mm 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. (24) 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).

3.4 STATISTICKÁ ANALÝZA

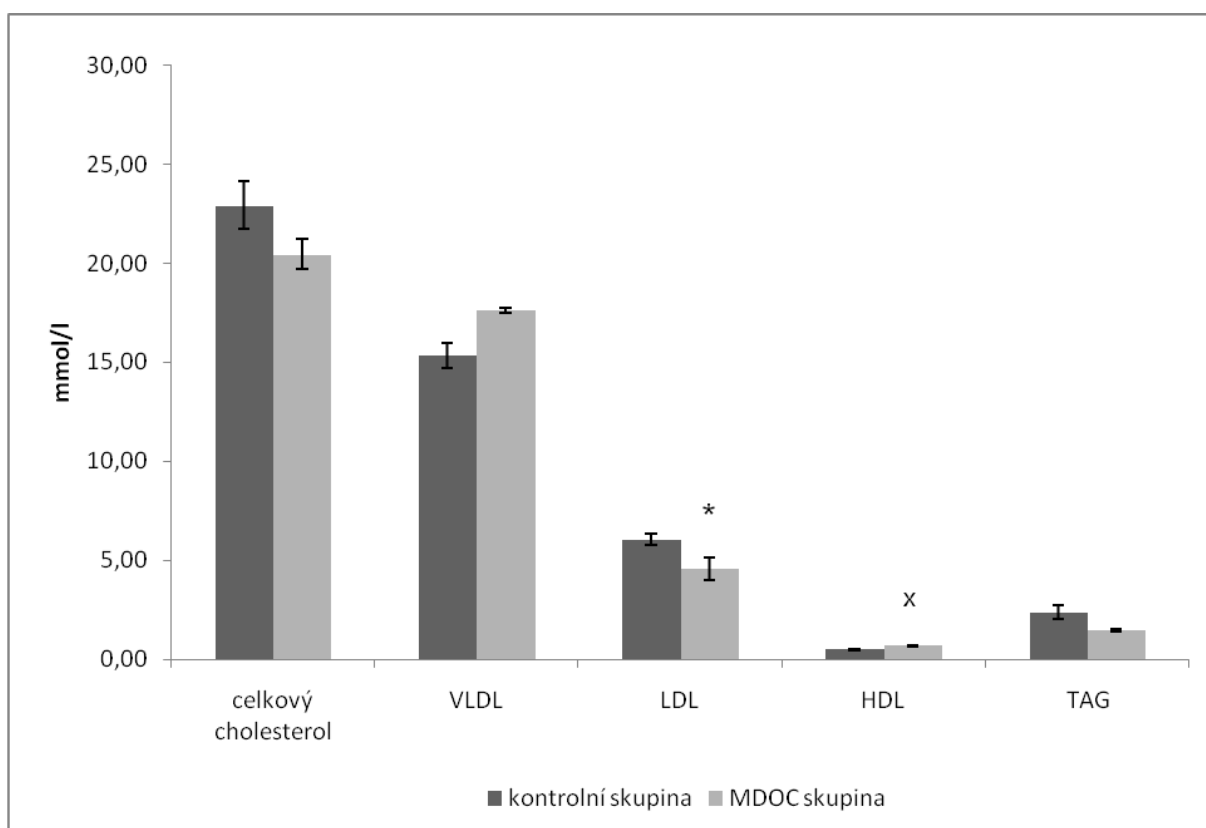
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byl použit neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu a jednotlivých lipidových frakcí. Výsledky ukázaly, že podávání MDOC neovlivnilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu ani triacylglycerolů. Naproti tomu jsme zaznamenali statisticky významné snížení hladin LDL cholesterolu a rovněž statisticky významné zvýšení hladiny HDL cholesterolu (viz obr. 6).

