

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

Imunohistochemická analýza exprese SMAD proteinů u  
experimentální aterogeneze

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce  
Hradec Králové, 2011

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD  
Magdalena Lasotová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD za jeho odborné vedení, cenné připomínky a příjemnou spolupráci při vypracovávání této diplomové práce. Rovněž chci poděkovat své sestře Tereze za pomoc s grafickou úpravou.“

## **ABSTRAKT**

Magdalena Lasotová

Imunohistochemická analýza exprese SMAD proteinů u experimentální aterosklerózy

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce: Sledovali jsme vliv atorvastatinu na expresi fosforylované formy SMAD 3 v aterosklerotických plátech u ApoE/LDL receptor deficitních myší.

Metody: Bylo použito 16 samic ApoE/LDL receptor deficitních myší kmene C57BL/6J. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin. Po dobu 8 týdnů byly obě skupiny krmeny standardní dietou. Zvířata druhé skupiny dostávala v potravě navíc atorvastatin v dávce 50 mg/1kg/den. Dále byly odebrány vzorky krve pro biochemickou analýzu. Stanovení lipidů v aterosklerotických lézích jsme provedli pomocí histologického barvení olejovou červení. Pro imunohistochemickou analýzu byly použity vzorky obsahující semilunární chlopně s aortou. Pro detekci exprese SMAD 3 proteinu byla použita metodika Avidin-Biotin (ABC) s detekcí pomocí DAB.

Výsledky: Podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu zvýšení hladin cholesterolu a VLDL cholesterolu. Navzdory hypercholesterolemickému účinku atorvastatinu došlo k poklesu velikosti aterosklerotických plátů. Imunohistochemická analýza prokázala expresi fosforylované formy SMAD 3 proteinu v celé stěně aorty včetně endotelu, plátu a cévní medie. Exprese SMAD 3 byla výraznější v aterosklerotických plátech myší, kterým byl podáván atorvastatin.

Závěr: Podávání atorvastatinu dále vedlo ke zvýšení exprese SMAD 3 proteinu. Bylo prokázáno, že SMAD 3 má výrazné protizánětlivé účinky.

## **ABSTRACT**

Magdalena Lasotová

Immunohistochemical analysis of expression of SMAD proteins in experimental atherogenesis.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background: We observed the effect of atorvastatin on the expression of phosphorylated form of SMAD 3 in atherosclerotic plaques of ApoE / LDL receptor deficient mice.

Methods: We used C57BL/6J female mice with double deficiency of apolipoprotein E and LDL receptor. Animals were divided into two groups. For 8 weeks both groups were fed a standard diet. Animals of the second group received addition of atorvastatin 50 mg/1 kg/day. Blood samples were taken for biochemical analysis. Histological staining with oil red we have taken for the determination of lipids in atherosclerotic lesions. For immunohistochemical analysis were used samples containing semilunar valves with aorta. Detection of expression of SMAD 3 protein was performed using Avidin-Biotin method (ABC) with detection using DAB.

Results: Administration of atorvastatin significantly increased level of total cholesterol and VLDL cholesterol. Despite hypercholesterolemic effect the administration of atorvastatin resulted in significant reductions of atherosclerotic lesions compared with the control group. Immunohistochemical analysis, we demonstrated expression of SMAD 3 protein in the aortic wall including endothelium, atherosclerotic plaque and vessel media. The atorvastatin group showed stronger SMAD 3 expression in atherosclerotic plaques.

Conclusions: Administration of atorvastatin showed the greater expression of SMAD 3. It has been shown, that SMAD 3 has a strong anti-inflammatory effects.

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV .....</b>	<b>10</b>
2.1 OBECNÁ STAVBA CÉV .....	10
2.2 KAPILÁRY .....	11
2.3 ARTÉRIE .....	13
2.4 VÉNY .....	14
<b>3 ATEROSKLERÓZA .....</b>	<b>16</b>
3.1 EPIDEMIOLOGIE .....	16
3.2 RIZIKOVÉ FAKTORY .....	17
3.3 PATOGENEZE .....	20
3.3.1 Úloha lipoproteinů v patogenezi aterosklerózy.....	20
3.3.2 Úloha endotelu, makrofágů a buněk hladkého svalstva v patogenezi aterosklerózy.....	22
3.3.3 LDL a scavenger receptory .....	25
3.3.4 Fáze aterosklerózy .....	27
<b>4 MYŠÍ MODEL ATEROSKLERÓZY.....</b>	<b>31</b>
<b>5 SMAD PROTEINY A JEJICH ROLE V PROCESU ATEROGENEZE.....</b>	<b>34</b>
5.1 TRANSFORMUJÍCÍ RŮSTOVÝ FAKTOR A FUNKCE TGF-β1.....	34
5.2 TGF-β SIGNALIZACE.....	36
5.3 SMAD PROTEINY.....	37
5.4 SMAD 3 PROTEIN.....	38
<b>6 STATINY.....</b>	<b>40</b>
6.1 MECHANISMUS ÚČINKU.....	40
6.2 FARMAKOKINETIKA.....	41

6.3 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY.....	41
6.4 KONTRAINDIKACE.....	42
6.5 PLEIOTROPNÍ PŮSOBENÍ STATINŮ .....	43
6.6 ATORVASTATIN .....	46
<b>7 CÍL PRÁCE – zadání.....</b>	<b>47</b>
<b>8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>48</b>
8.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA .....	48
8.2 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	48
8.3 HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ .....	49
8.4 IMUNOHISTOCHEMIE .....	49
8.5 PROTILÁTKY.....	49
8.6 POSTUP.....	49
8.7 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	50
<b>9 VÝSLEDKY .....</b>	<b>51</b>
9.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA HLADIN CHOLESTEROLU U MYŠÍ.....	51
9.2 HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ .....	52
9.3 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ U MYŠÍ.....	54
<b>10 DISKUSE .....</b>	<b>57</b>
<b>11 ZÁVĚR .....</b>	<b>59</b>
<b>12 SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>60</b>
<b>13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>62</b>

# 1 ÚVOD

Kardiovaskulární choroby jsou hlavní příčinou úmrtnosti obyvatel v průmyslově vyspělých zemích. Data ze Světové zdravotnické organizace ukazují, že KVO jsou na celém světě zodpovědná přibližně za 30% celkové mortality. Úmrtnost na tato onemocnění je v České republice jedna z nejvyšších v Evropě, i když v posledních několika letech začala klesat (1).

Za část tohoto poklesu jsou odpovědné nové a účinnější způsoby léčby. Daleko větší význam se však připisuje změnám životního stylu, neustále se zlepšující detekci KVO a obecně důslednějšímu uplatňování zásad primární a sekundární prevence (2).

Nejčastější příčinou kardiovaskulární mortality a morbidity je ischemická choroba srdeční, která je definována jako ischemie myokardu vznikající na podkladě patologických změn koronárního řečiště. Je buďto klidová, nebo vzniká, při zvýšeném nároku srdce na dodávku kyslíku. Je nejčastěji způsobena koronární aterosklerózou. Zásadním faktorem v patogenezi aterosklerózy je dyslipidémie (2, 3).

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění tepen, při němž se v jejích stěnách ukládají tukové látky. Dochází ke vzniku aterosklerotických plátů. Tepna je takto poškozována, ztrácí pružnost a dochází k jejímu postupnému zužování. Stenóza, spasmus a nasedající trombus mají za následek až úplné uzavření tepny s následnou ischemií příslušné části. Rozsah a důsledky závisí na citlivosti tkáně k nedostatku kyslíku a oblasti, která byla ischemií postižena. K nejčastějším klinickým projevům aterosklerózy patří všechny formy ischemické choroby srdeční (ICHS), ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) a cévní mozková příhoda (CMP) (1,4).

K rozvoji aterosklerózy přispívají rizikové faktory, které mohou být neovlivnitelné (pohlaví, věk, genetická predispozice) nebo více či méně ovlivnitelné (kouření, fyzická inaktivita, arteriální hypertenze, hyperlipidémie, diabetes mellitus a obezita).



Ateroskleróza je proces, postihující většinu cév. Pacienti, kteří již prodělali příhodu aterosklerotické etiologie, mají větší riziko její recidivy nejen ve stejné oblasti, ale také další příhody v jiné části krevního řečiště (1).

Léčit již vzniklou aterosklerózu je velmi obtížné. Protože se jedná o komplexní onemocnění cév, také léčba musí být komplexní a měla by zahrnovat kromě farmakologické léčby hypolipidemiky a antikoagulancii i režimová opatření a změnu životního stylu, včetně snahy o dosažení cílových hodnot krevního tlaku a glykémie.

Včasně odhalení osob, které jsou vlivem genetické zátěže a ostatních rizikových faktorů v nebezpečí kardiovaskulární příhody, může v budoucnu výrazně snížit KV i celkovou mortalitu. Je nutné nacházet v této oblasti stále nové efektivnější a cílenější léčebné strategie, aktivně zapojit pacienty do léčby a posilovat důslednou primární prevenci těchto onemocnění u asymptomatických osob (1,5).

