

Úvod

Je prokázáno, že vedle poruchy distribuce, ukládání cholesterolu a tvoření lipidových lézí je ateroskleróza definována zejména přítomností chronického zánětu a v němž základní roli má přítomnost a aktivita makrofágů. Právě koincidence obou těchto patologických dějů silně ovlivňuje různé fáze aterosklerózy. Protizánětlivý význam cílené protizánětlivé terapie na kardiovaskulární chorobu byl prokázán v klinických studiích. Publikovaná data prokázala i protizánětlivý účinek statinů, přičemž byl tento efekt prokázán jak *in vitro*¹, tak *in vivo*^{2,3}. Mechanismus tohoto jevu není objasněn, naše recentní data prokázala⁴ možný vliv na polarizaci makrofágů v tkáních. V prezentovaném projektu jsme tento efekt testovali v *in vitro* podmínkách.

Hypotéza, cíle a metody

Na základě výše uvedených i dalších studií předpokládáme, že **statiny *in vitro* působí na polarizaci makrofágů v protizánětlivém směru a snižují markery zánětu.**

Pro potvrzení naší hypotézy byly stanoveny následující cíle:

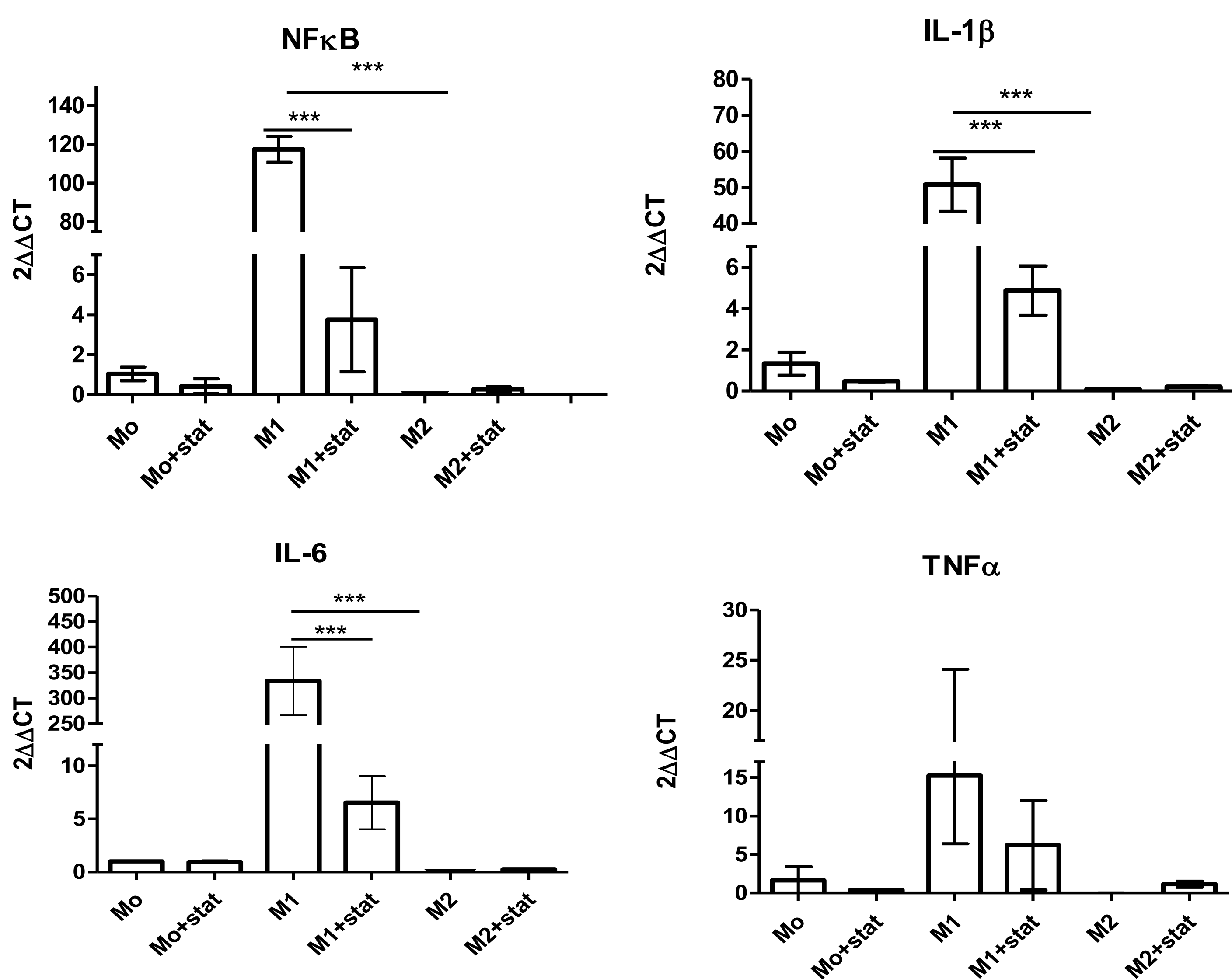
- 1) Kvantifikace vlivu statinů na expresi povrchových markerů monocytárních buněk pomocí průtokové cytometrie
- 2) Stanovení vlivu statinů na expresi genů pro NF-κB, IL-1β, IL-6 a TNFα a NO syntázu pomocí metody qRT-PCR
- 3) Definice vlivu statinů na aktivitu NO syntázy (Greissova reakce) a Arginázy-1
- 4) Stanovení změn v produkci cytokinů IL-1β, IL-6, IL-10 a TNFα ELISA testem