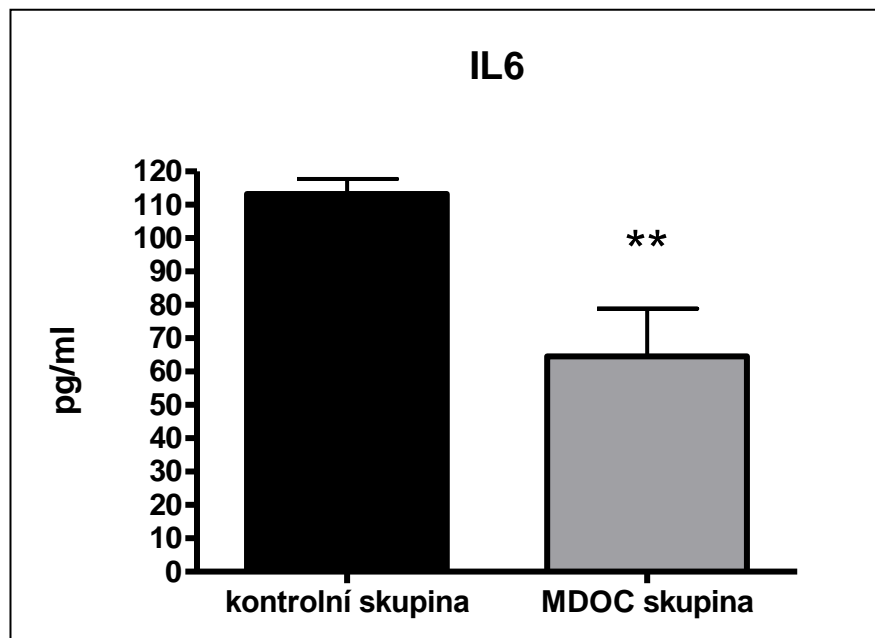
Obrázek 6. *Lipidový profil u kontrolních a MDOC krmených myší. Čtyřtýdenní podávání MDOC statisticky významně snížilo hladiny LDL cholesterolu (* $P \leq 0,05$) a zvýšilo hladiny HDL cholesterolu ($^x P \leq 0,05$).*



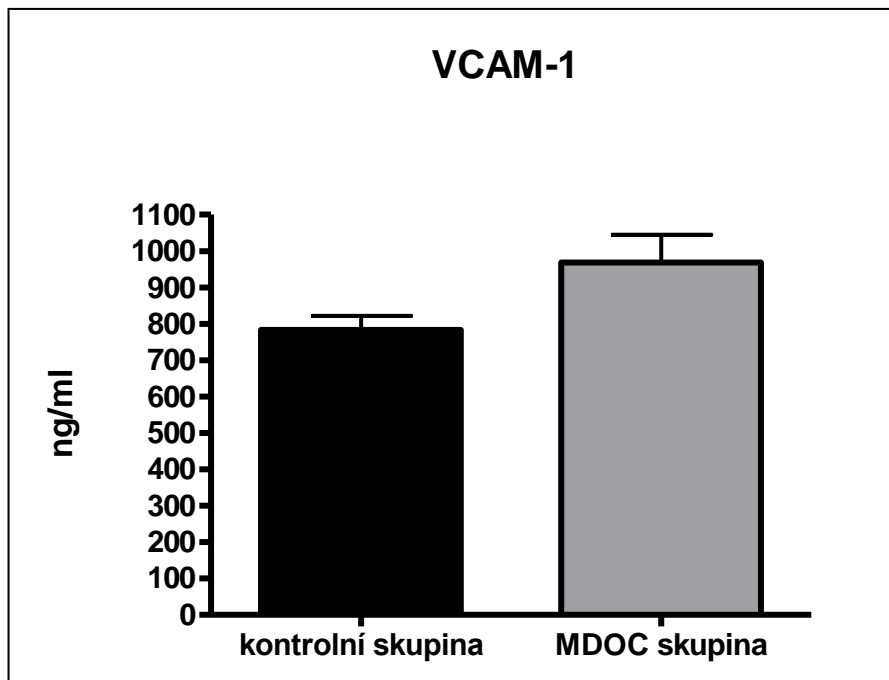
4.1.1 ELISA analýza

Byla provedena analýza sérových koncentrací prozánětlivých markerů IL-6 a VCAM-1. Hladina **IL-6** byla po podávání MDOC signifikantně snížena (viz obr. 7). Naproti tomu koncentrace **VCAM-1** v séru nebyla po podávání MDOC signifikantně ovlivněna, respektive mírně zvýšena (viz obr. 8).

Obrázek 7. Hladiny **IL-6** u kontrolní a MDOC skupiny. Podávání MDOC vedlo ke statisticky významnému snížení hladin IL-6 v porovnání s kontrolní skupinou (** $P \leq 0,05$).