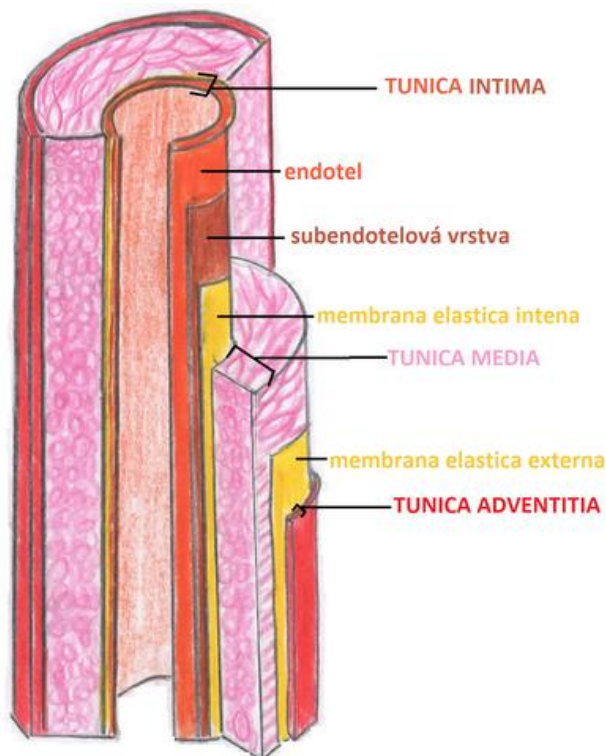
## 2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE KREVNÍCH CÉV

### 2.1 OBECNÁ STAVBA CÉV (zpracováno dle 6)

Krevní cévy jsou přizpůsobeny svým fyziologickým požadavkům a vytváří spojitý systém s řadou plynulých přechodů mezi jednotlivými typy. Krevní cévy se obvykle skládají z následujících vrstev neboli tunik.

**Tunica intima** tvoří vnitřní povrch cév a skládá se z vrstvy endotelových buněk. Pod endotelem se nachází subendotelová vrstva řídkého vaziva. V arteriích odděluje intimu od medie fenestrovaná *lamina elastica interna*, která difúzi umožňuje výživu buněk ležících hlouběji v arteriální stěně.

Obrázek 1: Stěna krevní cévy



**Tunica media** tvoří střední vrstvu cévní stěny a skládá se z koncentrických vrstev hladkých svalových buněk. Mezi nimi se nachází elastická a kolagenní vlákna typu III. Ve velkých tepnách odděluje medii od zevní tunica adventitia tenká *lamina elastica externa*.

**Tunica adventitia** představuje zevní vrstvu a je tvořena elastickými a kolagenními vlákny typu I. Vrstva adventicie přechází do vaziva orgánu, kterým céva prochází.

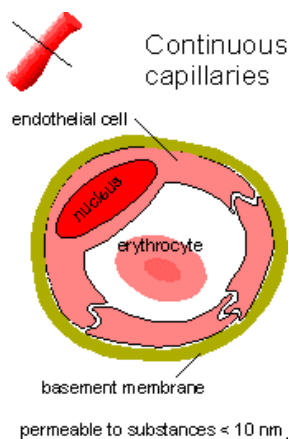
**Vasa vasorum** - jedná se o bohatě větvené malé cévy, které se nacházející ve stěnách velkých cév. Vyživují adventicii a medii, které jsou ve velkých cévách příliš silné a nemohou být živeny difúzí z lumen.

## 2.2 KAPILÁRY

Kapiláry mají v průměru 7 až 9  $\mu\text{m}$  a skládají se z jedné vrstvy endotelových buněk, jejichž zevní povrch je tvořen bazální laminou. Navzájem anastomózuji a vytváří kapilární síť. Mezi sousedními buňkami se nachází spoje typu zonulae occludentes, dezmosomů a nexů. Spojení typu zonula occludentes umožňuje různou prostupnost pro makromolekuly, což hraje důležitou roli za různých fyziologických či patologických stavů. Kapiláry jsou obklopeny nesouvislou vrstvou mezenchymálních buněk s dlouhými výběžky (pericyty), které jsou obdařeny schopností kontrakce a transformace v jiné buňky. Kapiláry hrají roli v řadě metabolických pochodů, slouží jako selektivně propustná bariéra a brání vzniku trombů (6,7).

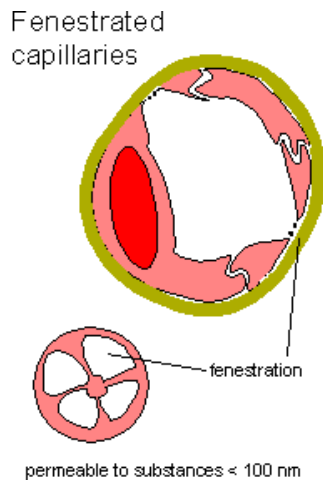
Kapiláry dělíme do čtyř skupin dle jejich struktury (6).

Obrázek 2: Souvislá kapilára



**Souvislé kapiláry** jsou tvořeny souvislým endotelem bez fenestrací. Endotelové buňky jsou obklopeny bazální membránou. Obousměrný transport je zajištěn prostřednictvím pinocytárních váčků. Tyto kapiláry se nachází ve svalech, exokrinních žlázách a nervové tkáni.

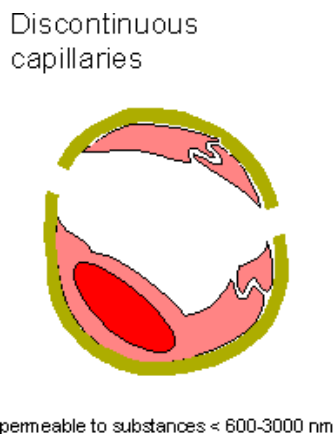
Obrázek 3: Fenestrovaná kapilára



**Fenestrované kapiláry** obsahují ve stěnách endotelových buněk četné fenestrace (průchody), které jsou přepaženy přepážkou (diafragmou). S fenestrovánými kapilárami se setkáváme v ledvinách, střevech či endokrinních žlázách, tedy v místech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi krví a tkáněmi.

**Fenestrované kapiláry bez diafragmat** jsou charakteristické pro ledvinná tělíska. Endotelové buňky jsou od epitelových buněk odděleny silnou bazální membránou.

Obrázek 4: Sinusoidní kapilára



**Sinusoidy** jsou modifikované kapiláry. Obsahují mnoho fenestrací, bazální membrána chybí nebo je nesouvislá. Mají klikatý průběh a rozšířený průsvit. Nacházejí se zejména v játrech, slezině a kostní dřeni. Endotelie mají schopnost fagocytózy (6,7).

## 2.3 ARTÉRIE

Stěny artérií jsou silnější než stěny vén. Dělíme je dle jejich stavby, velikosti a funkce.

### **Velké artérie elastického typu (např. aorta):**

- tunica intima je silná, vystlána endotelovými buňkami
- tunica media je tvořena řadou koncentricky uspořádaných elastických vláken, mezi nimi se nachází hladké svalové buňky, retikulární vlákna a chondroitin sulfát
- tunika adventitia je málo vyvinutá, obsahuje elastická a kolagenní vlákna

### **Středně velké artérie svalového typu:**

- tunica intima může obsahovat menší množství hladkých svalových buněk
- membrána elastica interna je zřetelně vyvinuta
- tunica media může obsahovat až 40 vrstev hladkých svalových buněk, dále různé množství elastických vláken a proteoglykanů
- membrána elastica externa se nachází pouze ve větších svalových artériích
- tunica adventitia je tvořena z kolagenních a elastických vláken

### **Arterioly:**

- mají průsvit menší než 0,5 mm
- tunica intima je složena z endotelu, nad ním leží síť jemných elastických vláken
- tunica media je čistě svalová, skládá se z 1-5 vrstev hladkých svalových buněk
- membrána elastica externa chybí
- tunica adventitia je tenká a tvořená sítí kolagenních vláken (6,7)

### **Metaarterioly:**

- drobné větve arterioly, obklopené nesouvislou vrstvou hladké svaloviny
- stah metaarterioly reguluje oběh v kapilárách pomocí prekapilárních sfinkterů

## 2.4 VÉNY

Dělíme je na venuly, vény malého a středního kalibru a velké vény. Vyznačují se tenkou stěnou a širokým lumen. Ve vénách jsou přítomny venózní chlopně tvořené tenkou vazivovou ploténkou krytou endotelem, které usměrňují tok krve (7).

### **Venuly:**

- mají průměr 0,2-1mm
- tunica intima tvořená typickým endotelem, tunica media je velmi tenká, tunica adventitia je nejsilnější a bohatá na kolagen

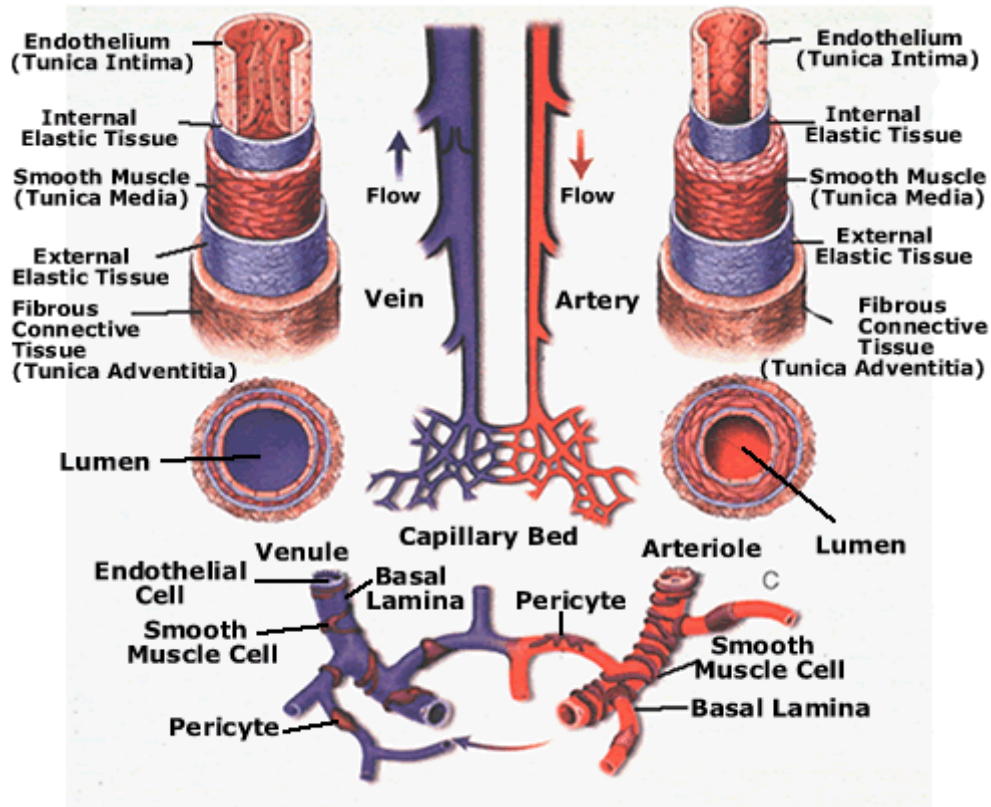
### **Malé a střední vény:**

- tunica intima tvořena endotelem a obvykle opatřena tenkou subendotelovou vrstvou
- tunica media je tvořena svazky svalových buněk, obsahuje také kolagenní a retikulární vlákna
- tunica adventitia je dobře vyvinutá, nejširší, tvořena z hustě uspořádaných kolagenních vláken, ojediněle se vyskytují buňky svalové (6,7)