Pro potřeby tohoto výzkumu byl využit model makrofágů získaných diferenciací lidských periferních monocytů, příslušná polarizace byla stimulována LPS+IFNγ (M1 makrofágy) a IL-13+IL-4 (M2 makrofágy). Jako modelový statin byl vybrán fluvastatin.

Stěžejní metody pro tento projekt jsou uvedeny výše.

Výsledky

3. Kvantifikace exprese genů metodou qRT-PCR

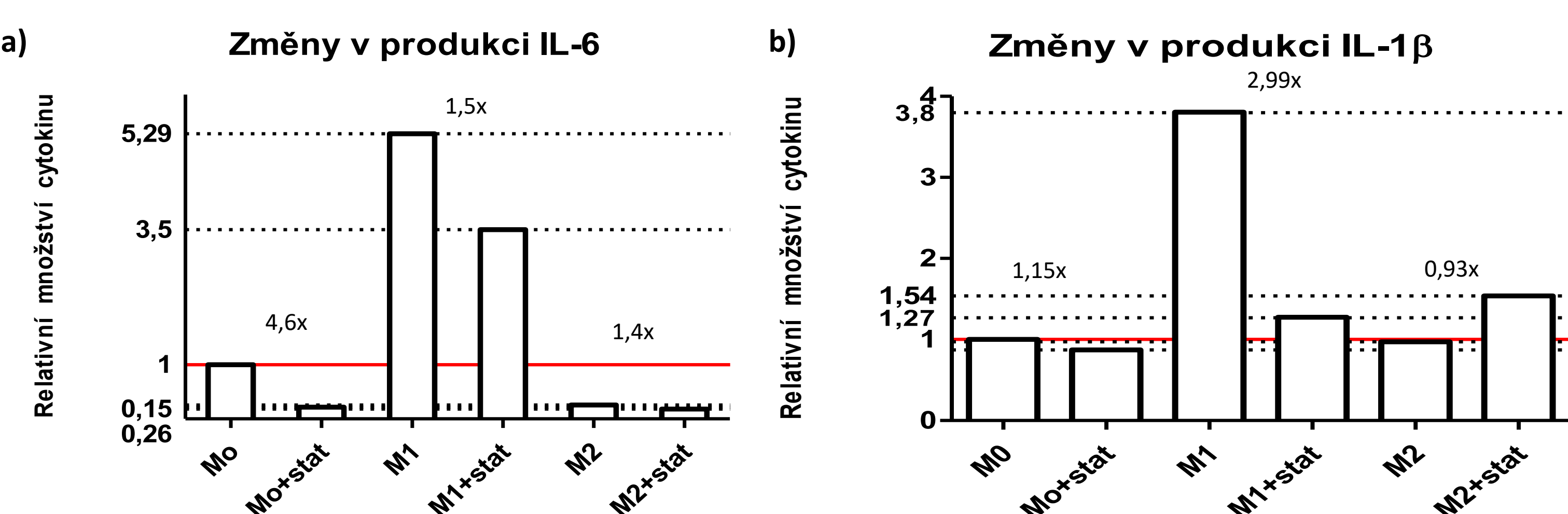


Obrázek 3.1: Grafy exprese jednotlivých genů pro zánětlivé proteiny

Výsledky z qRT-PCR jasně prokazují protizánětlivý vliv statinů na expresi zánětlivých markerů. Přidání statinů vedlo k významnému snížení exprese NFκB, IL-1β a IL-6. Z grafů pro TNFα je patrné, že i u tohoto genu statiny značně snížily jeho expresi, není zde ale významný rozdíl mezi vzorky s a bez statinů.