Obrázek 8. *Hladiny VCAM-1 u kontrolní a MDOC skupiny. Podávání MDOC hladiny VCAM-1 v krvi v porovnání s kontrolní skupinou.*



4.2 IMUNOHISTOCHEMIE

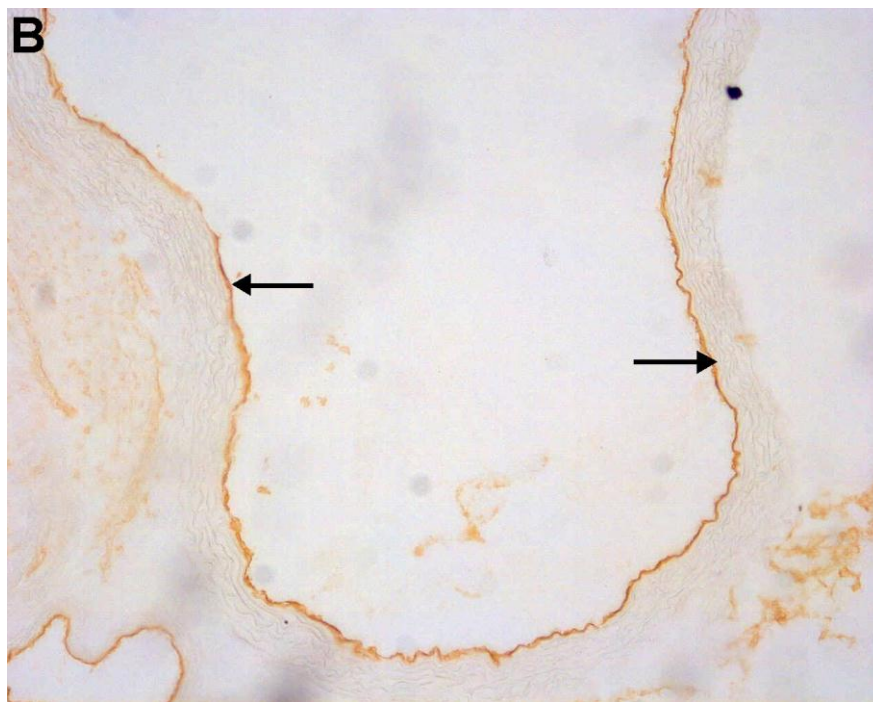
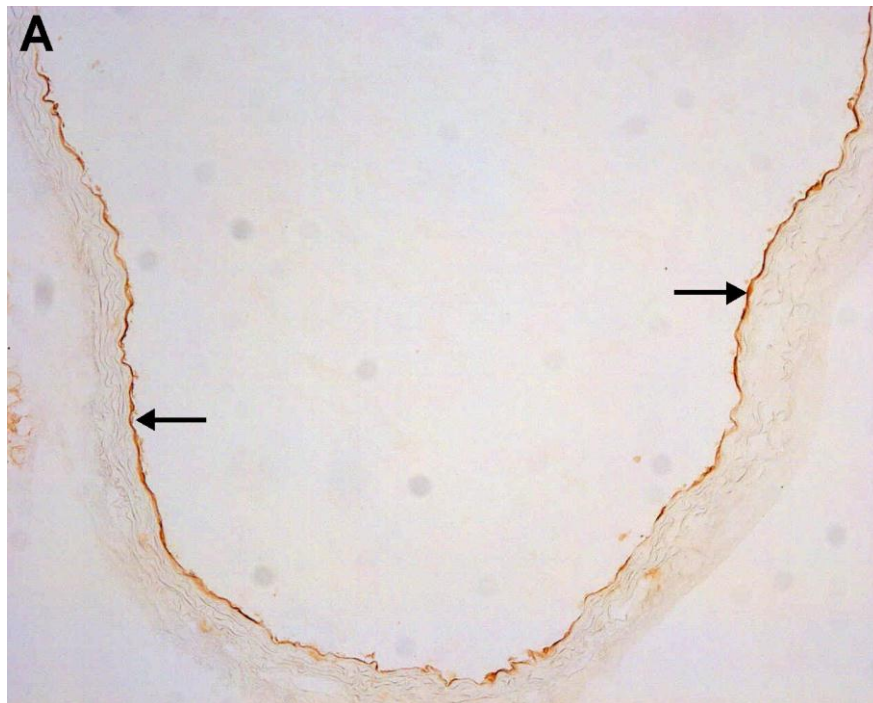
4.2.1 Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu

V oblasti aortálního sinu a oblouku nebyly u žádné z myší přítomny aterosklerotické léze nebo jiné morfologické abnormality.

Expresí PECAM-1 byla zjištěna v endotelových buňkách ve všech skupinách myší. Tato protilátka byla použita jako standard pro detekci intaktního endotelu, protože její exprese by neměla být změněna při změnách hladin cholesterolu.

Expresí **VCAM-1** byla pozorována převážně v endotelu aorty u obou skupin zvířat. Pouze velmi slabá exprese byla nalezena v kapilárách okolního myokardu. Podávání MDOC nevedlo ke změně intenzity barvení VCAM-1 (viz obr. 9).