### **Velké vény:**

- tunica intima je dobře vyvinutá, se silnou subendotelovou vrstvou
- tunica media je tenčí, tvořena několika vrstvami hladkých svalových buněk a kolagenními vlákny
- tunica adventitia je nejlépe vyvinutá, obsahuje podélné svazky hladké svaloviny, které ji zesilují a zabraňují roztažení cévy, tyto jsou odděleny pruhy vláken kolagenních (6,7)

Obrázek 5: Schéma vény a artérie



Obrázek 1: <http://www.wikiskripta.eu> (25.4.2011)

Obrázek 2-4: <http://pcwww.liv.ac.uk> (25.4.2011)

Obrázek 5: <http://anteportaminferam.blog.cz> (25.4.2011)

### **3 ATEROSKLERÓZA**

Ateroskleróza je komplexní onemocnění velkých a středně velkých tepen svalového a elastického typu. Aterosklerotický proces vzniká v důsledku poškození endotelu, který se tak stává propustným pro celou řadu zánětlivých buněk a dalších komponent. Dochází ke stimulaci proliferace hladkých svalových buněk ve stěně tepny. Vznik aterosklerotického plátu probíhá v několika stupních, které se navzájem prolínají. Od tukových proužků, přes svalově tukové pláty až po vznik fibroateromu. Tento patologický proces vede ke ztluštění arteriální stěny a ztrátě její elasticity (8).

Aterosklerózu můžeme rozdělit na centrální a periferní typ. U centrálního typu aterosklerózy je nejvíce postižena břišní oblast aorty a obě velké tepny směřující od aorty do obou dolních končetin. Stěna aorty se postupně napíná, dilatuje a může dojít ke vzniku aneuryzmatu. Periferní typ postihuje především věčité, mozkové a ledvinové tepny. Aterosklerotické změny vedou k zúžení průsvitu cévy, tvorbě trombu, popřípadě k ruptuře a krvácení do aterosklerotického plátu. Výsledkem je pokles krevního průtoku a hypoxie postižené oblasti (8,9).

#### **3.1 EPIDEMIOLOGIE**

Přesné statistiky, jaké procento pacientů aterosklerózou trpí, nebývají prezentovány, jelikož nemocní bývají zpravidla zachyceni až v době, kdy se ateroskleróza projeví klinicky (1).

Kardiovaskulární choroby jsou v ČR na prvním místě v příčinách úmrtí – v roce 2008 na ně zemřelo 52 000 lidí, což představovalo 50 % všech úmrtí. ICH S je příčinou přibližně 40 % všech úmrtí z kardiovaskulárních příčin (10).

V posledních 20 letech pozorujeme v ČR významný pokles standardizované kardiovaskulární mortality, zejména pokles mortality na cerebrovaskulární a koronární příhody, který dosáhl 50 % pro obě pohlaví (10).



## 3.2 RIZIKOVÉ FAKTORY

Všechny příčiny vzniku aterosklerózy nejsou známy. Neexistuje kauzální léčba, umíme pouze do jisté míry odstraňovat symptomy a léčit komplikace. Jsou ale známé stavy nebo faktory, které pravděpodobnost vzniku aterosklerózy a rychlost jejího rozvoje mnohonásobně zvyšují. Označují se jako rizikové faktory a jsou výsledkem interakce životního stylu jedince s jeho genetickou výbavou (2).

### NEOVLIVNITELNÉ RIZIKOVÉ FAKTORY (zpracováno dle 5)

#### **Věk**

Pravděpodobnost manifestace aterosklerózy stoupá s věkem. Riziko stoupá u mužů po 45. a u žen po 55. roce (souvislost s nástupem menopauzy).

#### **Pohlaví**

Muži jsou ohroženi podstatně více než ženy, u kterých je prokázán protektivní vliv estrogenů. Riziko u žen se po menopauze bez substituční léčby estrogeny zvyšuje.

#### **Genetické faktory**

Výskyt infarktu myokardu nebo náhle smrti u otce či sourozence mužského pohlaví ve věku nižším než 55 let, u matky či sestry před 65. rokem života.

### OVLIVNITELNÉ RIZIKOVÉ FAKTORY (zpracováno dle 5,3)

#### **Hyperlipoproteinémie**

Za rizikové považujeme zvýšení celkového cholesterolu (nad 5 mmol/l) a LDL-cholesterolu (nad 3 mmol/l), snížení HDL-cholesterolu (pod 1 mmol/l), hypertriglyceridémii (nad 1.7 mmol/l) a změnu velikosti LDL-částic.

## **Kouření**

Kouření vede k dysfunkci endotelu, působí vazokonstrikčně, nepříznivě ovlivňuje lipidový profil, zvyšuje hladinu fibrinogenu a riziko vzniku koronární trombózy.

## **Arteriální hypertenze**

Zvýšení krevního tlaku nad 140/90 mm Hg vede k endoteliální dysfunkci a ke zvýšení cévní permeability. Zvýšená hladina angiotenzinu II dále vede k remodelaci cévní stěny a hypertrofii levé srdeční komory.

## **Diabetes mellitus** (inzulínová rezistence, porušená glukózová tolerance)

Zejména DM II. typu vede při hyperglykémii k tvorbě glykovaných LDL částic, které snadno podléhají oxidaci. Glykooxidované LDL částice usnadňují transformaci makrofágu na pěnovou buňku. (11)

## **Obezita** (zejména abdominálního typu)

## **Trombogenní rizikové faktory** (vysoká hladina fibrinogenu v séru)

## **Nedostatek tělesné aktivity**

**Zvýšená hladina homocysteinu v plazmě** (její snížení nemělo žádný pozitivní dopad na redukci KV příhod) (5).

Sdružení několika rizikových faktorů se nazývá **metabolický syndrom**.

Tabulka 1: Rizikové faktory MS

<b>Tab. 3 – Harmonizovaná definice metabolického syndromu (2009)</b>	
<b>Metabolický syndrom = nejméně 3 z 5 rizikových faktorů</b>	
zvýšený obvod pasu	specifické hranice pro jednotlivé populace/země
muži (evropského původu)	≥ 94 cm (zvýšené riziko) ≥ 102 (vysoké riziko)
ženy (evropského původu)	≥ 80 cm (zvýšené riziko), ≥ 88 (vysoké riziko)
triglyceridy nebo specifická léčba	≥ 1,7 mmol/l

HDL-cholesterol	
muži	< 1,0 mmol/l
ženy	< 1,3 mmol/l
nebo specifická léčba	
krevní tlak	≥ 130/≥ 85 mmHg
	nebo specifická léčba
glykémie nalačno	≥ 5,6 mmol/l
	nebo diabetes mellitus 2. typu

[www.zdn.cz](http://www.zdn.cz) (27.4.2011)

Cílem léčby aterosklerózy je zabránit komplikacím a zlepšit prokrvení postižených orgánů. Nemały význam má úprava životního stylu a modifikace ovlivnitelných rizikových faktorů v rámci primární a sekundární prevence. Vyskytuje-li se u jedince několik rizikových faktorů najednou, jejich efekt se násobí. Mezi režimová opatření můžeme zahrnout i léčbu obezity (1, 5).

Obrázek 6: Ovlivnitelné rizikové faktory aterosklerózy



[www.cba.muni.cz](http://www.cba.muni.cz) (27.4.2011)

### 3.3 PATOGENEZE

Pohled na aterosklerózu se v posledních letech velmi změnil. Na aterosklerózu bylo dlouho pohlíženo jako na degenerativní onemocnění tepen. Předpokládalo se, že dochází k mechanickému ukládání cholesterolu za vzniku aterosklerotických plátů, které tepnu postupně zužují, až ji nakonec uzavřou (5,1).

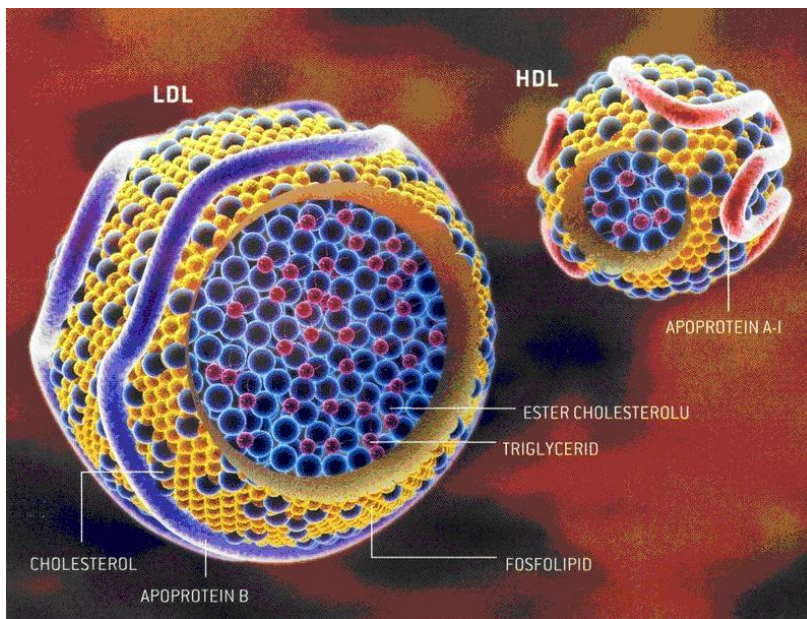
V současné době je ateroskleróza vnímaná jako imunitně zánětlivý proces, který je odpovědí na poškození imunity (5).