Data vyjádřena log₂ násobnou změnou neošetřené kontroly (Mo) ve srovnání s makrofágy M1 či M2, měřeno v triplicátech, průměr ± SD, *** p < 0,001.

4. Kvantifikace produkce cytokinů, ELISA test



Graf 4.1: Změny produkce cytokinů IL-6 (a) a IL-1β (b) u buněk stimulovaných statiny a bez statinů

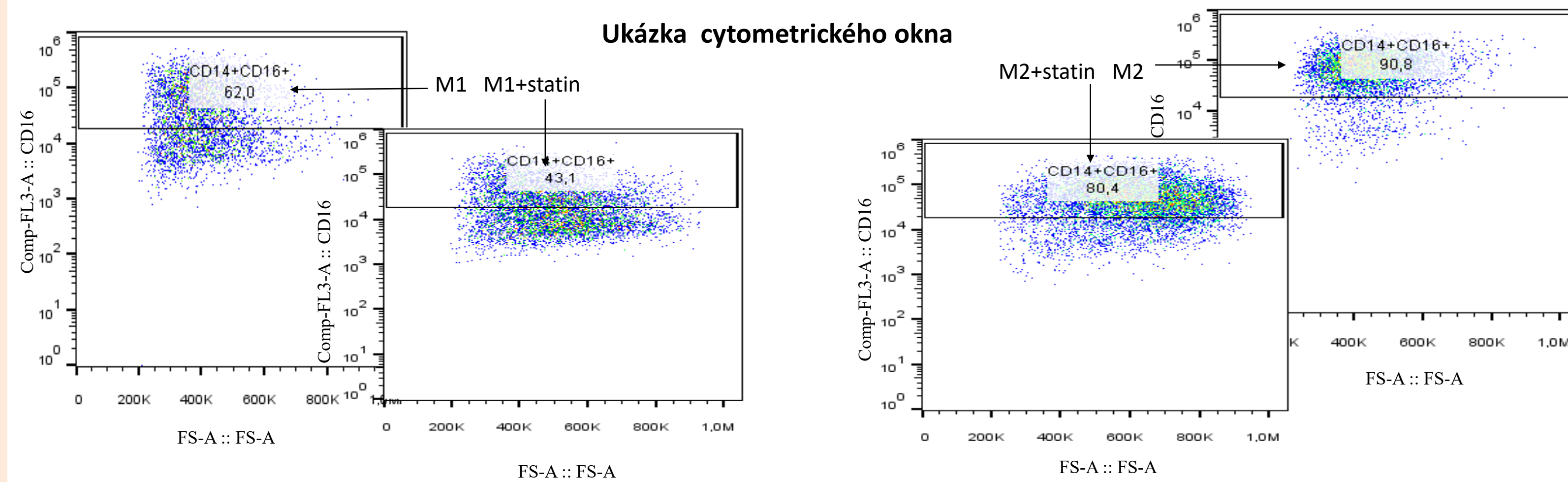
4.1 a): Graf ukazuje významný vliv statinů na snížení exprese cytokinu IL-6. U Mo makrofágů se statiny došlo k 4,6 násobnému snížení produkce IL-6, u M1 k 1,5 násobnému a u M2 k 1,4 násobnému snížení vůči buňkám stejného fenotypu bez statinů. Data demonstrována 2 hodnotami