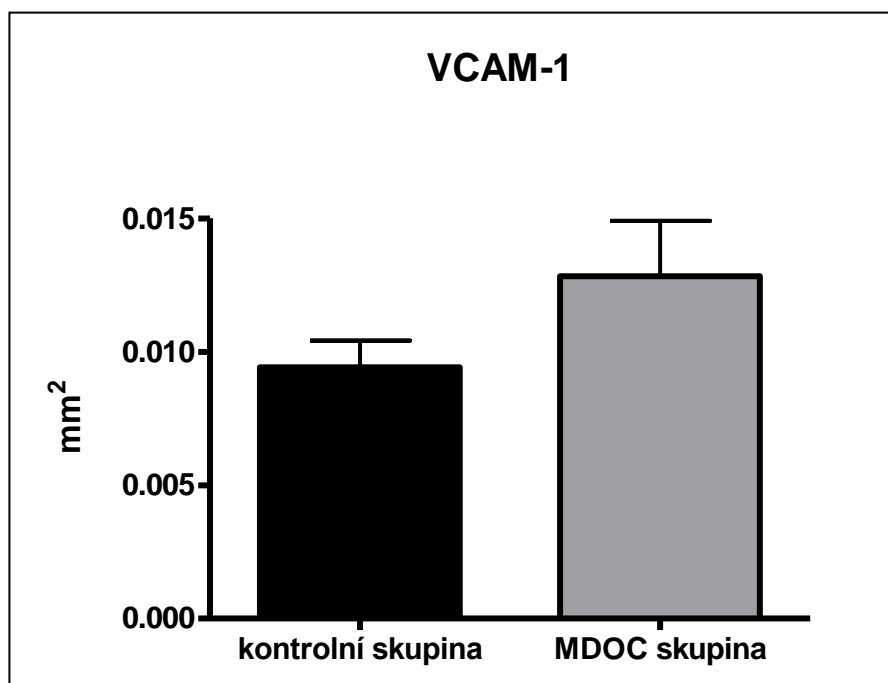
Obrázek 9. *Expresse VCAM-1 na endotelu v oblasti aortálního sinu u kontrolní (A) a MDOC skupiny (B). Z obrázku je patrná stejná lokalizace a intenzita barvení u obou skupin. Zvětšení 100x.*



4.2.2 Stereologická analýza exprese endoglinu u ApoE deficientních myší

Stereologická analýza imunohistochemického barvení cév ze všech zvířat potvrdila nálezy popsané v předchozím obrázku. Plocha endoteliální exprese VCAM-1 nebyla po podávání MDOC změněna (viz obr. 10).

Obrázek 10. Plocha VCAM-1 exprese v aortálním sinu a oblouku. Endoteliální exprese VCAM-1 byla po podání MDOC dokonce mírně zvýšena.



5. 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. (25)

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu. (26)

Ačkoli se tento model zprvu vyvíjel slibně, měl dva zásadní problémy. Oproti lidským aterosklerotickým lézím, které se vyskytují ve větvích hlavních cév, kde pláty progredují, myši léze jsou malé, vyskytují se pouze v oblastech aortálního oblouku a nedochází k jejich progresi. Strava, kterou jsou myši krmeny, je nefyziologická, obsahuje 10 – 20x více cholesterolu a žlučových kyselin. Tato strava vyvolá chronický zánět pouze u citlivých kmenů myši, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohadu, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myši jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE). (27) ApoE jsou tvořeny primárně v játrech a mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá – jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků, obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myši se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid,

interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a 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. (28)

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky *statiny*.

Nicméně bylo také prokázáno, že podávání *dietní vlákniny* má pozitivní vliv na kardiovaskulární systém a to včetně hladiny cholesterolu. (29) 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. (30) Vlákninu můžeme rozdělit na nestravitelné oligosacharidy (inulin), trávení rezistentní škrob, nerozpustnou dietní vlákninu (celulóza, 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 stolici, 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 insulinémie, potlačení syntézy cholesterolu v játrech zvýšením přívodu kyseliny propionové portálním oběhem do jater. (31)

MDOC tedy modifikovaná oxidovaná celulóza je chemicky de facto polyanhydroglukuronová kyselina. Svými vlastnostmi se pravděpodobně může řadit mezi rozpustnou vlákninu.

Tato rigorózní práce byla tedy zaměřena na sledování účinků MDOC, podávané apoE-deficientním myším krmným také aterogenní dietou.