#### 3.3.1 ÚLOHA LIPOPROTEINŮ V PATOGENEZI ATEROSKLERÓZY

Hlavními lipidy jsou cholesterol, triglyceridy a fosfolipidy. Cholesterol a fosfolipidy jsou důležitou součástí buněčných membrán. Triglyceridy představují důležitý zásobní zdroj energie v těle. Lipidy se váží na specifické bílkoviny apolipoproteiny a tvoří s nimi komplexy zvané lipoproteiny. Tyto komplexy umožňují transport a rozpustnost ve vodě nerozpustných lipidů a jejich vazbu na příslušné receptory. Existuje několik druhů lipoproteinů a dělíme je dle hustoty (3,4):

- Chylomikra
- Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL)
- Lipoproteiny se střední hustotou (IDL)
- Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL)
- Lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL)

Obrázek 7: Složení LDL a HDL lipoproteinů



[www.biology.estranky.cz](http://www.biology.estranky.cz) (27.4.2011)

Lipoproteiny jsou v centru tvořeny hydrofobními triacylglyceroly a estery cholesterolu. Jejich obal, v němž jsou fosfolipidy, volný cholesterol a apolipoproteiny, umožňuje, že se částice vznášejí ve vodě (4).

LDL částice hrají hlavní roli v tomto patologickém procesu. Váží se na LDL-receptory nebo na scavengerové receptory. Působením volných kyslíkových radikálů podléhají oxidaci a jsou přednostně vychytávány scavengerovými receptory monocytů a makrofágů. Svým toxickým působením na buňky cévní stěny mohou přímo poškodit endotel. Zvyšují adhezenci a chemotaxi monocytů a lymfocytů a jejich přeměnu na makrofágy. Makrofágy poté pohlcují oxidované LDL částice a vznikají pěnové buňky. Naproti tomu částice HDL jsou nositeli antioxidantních enzymů a chrání před vznikem aterosklerózy (12,13).

Antiaterogenní působení HDL je komplexní a zahrnuje řadu mechanismů. Kromě zajištění reverzního transportu cholesterolu, inhibuje peroxidaci lipidů a tím vznik kyslíkatých radikálů, tlumí zánět, ovlivňuje hemoreologické a hemosta-

tické vlastnosti krve, podílí se na úpravě endoteliální dysfunkce a inhibuje apoptózu (5).

Důležitým parametrem je apo-B (apolipoprotein pro LDL). Informuje nás o počtu aterogenních částic. Rozsáhlé intervenční i prospektivní studie AMORIS a INTERHEART (14,15) prokázaly, že apo-B je lepším ukazatelem KV rizika než „klasické“ lipidové parametry. Stanovení apo-B je výhodné zejména u nemocných, u kterých je možno předpokládat zvýšený výskyt malých denzních LDL částic (16).

Malé denzní LDL částice jsou vysoce aterogenní. Jsou obtížně vychytávány cestou LDL receptorů, lépe pronikají endotelem a snadno podléhají oxidaci (5).

### **3.3.2 ÚLOHA ENDOTELU, MAKROFÁGŮ A BUNĚK HLADKÉHO SVALSTVA V PATOGENEZI ATEROSKLERÓZY**

#### **Fyziologická funkce endotelu**

Endotelie jsou ploché buňky tvořící jednovrstevnou výstelku cév-endotel. Endotel je z jedné strany omýván krví a z druhé přisedá k bazální membráně. Endotel má v organismu řadu funkcí a je považován za nejtěžší endokrinní orgán v lidském těle, u dospělého člověka váží až 1,5kg (5,17).

Endotel má v organismu několik úkolů. Má důležitou funkci v ovlivňování trombotických a koagulačních aktivit. NO a prostacyklin na povrchu endotelií inhibují agregaci krevních destiček. Prostřednictvím tvorby aktivátoru plazminogenu a urokinázy udržuje rovnováhu koagulačního a fibrinolytického systému (12).

Endotel reguluje cévní tonus prostřednictvím sekrece vazodilatačních a vazokonstrikčních působků. NO a prostacyklin podporují vazodilataci, inhibují proliferaci buněk hladkého svalstva, brání adhezi monocytů, makrofágů a leukocytů. Endoteliální buňky jsou však také schopny oxidovat LDL částice transportované do cévní stěny (12).

Endotel ovlivňuje permeabilitu cévní stěny, tvoří selektivní bariéru pro molekuly a buňky, secernuje molekuly růstových faktorů a cytokinů a ovlivňuje novotvorbu cév. (5,12).

Bylo zjištěno, že u osob s rizikovými faktory aterosklerózy, kteří zatím nemají žádné morfologické známky, reagují cévy na intraarteriální podání acetylcholinu jinak, než osoby bez rizikových faktorů. Tato látka u zdravých jedinců vyvolá dilataci artérií vlivem zvýšení produkce NO. U osob s rizikovými faktory však dojde k přechodnému zúžení tepny. Nejčastějším důsledkem poruchy funkce endotelu je rozvoj aterosklerózy (17).

### **Poškození endotelu a endoteliální dysfunkce**

Časná fáze aterosklerózy je způsobena endoteliální dysfunkcí, dochází k adhezi monocytů a leukocytů na cévní endotel. Tento proces je zprostředkován pomocí adhezivních molekul. Vaskulární adhezivní molekula VCAM-1, intracelulární adhezivní molekula ICAM-1, E-selektin a P-selektin.

Na poškození endotelu se může podílet řada faktorů. Kromě hypertenze a zvýšené hladiny LDL cholesterolu se mohou různou mírou podílet také mechanické faktory, viry, toxiny a homocystein.

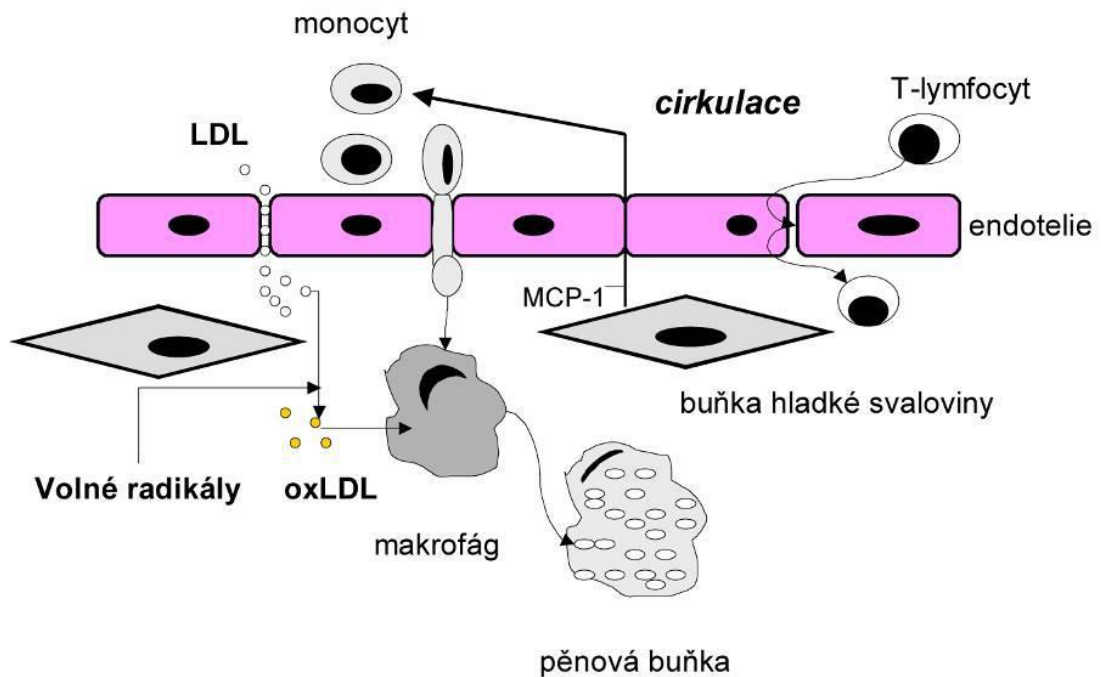
Poškozený endotel se stává propustným pro řadu substancí. Dochází k aktivaci makrofágů a k migraci buněk hladkého svalstva, které mají klíčovou úlohu ve fibroproliferativní složce aterogeneze (12).

Buňky hladkého svalstva existují ve 2 fenotypech (kontraktilní a syntetický). Kontraktilní typ je stimulován endotelinem, katecholaminy, prostaglandiny, NO a angiotentinem II. Na tyto podněty reaguje prostřednictvím vazodilatace nebo vazokonstrikce. Syntetický typ reaguje na působení růstových faktorů PDGF, TGF-beta a FGF. Dochází k proliferaci, tvorbě vaziva a zmnožení extracelulární matrix. Hladko-svalové buňky tak zvětšují a zpevňují aterosklerotický plát (12,18).

Buněčné proliferace se účastní kromě výše zmíněných růstových faktorů také IGF-1, TNF-alfa, IL-1. Z hlediska exprese v cévách je významný TGF- $\beta$ 1 cytokin, který působí prostřednictvím SMAD proteinů. Má protektivní, protizánětlivé účinky a ovlivňuje expresi genů podílejících se na tvorbě pojivové tkáně. Bude o něm pojednáno v 5. kapitole.

Ve všech stádiích aterosklerózy jsou přítomné makrofágy vznikající přeměnou monocytů. V časných fázích se podílí na vylučování a modifikaci LDL částic. Spolu s lymfocyty a buňkami hladkého svalstva se podílí na tvorbě tukového proužku. Dále tvoří růstový faktor PDGF a stimuluje proliferaci buněk hladkého svalstva a neovaskularizaci plátů. Prostřednictvím enzymů metaloproteináz změkčují slupku plátu a zvyšují riziko ruptury. Tvoří zánětlivé mediátory IL-1 a TNF-alfa a vedou k amplifikaci zánětu (3,12).