4.1 b): Graf ukazuje významný vliv statinů na snížení exprese cytokinu IL-1β. U Mo makrofágů statiny snížily expresi cytokinu 1,54x, u M1 2,99x a u M2 makrofágů 0,93x vůči buňkám stejného fenotypu bez statinů. Měřeno v triplicátech

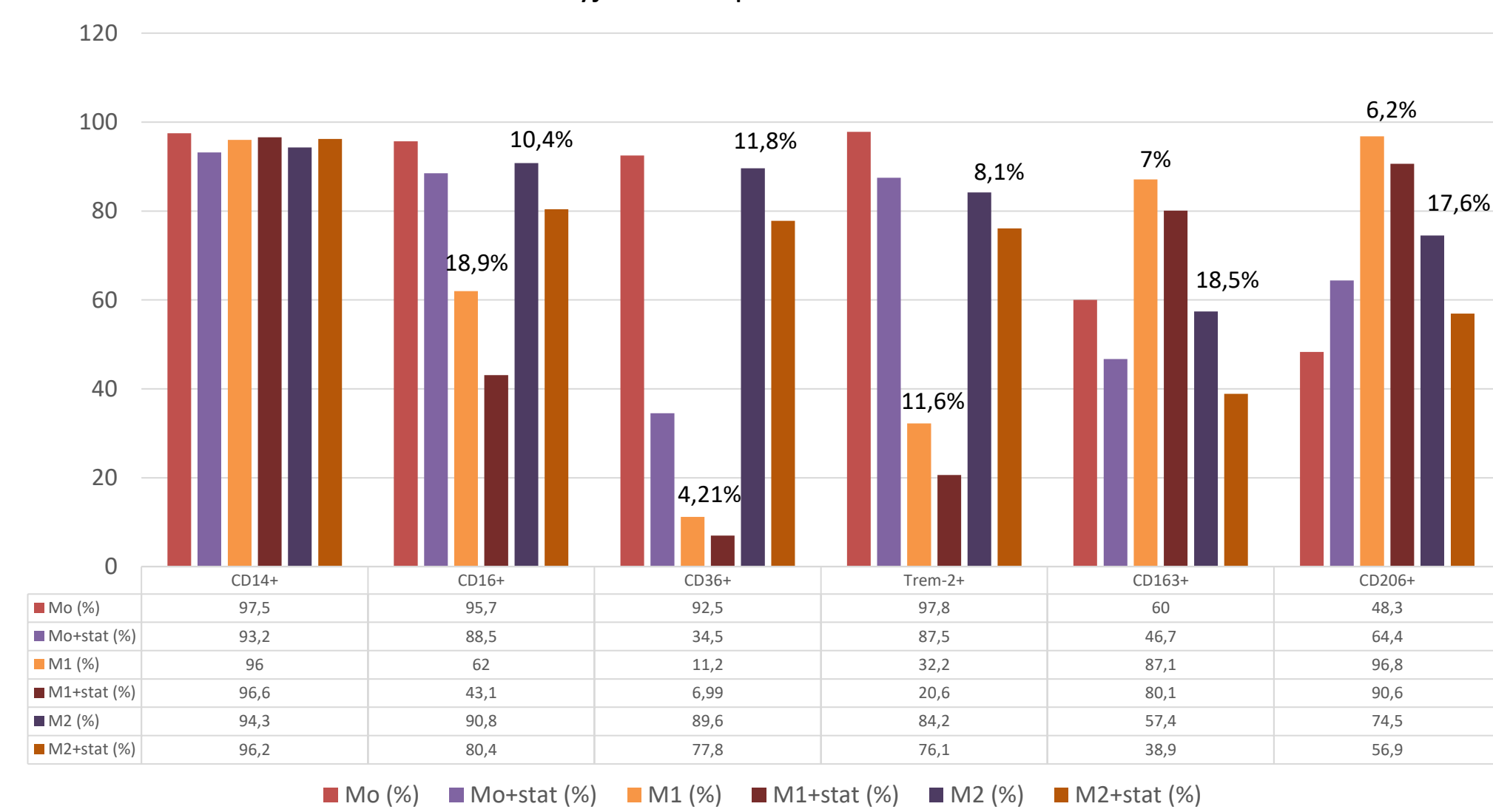
Na ose Y je vynesen násobný rozdíl v produkci cytokinu oproti Mo kontrolním buňkám.