Výsledky biochemické analýzy prokázaly pozitivní vliv MDOC na hladiny LDL a HDL cholesterolu. Dále byla nalezena snížená hladina prozánětlivého IL-6. Tyto

výsledky naznačují potenciální hypolipidemické účinky MDOC. Nicméně je potřeba provést další studie, ve kterých by se popsali mechanismus hypolipidemického účinku MDOC a její případný vliv na aterogenní proces a velikost a složení aterosklerotických plátů.

6. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce se zabývala existencí potencionálních hypolipidemických a protizánětlivých účinků modifikované oxidované celulózy, MDOC.

Výsledky ukázaly na pozitivní vliv MDOC na hladiny LDL a HDL cholesterolu. Dále byl prokázán protizánětlivý účinek daný snížením hladiny IL-6. Na druhou stranu nebyl prokázán vliv na celkový a VLDL cholesterol a hladiny VCAM-1.

Dosavadní výsledky studií s MDOC ukazují na jeho potenciální hypolipidemické a protizánětlivé účinky u apoE-deficientního modelu aterosklerózy. Další studie však musí být zaměřeny na ověření mechanismu účinku MDOC, na jeho vliv na aterogenní proces u pokročilejších aterosklerotických plátů a případnou kombinaci s jiným hypolipidemikem.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

ApoE	apolipoprotein E
CAM	cellular adhesion molecule (buněčná adhezní molekula)
ET-1	endothelin-1
HDL	vysokodenzitní lipoprotein
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule-1 (nitrobuněčná CAM)
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MCP-1	monocytový chemoatraktant-protein 1
MDOC	modifikovaná oxidovaná celulóza
NO	oxid dusnatý
PAF	platelet activating factor (trombocyty aktivující faktor)
PECAM-1	platelet cell adhesion molecule-1 (trombocytová CAM)
PGI ₂	prostacyklin
Tg	triacylglycerol
TNF- α	tumor necrosis factor α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1 (vaskulární CAM)
VLDL	velmi-nízkodenzitní lipoprotein

8. LITERATURA

1. GOUBERGRITS L, AFFELD K, FERNANDEZ-BRITTO J, FALCON L. Atherosclerosis and flow in carotid arteries with authentic geometries. *Biorheology* 2002;39(3-4):519-524.
2. 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.
3. CANNON RO, 3RD. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44(8 Pt 2):1809-1819.
4. SPRINGER TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-872.
5. MA X, LABINAZ M, GOLDSTEIN J et al. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(12):2546-2552.
6. VANHOUTTE PM. [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1997;90 Spec No 6:9-19.
7. KEANEY JF, JR. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 2000;21(4-5):99-166.
8. DAVIGNON J, GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
9. 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.
10. SHANTARAM V. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1999;21(1-2):69-77.
11. DAUBRESSE JC. [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux* 2000;21(4):A359-362.
12. STEHBENS WE. The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2002;58(4):359-360.
13. SEMENKOVICH CF, HEINECKE JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes* 1997;46(3):327-334.

14. 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.
15. NAJEMNIK C, SINZINGER H, KRITZ H. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca* 1999;26(5):148-153.
16. BOYLE JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3(1):63-68.
17. JOSEPH-SILVERSTEIN J, SILVERSTEIN RL. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest* 1998;16(3):176-182.
18. JANG Y, LINCOFF AM, PLOW EF, TOPOL EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24(7):1591-1601.
19. MARECKOVA Z, HELLER S, HORKY K. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 1999;45(1):46-50.
20. CYBULSKY MI, LICHTMAN AH, HAJRA L, IYAMA K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta* 1999;286(1-2):207-218.
21. VLASSARA H, FUH H, DONNELLY T, CYBULSKY M. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* 1995;1(4):447-456.
22. BOBRYSEV YV, LORD RS, WATANABE T, IKEZAWA T. The cell adhesion molecule E-cadherin is widely expressed in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res* 1998;40(1):191-205.
23. 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.
24. 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.
25. ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-126.
26. PAIGEN B, MORROW A, HOLMES PA et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68(3):231-240.

27. 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.
28. HOFKER MH, BREUER M. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 1998;110:63-78.
29. RYZHENKOV VE, REMEZOVA OV, BELIAKOV NA. [Dietary fiber and synthetic nonspecific enterosorbents: their hypolipidemic and anti-arteriosclerotic effects]. *Vopr Pitan* 1991(5):11-18.
30. CAMPBELL AP. Health benefits of dietary fiber for people with diabetes. *Diabetes Educ* 2001;27(4):511-514.
31. BENNETT WG, CERDA JJ. Benefits of dietary fiber. Myth or medicine? *Postgrad Med* 1996;99(2):153-156, 166-158, 171-152 passim.