Obrázek 8: Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu





### 3.3.3 LDL A SCAVENGER RECEPTORY

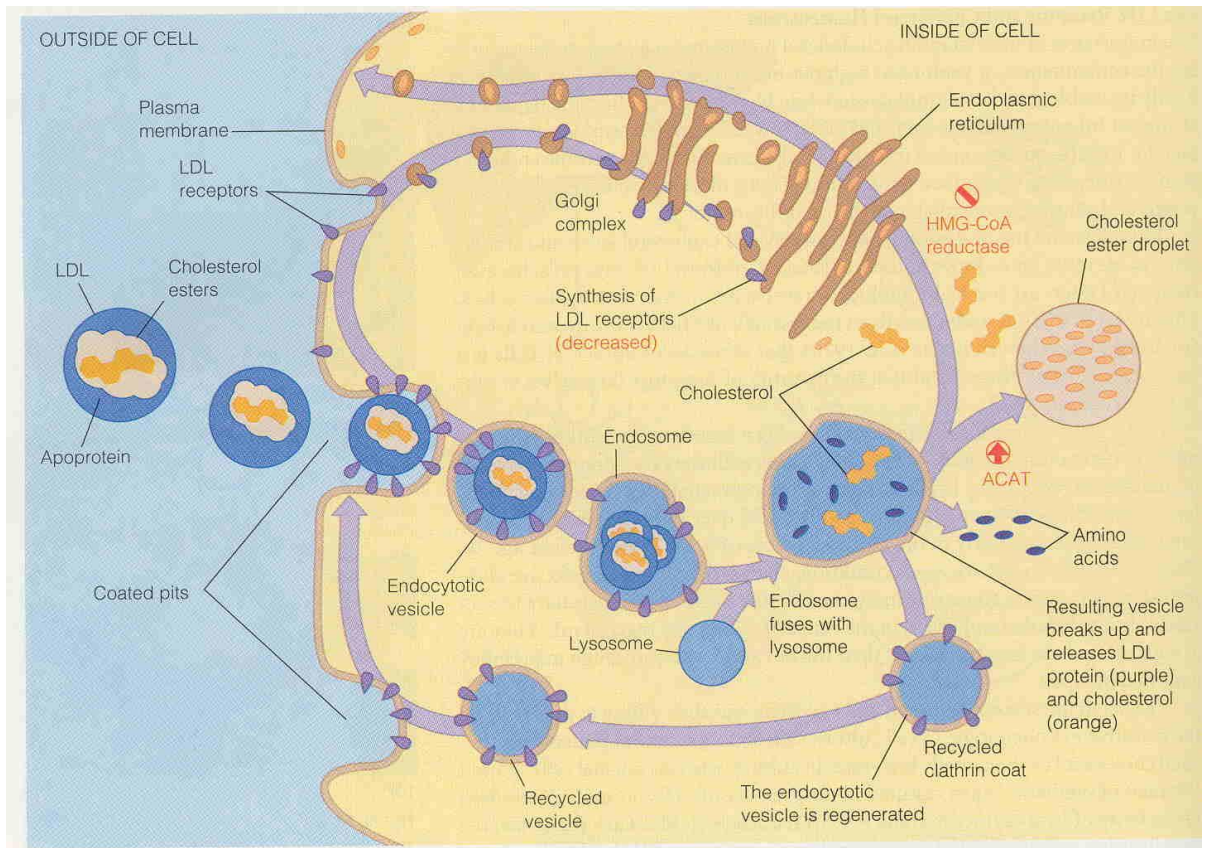
Hlavní funkcí LDL receptoru je poskytovat buňce cholesterol, který je nutný k syntéze membrán a je prekurzorem pro syntézu hormonů a žlučových kyselin. LDL receptory jsou přítomny na všech buňkách, nejvíce se však nachází v játrech, nadledvinách a pohlavních žlázách. Počet LDL receptorů je zpětnovazebně regulován množstvím cholesterolu v buňce. Spolu se scavengerovými receptory jsou exprimovány na povrchu makrofágů (5,13).

Poruchy LDL receptorů dělíme do 4 skupin (5):

- porucha syntézy receptorů
- porucha transportu receptorů z endoplazmatického retikula na povrch buňky
- porucha vazby lipoproteinu na receptor
- porucha internalizace

Acetyl-LDL receptory (scavenger receptory) jsou exprimovány na buňkách monocytů, makrofágů, na buňkách hladkých svalů a endoteliích. Jejich počet není ovlivněn hladinou cholesterolu a nedochází ke zpětnovazebné regulaci. Hrají významnou roli v rozvoji aterosklerózy. Při zvýšené koncentraci LDL částic dochází k jejich vychytávání makrofágy. Makrofág, který již nemůže vycestovat z arteriální stěny, se mění na rezidentní makrofág a pěnovou buňku. Makrofágy vylučují cytokiny a další chemotaktické působky a podléhají apoptóze. U familiární hypercholesterolemie chybí funkční LDL receptory a převážná část LDL cholesterolu je tak metabolizována prostřednictvím scavenger receptorů (5,13).

Obrázek 9: Schéma uptake cholesterolu



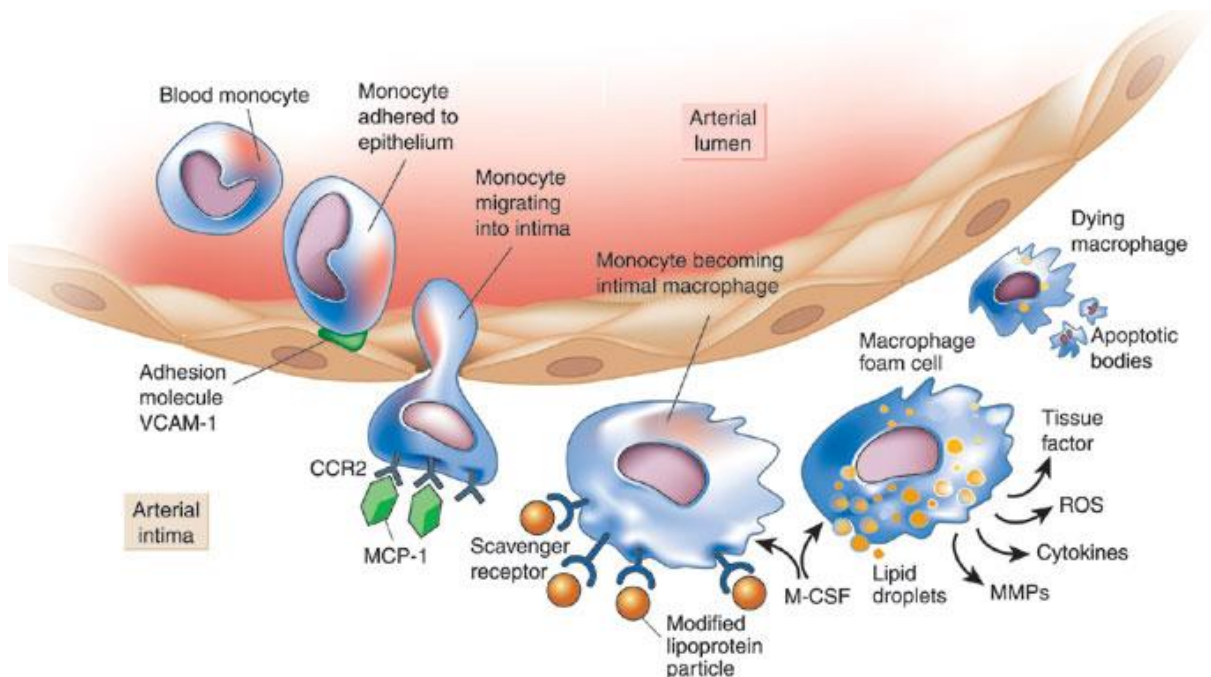
[web.campbell.edu](http://web.campbell.edu) (28.4.2011)

### 3.3.4 FÁZE ATEROSKLERÓZY

#### 1) Úvodní fáze – tvorba tukového proužku

Celý proces vzniká v endotelové části arteriální stěny tenkými lézemi endotelu. Zvýšená permeabilita endotelu vede k prostupu monocytů, lymfocytů, LDL částic a dalších složek plazmy do subendotelové vrstvy. LDL se kumulují a modifikují prostřednictvím oxidace a neenzymatické glykace. Monocyty ve stěně tepny podléhají přeměně na makrofágy. Makrofágy fagocytují oxidované LDL částice a vznikají pěnové buňky. Pěnové buňky jsou makroskopicky patrné jako žluté skvrny, jelikož neprostupují do lumina cévy, nemohou tedy významně ovlivnit průtok krve (8,19,20).