Výsledky

1. Kvantifikace exprese povrchových a intracelulárních markerů, průtoková cytometrie



Procentuální vyjádření exprese extracelulárních znaků

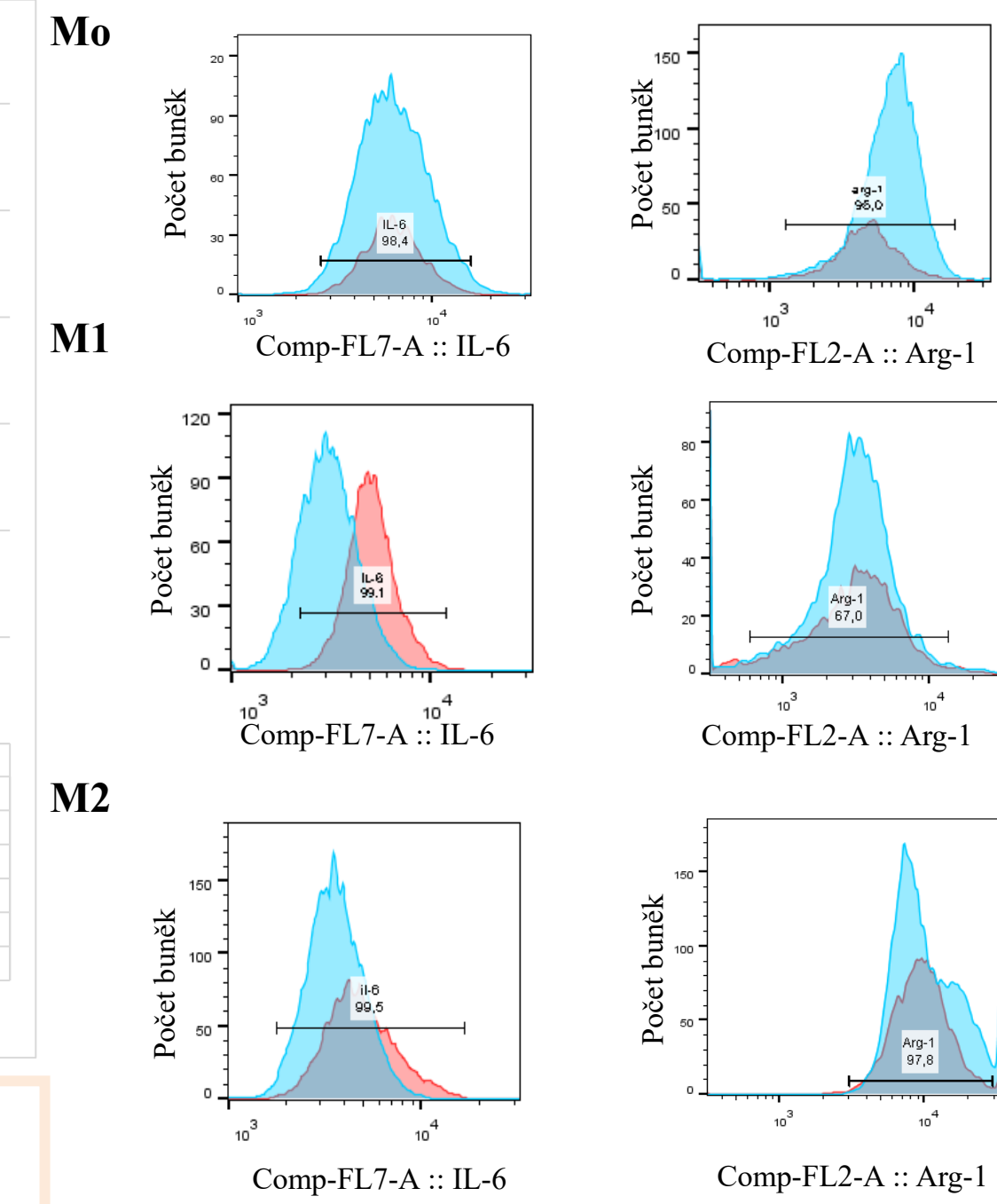


Graf 1.1: Shrnující graf procentuálního vyjádření změny v expresi povrchových znaků mezi buňkami se statiny a bez statinů

Procentuální vyjádření snížení počtu buněk exprimujících daný extracelulární znak. Procenta nad sloupci v grafu vyjadřují rozdíl exprese znaku mezi buňkami se statiny a bez statinů, Mx(%) - Mx+statin(%).

Data ukazují významnou korelaci mezi užitím statinu a snížením exprese CD16, Trem-2, CD163, CD206 i CD36. Z grafu vyplývá, že statiny mají silný vliv na snížení exprese zánětlivých markerů a receptorů zodpovědných za fagocytickou aktivitu makrofágů. Vliv statinů na expresi CD14 receptoru nebyl prokázán.