Obrázek 10: Úvodní fáze aterosklerózy

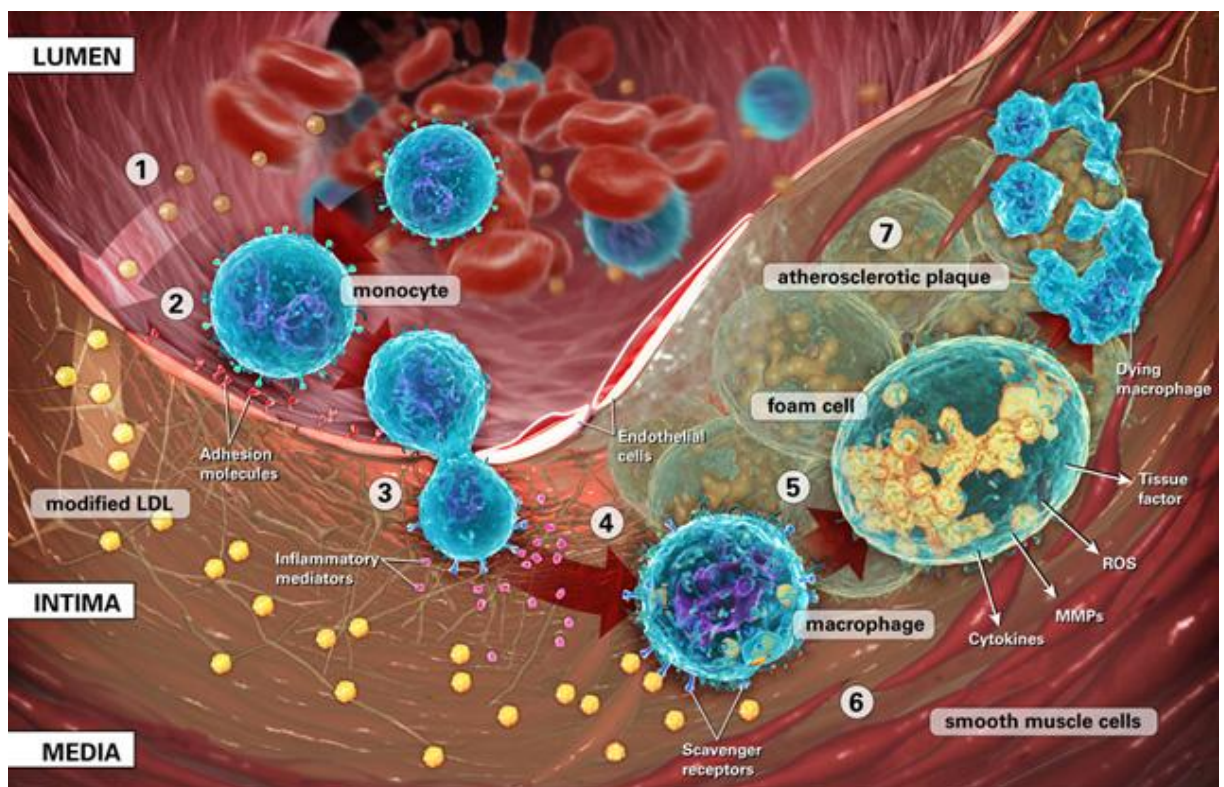


[www.nature.com](http://www.nature.com) (28.4.2011)

## 2) Progresivní fáze – tvorba aterosklerotického plátu

Zvyšuje se množství makrofágů. Na rozhraní medie a intimy dochází k poškození lamina elastica interna, hladké svalové buňky prochází do subendotelového prostoru, kde proliferují a transformují se do pěnových buněk. Nad pěnovými buňkami se tvoří fibrózní vrstva z kolagenu a hladkých svalových buněk. Makroskopicky jsou pláty bledě šedé nebo žluté barvy. Svalově elastická složka je postupně destruována a nahrazována masou depozit kolagenu, lipidů a kalcia. Dochází ke ztlustění cévní stěny a jejího vyklenutí do lumina, což může být příčinou částečné či úplné obstrukce cévy a následných komplikací (8,19,20).

Obrázek 11: Tvorba aterosklerotického plátu

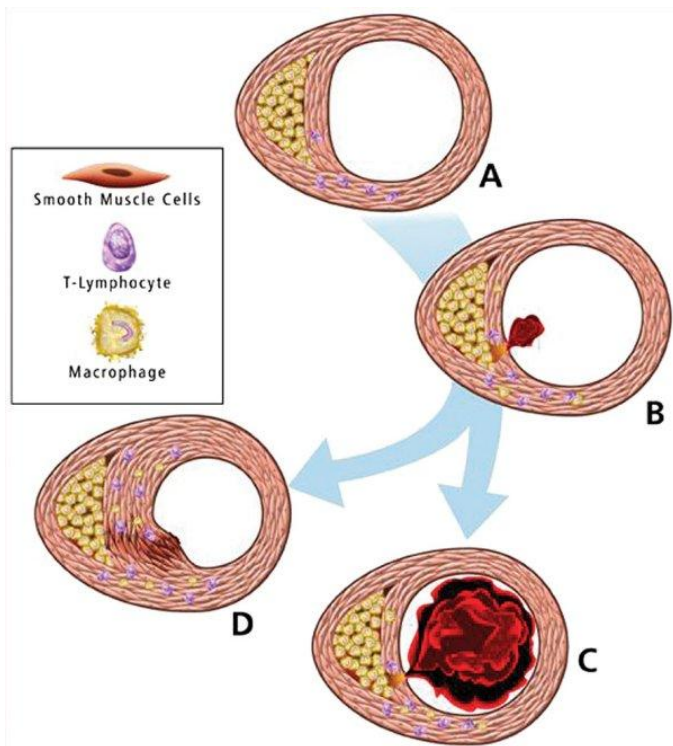


[www.invivo.ca](http://www.invivo.ca) (28.4.2011)

### 3) Fáze komplikací

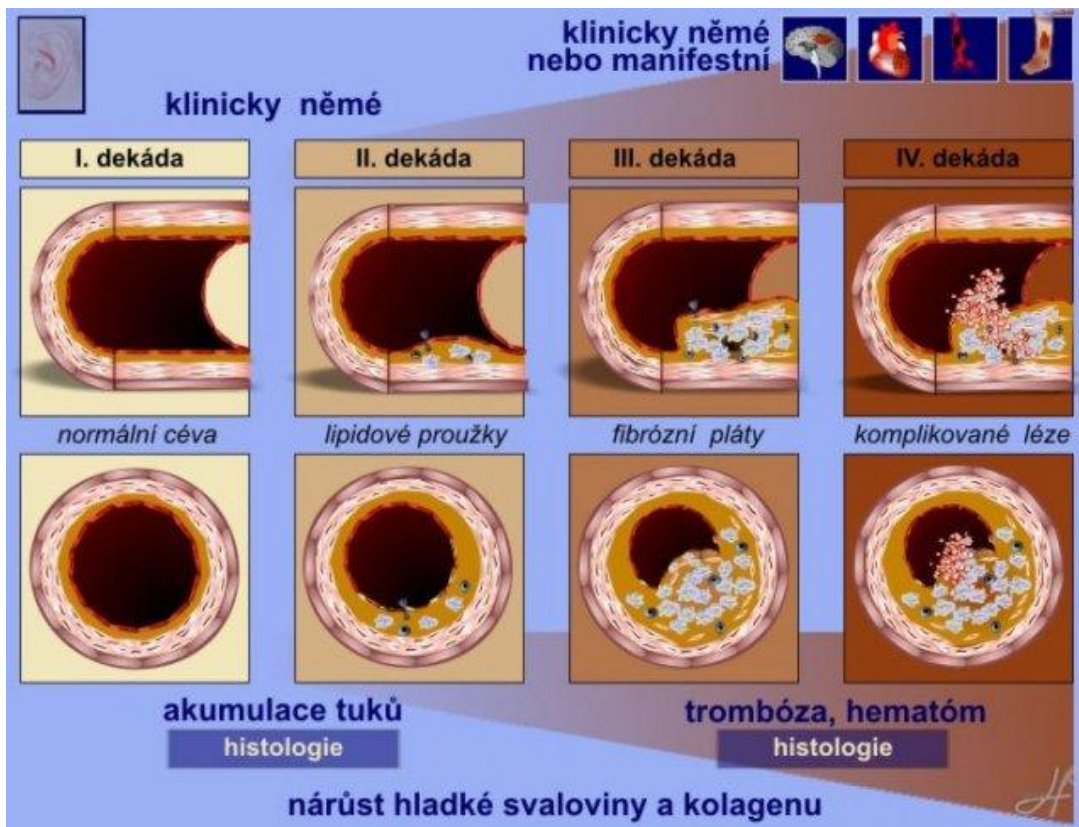
Stabilní pláty, které postupně cévní lumen zužují, jsou odpovědné za vznik námahových stenokardií. Na cévní obstrukci se podílí aterotrombotická složka. V aterosklerotických plátech se tvoří PAI-1, který inhibicí fibrinolýzy může navodit protrombotický stav. Nestabilní plát často při okraji praská a nasedající trombóza vede k náhlému cévnímu uzávěru. Trombóza je zodpovědná za akutní koronární syndromy (infarkt myokardu a nestabilní anginu pectoris) (5,12).

Obrázek 12: Vývoj stabilního a nestabilního plátu



<http://highered.mcgraw-hill.com> (3.5.2011)

Obrázek 13: Vývoj aterosklerózy v čase



[www.rheapharm.cz](http://www.rheapharm.cz) (1.5.2011)

## 4 MYŠÍ MODEL ATEROSKLERÓZY

Pro studium patogeneze a léčbu aterosklerózy byla použita již řada zvířecích druhů. Experimentální aterogeneze má svůj počátek v r. 1908 kdy Ignatowski (21) použil jako model králíka a prokázal tloušťnutí intimy v aortě. Nejčastěji používanými zvířecími druhy jsou relativně velká zvířata jako primáti, prasata, králíci a rovněž křečci. Krysy a psi nejsou dobrými modely pro aterosklerózu, protože spontánně netvoří aterosklerotické léze a pro jejich tvorbu potřebují složitě modifikovanou stravu (22). Opice se příliš nepoužívají v zájmu ochrany ohrožených druhů (23).

Až do r. 1992 se většina výzkumů zaměřila na studium mechanismu aterosklerózy u králíků, kteří jsou k cholesterolu velmi citliví a u prasat, jejichž modely nám pomohly objasnit, že infiltrace monocytů je jedním z prvních kroků v procesu aterogeneze (22,24). Přestože aterosklerotické léze u prasat jsou velmi podobné těm u lidí, problémem jejich cena, potíže spojené s údržbou chovů a přepravou. Právě z těchto důvodů se jako nejhodnější jeví myší modely aterosklerózy, které jsou malé, reprodukovatelné a umožní nám provést studie, vyžadující velký počet zvířat. Výhodou myších modelů je také možnost plně ovlivňovat jejich životní podmínky a stravu (23).

Myši jsou vůči ateroskleróze rezistentní. Jedinou výjimkou je C57BL/6 kmen. Jejich vaskulární léze se od však od lidských odlišují a jejich vznik je připisován spíše chronickému zánětu než genetické predispozici (23).

Mnoho let se myší modely podceňovaly. Zejména proto, že léze byly tvořeny pouze z pěnových buněk s minimální spoluúčastí buněk hladkých svalů. Poukázalo se na to, že léze jsou malé a omezené zpravidla jen na aortu. Tento problém se vyřešil použitím citlivých kmenů a vhodně upravenou stravou (23).

Lidé a myši se odlišují v řadě aspektů. Průměrná délka života u myši je 2 roky, váží mnohem méně (asi jen 30 gramů) a jejich lipidový profil je také vel-

mi odlišný s převahou protektivního HDL cholesterolu. Proto myš krmená nízkotučnou stravou nevyvíjí aterosklerózu (23).

Myši jsou malé, což znesnadňuje chirurgickou manipulaci *in vivo*. Moderní technologie se však s tímto problémem dokáže vyrovnat a je schopna mimo jiné provést srdeční katetrizaci a podvázat koronární artérie k vyvolání srdeční ischemie. Genetické inženýrství a molekulární genetika provádí u myši genetické experimenty, je schopno dodat, odebrat či nahradit některé myší geny (23).

V 60. letech byl ve Wislerově laboratoři použitý první myší model založený na stravě obsahující 30 % tuku, 5 % cholesterolu a 2 % žlučových kyselin. Tato strava však vedla k tomu, že myši ztrácely na váze a trpěly chorobami respiračního traktu. Paigen a kolektiv tuto stravu modifikovali na stravu s obsahem 10% tuku (25). Přestože byl tento model hojně užíván, měl také své nevýhody – aterosklerotické léze byly velmi malé, ve formě tukového proužku omezeny zpravidla jen na aortu. Navíc Luis a kolektiv poukázali na to, že dieta sama o sobě indukuje zánětlivou reakci (26). Tato vědecká skupina však vynalezla široce využívanou metodu, umožňující mikroskopicky sledovat aterosklerotické léze ve speciálně upravených vzorcích (27).

Velký pokrok představuje ApoE deficitní myší model. Apolipoprotein E je glykoprotein, který je syntetizován v játrech, v mozku a v dalších tkáních, jak u člověka, tak u myši. Je součástí všech lipoproteinů, kromě LDL cholesterolu. Je důležitý pro interakci s LDL receptorem a umožňuje zpětný transport aterogenních částic z krve do jater (28). ApoE gen byl vypnut homologní rekombinací s využitím plazmidů.



Pro tyto myši je typická vysoká hladina HDL a nízká hladina LDL cholesterolu. Myši také zřejmě postrádají cholesteryl ester transferázu. Navzdory odlišnostem v lipidovém spektru však bylo zjištěno, že ApoE deficitní myši se nám fenotypově velmi podobají. U ApoE deficitního modelu byl pozorován pokles HDL



cholesterolu a současně vzestup plazmatického cholesterolu až 5 krát nezávisle na věku či pohlaví zvířat. Hladina triglyceridů vzrostla o 68% (23).

Pro experimentální účely jsou myši krmeny speciální stravou. Používá se Paigen dieta či „Western typ“ dieta. Ta je svým složením velmi podobná lidské potravě. Je složena z 21 % tuku, 0.15 % cholesterolu a neobsahuje žlučové kyseliny. Při použití této diety byl u ApoE deficitních myší pozorován vzrůst plazmatických hladin cholesterolu o více jak trojnásobek (29).

U myší ve věku 5-6 týdnů můžeme pomocí elektronového mikroskopu pozorovat adhezi monocytů k endotelu aorty a jejich prostup do subendotelového prostoru. Ve věku 6-10 týdnů má většina ApoE deficitních myší již vyvinuté tukové proužky tvořené pěnovými buňkami s migrací buněk hladké svaloviny. Tyto rychle narůstají do pokročilých lézí, které jsou tvořené nekrotickým jádrem obklopeným hladkými svalovými buňkami a extracelulární matrix obsahující kolagen a elastin. Tyto léze mají na povrchu vytvořenou čepičku z hladko-svalových buněk a extracelulární matrix obklopenou na obou stranách pěnovými buňkami. Zánětlivé léze mohou prostoupit hluboko do aortální stěny a vytvořit aneurysma. U starších myší dochází ke kalcifikaci aterosklerotických lézí (30).

Dalším myším modelem pro experimentální aterosklerózu je LDLR-KO model, tzv. LDL receptor deficitní myš. Jde o model lidské familiární hypercholesterolémie. Tyto myši, v případě, že jsou krmeny běžnou stravou, netrpí aterosklerózou. Pokud dostávají tučnou stravu (Paigen strava, či lidské stravě podobná „Western typ“ strava) jsou schopny tvořit výrazné, pokročilé aterosklerotické léze a hladina cholesterolu dosahuje 400mg/dl a víc (23,31,32).

Zajímavým modelem je kmen myší s dvojitým deficitem ApoE a LDL receptoru. Aterosklerotické léze se vyvíjí výrazněji, než u ApoE deficitního modelu. Výhodou je možnost sledovat antiaterogenní působení látek, aniž by zvířata musela přijímat aterogenní stravu (23,32,33,34).

Obrázek 14: <http://obezita.navajo.cz> (29.4.2011)

## 5. SMAD PROTEINY A JEJICH ROLE V PROCESU ATEROGENEZE

### 5.1. TRANSFORMUJÍCÍ RŮSTOVÝ FAKTOR A FUNKCE TGF- $\beta$ 1

V experimentálních studiích byla, ve spojitosti s procesem aterosklerózy, identifikovaná řada zánětlivých faktorů, které mají za následek akceleraci a urychlení aterogenního procesu. Také bylo identifikováno pár endogenních protizánětlivých substancí, které mají schopnost tento proces omezit (35).

Jedním z nich je transformující růstový faktor (TGF). Je členem rodiny zvané „transforming growth factor superfamily“, která zahrnuje velké množství strukturálně podobných polypeptidů. TGF ovlivňuje buněčnou proliferaci, diferenciací, tvorbu extracelulární matrix a má také imunomodulační účinek (76).

U savců byly identifikovány tři izoformy TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3). Z hlediska exprese v cévách je nejvýznamnější TGF- $\beta$ 1 cytokin, který působí prostřednictvím SMAD proteinů, které se tak staly klíčovými regulátory cévní zánětlivé odpovědi a aterogeneze. Má ochrannou funkci v procesu aterosklerózy, vlivem svého protizánětlivého a anti-proliferativního působení (35).

Jak experimentální tak klinická data podporují roli cytokinu TGF- $\beta$ 1 jako regulátoru imunitní a zánětlivé odpovědi ve vývoji aterosklerózy (40-42).

TGF- $\beta$ 1 indukuje tvorbu extracelulární matrix, je považován za profibrotický faktor a má tak i významnou roli v procesu hojení ran a reparace tkání (78).

Role TGF- $\beta$ 1 jako regulátoru zánětu byla potvrzena v experimentálních pokusech u myší, které měly cíleně vymazány gen pro TGF- $\beta$ 1. Tyto myši perinatálně umíraly následkem systémového zánětu s nahromaděním makrofágů a leukocytů v postižených orgánech (43,44). Systémovým podáním TGF- $\beta$ 1 došlo ke zvrátu zánětlivé reakce (44).

Řada studií zkoumala vztah mezi koncentrací TGF- $\beta$ 1 a přítomností aterosklerotického postižení koronárních artérií. V těchto studiích měli pacienti

s rozvinutou aterosklerózou prokazatelně nižší hladinu TGF- $\beta$ 1 v porovnání s pacienty bez aterosklerózy, což vysvětluje protektivní vliv TGF- $\beta$ 1 (45).

Přímý vliv TGF- $\beta$ 1 na stabilitu aterosklerotického plátu a tvorbu ateromu byl nedávno prozkoumán s využitím myších modelů aterosklerózy. Nízká hladina TGF- $\beta$ 1 vytváří zánětlivé prostředí urychlující a podporující aterogenezi. (41,42)

Myši s mutovaným genem pro TGF- $\beta$ 1 krmeny tučnou stravou tvořily tukové proužky s nahromaděním lipidů, makrofágů a se známkami poškození endotelu (46).

TGF- $\beta$  vykonává své účinky prostřednictvím receptorů, které se označují TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII. Kromě těchto dvou receptorů existuje také „pomocný“ TGF- $\beta$ RIII, který se také nazývá endoglin.

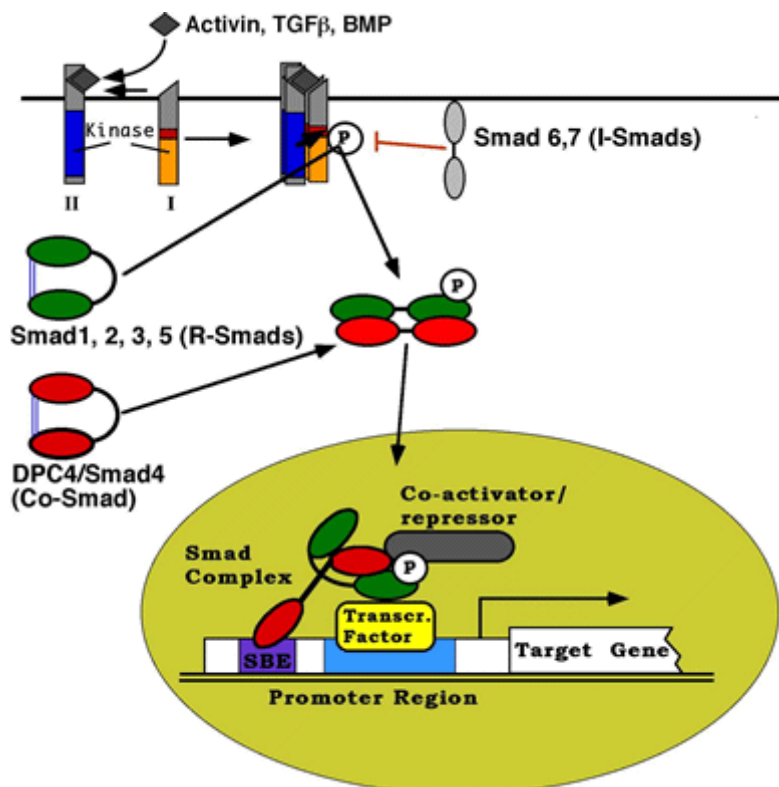
## 5.2 TGF- $\beta$ SIGNALIZACE

V průběhu posledních desetiletí bylo dosaženo významného pokroku v objasnění TGF- $\beta$  signální transdukce a způsobu, kterým TGF- $\beta$  receptory aktivují intracelulární proteiny náležící k rodině SMAD. SMAD se účastní regulace buněčných funkcí a zánětlivé odpovědi (36,38,39,47).