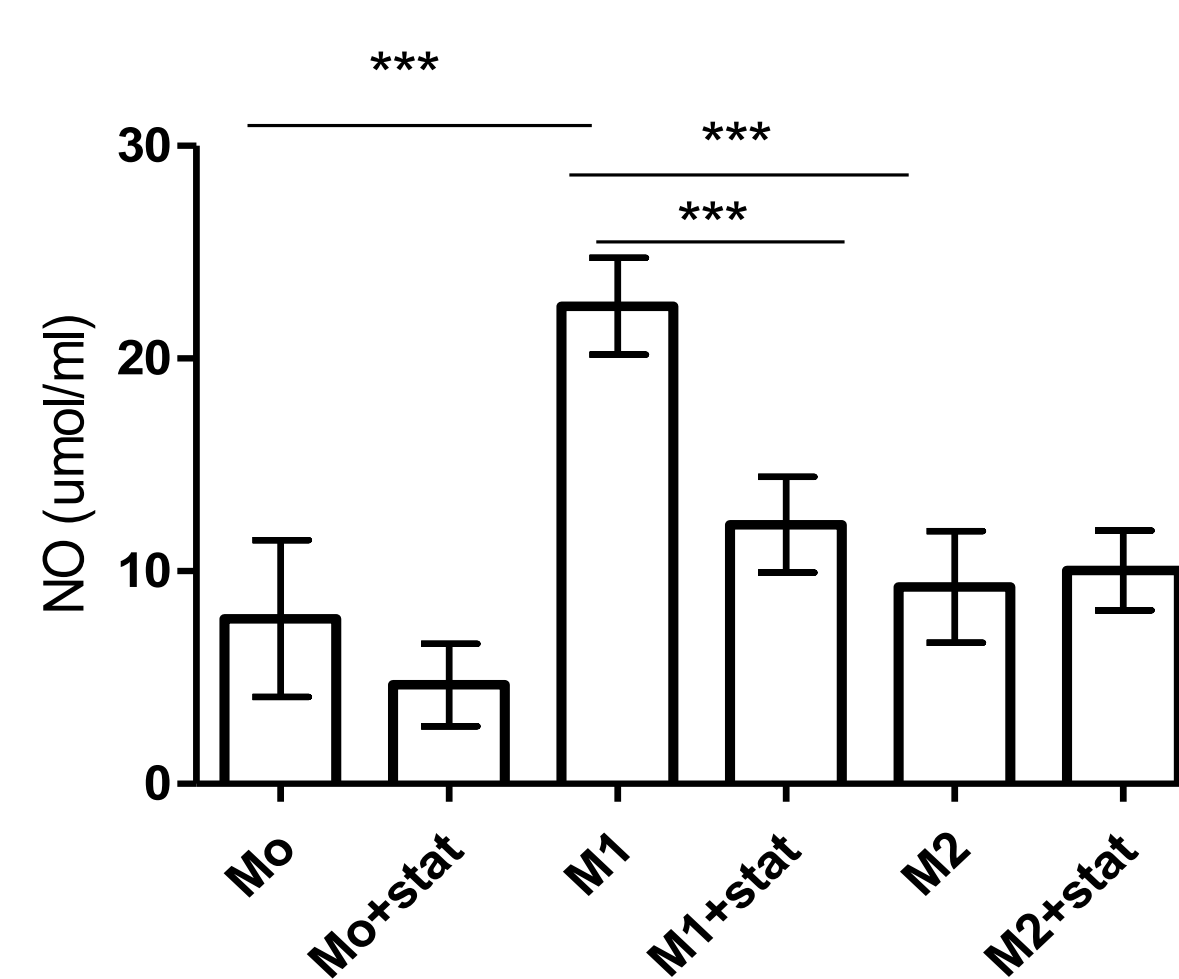
Změny v expresi IL-6 a Arg-1



Obr. 1.1: Histogramy pro IL-6 a Arg-1
Histogramy vyjadřují rozdíly v expresi IL-6 a Arg-1 u buněk stejného fenotypu s a bez statinů. Vyjádřeno průměrnou hodnotou buněk exprimujících daný intracelulární znak.

■ Buňky se statiny
■ Buňky bez statinů

2. Stanovení aktivity NO syntázy Griessovou metodou



Graf 2.1: Množství uvolněného oxidu dusnatého do média.

Pro stanovení aktivity NO syntázy bylo měřeno množství uvolněného oxidu dusnatého (NO) do média. Data byla porovnáována mezi stejnými fenotypy buněk s a bez statinů. Statiny významně snížily aktivitu NO syntázy u M1 makrofágů, naopak na aktivitu u M2 makrofágů nemělo přidání statinů výrazný vliv.

Měřeno v tetraplikátech, průměr ± SD, *** p < 0,001.

Rekapitulace a závěr

- výsledky cytometrické analýzy ukazují, že statiny snižují expresi některých zánětlivých povrchových znaků
- metodou qRT-PCR bylo prokázáno, že statiny významně snižují expresi genů zánětlivých markerů NFκB, IL-1β a IL-6 a významně také expresi TNFα u M1 makrofágů
- Griessovou metodou bylo prokázáno, že statiny významně snižují aktivitu NO syntázy u M1 makrofágů
- ELISA test ukázal významné snížení produkce IL-6 a IL-1β u M1, z dosavadních dat lze předpokládat, že i u TNFα dojde k podobnému výsledku

Výsledky 2-4 byly vyhodnocovány pomocí statistického programu GraphPad.

Pro analýzu dat 2 a 3 byly použity Anova test a Bonferri's Multiple Comparison Test.

Dosadním závěrem této práce je potvrzení počáteční hypotézy, sice, že statiny ovlivňují polarizaci makrofágů v protizánětlivém směru a že snižují přítomnost markerů zánětu.

Citované zdroje

1. (Fu et al., 2019)
2. (Albert et al., 2001)
3. (Ridker et al., 2008)
4. (Kralova Lesna et al., 2018)

Finančně podpořeno MZ ČR-RVO („Institut klinické a experimentální medicíny- IKEM, IČ 00023001)