TGF- $\beta$ 1 je aktivován pomocí TSP-1 nebo integrinu  $\alpha\beta$ 6 (48).

Váže se na receptor TGF- $\beta$  typu II, který je konstitutivně aktivován a fosforyluje receptor TGF- $\beta$  typu I ALK-5. Fosforylovaný receptor typu I podstoupí konformační změny, které umožní přenést signál vzniklý vazbou TGF- $\beta$  do nitra buňky a fosforylací aktivovat SMAD proteiny. Tento děj je facilitován membránovými proteiny SARA. Aktivované SMAD proteiny poté působí jako intracelulární efektoři, translokují se do jádra, kde řídí transkripci genů (35).

Obrázek 15: TGF- $\beta$  signalizace



[www.ruhr-uni-bochum.de](http://www.ruhr-uni-bochum.de) (2.5.2011)

## 5.3 SMAD PROTEINY

### Fosforylované SMAD (SMAD 1, 2, 3, 5, 8, 9)

**SMAD 2 a SMAD 3 (R-SMAD)** jsou aktivovány interakcí TGF- $\beta$ 1 s receptorem ALK5. Inhibují proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Inhibují tedy aterogenezi a jejich exprese v aterosklerotických plátech v průběhu aterogeneze klesá. SMAD 2 navíc zvyšuje aktivitu eNOS v endoteliálních buňkách, zvyšuje tvorbu NO a tím zlepšuje funkci endotelu. R-SMAD působí skrz řadu mechanismů zahrnujících DNA-protein interakci či protein-protein interakci (35).

Jejich sekvence aminokyselin je z 92% identická, funkčně však nejsou zcela ekvivalentní. Rozdíl spočívá v MH1 doméně. Vlasečnicovitá struktura beta, která zprostředkovává vazbu DNA, je ve SMAD 2 mírně posunuta, což zeslabuje schopnost SMAD 2 vázat DNA (49).

Deficitní SMAD 2 myši umíraly prenatálně v důsledku vývojových vad. SMAD 3 deficitní myši trpěly po narození sníženou slizniční imunitou a sníženou schopností T-buněk reagovat na působení TGF- $\beta$ 1. V závislosti na fenotypu, některé myši umíraly mezi 1-10 měsícem po narození, u některých byly prokázány skeletální vady, osteoporóza a rakovina tlustého střeva. Z toho vyplývá, že SMAD 2 protein je důležitý pro správný embryonální vývoj a SMAD 3 reguluje řadu buněčných funkcí, včetně imunitní odpovědi (35).

**SMAD 1, SMAD 5, SMAD 8** jsou aktivovány další skupinou rodiny TGF- $\beta$ , která se nazývá „bone morphogenetic proteins“ (BMPs). Interakcí TGF- $\beta$ 1 s receptorem ALK-1 však dochází k fosforylaci SMAD 1 a SMAD 5. Tyto proteiny aktivují endotel, stimulují proliferaci a migraci endotelových buněk (35).

### KO-SMAD (SMAD 4)

Neinteragují s receptorem, ale reagují s fosforylovanými SMAD proteiny před vstupem do jádra. Jejich zvýšená aktivita může inhibovat proliferaci en-

dotelií a novotvorbu cév v tumoru. Jejich exprese v aterosklerotických lézích klesá (35).

#### **Inhibiční SMAD (SMAD 6, 7)**

Inhibují TGF- $\beta$  signalizaci. SMAD 6 jsou exprimovány ve zvýšené míře v endoteliích zdravých cév, než v aterosklerózou postižených cévách (35).

Vzhledem k důležitosti TGF- $\beta$ 1 v procesu aterogeneze, byla role SMAD proteinů jako mediátorů tohoto procesu předmětem intenzivního výzkumu. SMAD jsou exprimovány v buňkách cévní stěny. Míra jejich exprese a jejich funkce však je buněčně specifická. V následující podkapitole se budeme podrobněji zabývat funkcí SMAD 3 (35).

#### **5.4. SMAD 3 PROTEIN**

Tento protein je zásadní pro řadu buněčných dějů. Předmětem výzkumu byla jeho schopnost ovlivňovat imunitní děje, aktivitu makrofágů a funkcí endotelových buněk, jako odpověď na působení TGF- $\beta$ 1. SMAD 3 zprostředkovává inhibiční účinek TGF- $\beta$ 1 na cytokiny.

V případě transplantace srdce SMAD 3 deficitním myším, docházelo v koronárních artériích dárcovského srdce k rozvoji arteriopatí s infiltrací makrofágů a k expresi MCP1 (35).

#### **Vliv SMAD 3 na monocyty/makrofágy**

SMAD 3 je důležitý pro potlačení zánětlivé reakce. Mění funkcí klíčových transkripčních faktorů a inhibuje expresi iNOS, MCP-1 a MMP-9, jako odpověď na inhibiční působení TGF- $\beta$ 1 v makrofázích (50-52).

Ve SMAD 3 deficitních makrofázích a hladko-svalových buňkách je bloková-  
ný inhibiční vliv TGF- $\beta$ 1 na cytokiny a tím dochází k aktivaci zánětlivých mediáto-  
rů. SMAD 3 deficit je pravděpodobně odpovědný za akceleraci aterosklerózy a  
jeho exprese v aterosklerotických lézích je snížena (35).

### **Vliv SMAD 3 na T buňky**

Důležitost TGF- $\beta$ 1 jako regulátoru zánětlivé odpovědi je také prokázána je-  
ho vlivem na T-buňky. U SMAD 3 deficitních myší dochází ke spontánní aktivaci T  
buněk a postižení slizniční imunity (53,54).

CD4+ a CD8+ T buňky SMAD 3 deficitních vykazovaly sníženou schopnost  
TGF- $\beta$ 1 inhibovat produkci IL-2 a ostatních zánětlivých mediátorů (55).

Studie potvrzují rozhodující vliv SMAD 3 na aktivaci, diferenciaci a růst T  
buněk. Vzhledem k tomu, že CD4+ T buňky jsou důležitými mediátory při tvorbě  
aterosklerotického plátu, výzkum je zaměřen na úlohu SMAD 3 v T buňkách  
s cílem omezit zánětlivou odpověď T buněk (35).

### **Vliv SMAD 3 na hladko-svalové buňky**

TGF- $\beta$ 1 inhibuje cytokiny indukovanou expresi IL-6 a iNOS (51). IL-6 a iNOS  
nejen aktivují hladko-svalové buňky, ale také se podílí na dalších biologických  
dějích, které přímo ovlivňují proces aterogeneze. IL-6 indukuje expresi adheziv-  
ních molekul (ICAM-1), cytokinů a markerů akutní fáze zánětu (CRP) a podporuje  
proliferaci VSMCs (56, 57).

U SMAD 3 deficitních VSMCs byl inhibiční vliv TGF- $\beta$ 1 blokován. Zjistilo se,  
že inhibiční vliv SMAD 3 může být potencován SMADem 4, který usnadňuje  
translokaci do jádra a zesiluje inhibiční působení (51).

## 6 STATINY

V roce 1976 bylo zjištěno, že produkt plísně *Penicillium citricum* snižuje hladinu cholesterolu blokádou HMG-CoA-reduktázy. Deset let poté byl do praxe uveden první lék z této skupiny – lovastatin. V současnosti máme na našem trhu k dispozici simvastatin a dále látky syntetického původu jako fluvastatin, atorvastatin a nejnovější rosuvastatin(1,58).

Statiny jsou účinné u všech typů hyperlipoproteinémií. Existuje mnoho klinických studií o jejich příznivém vlivu na ICHS v rámci primární i sekundární prevence. Statiny stabilizují koronární aterosklerotické pláty, zlepšení funkci endotelu a inhibují agregaci krevních destiček, čímž snižují trombotický potenciál. Snižují koronární a celkovou morbiditu a mortalitu (3).

Statiny mají také řadu extralipidových účinků, o nichž bude pojednáno v kapitole 6.5.

### 6.1 Mechanismus účinku

Jedná se o kompetitivní inhibitory HMG-CoA-reduktázy, která je lokalizovaná v hladkém endoplazmatickém retikulu jaterních buněk. Tento enzym je zodpovědný za převedení 3-HMG-CoA na kyselinu mevalonovou. Jde o klíčovou reakci v syntéze cholesterolu (5,58).

Aktivita HMG-CoA reduktázy je ovlivňována koncentrací cholesterolu. Zvýšená hladina cholesterolu její aktivitu snižuje a naopak, při nedostatku cholesterolu se její aktivita zvýší. Společně s LDL receptory se podílí na regulaci plazmatické koncentrace cholesterolu. Látky obsahující skupiny strukturálně podobné substrátu, mohou tento enzym inhibovat (5,58).

Tímto se sníží syntéza a dostupnost cholesterol. Nedostatek cholesterolu vede ke zmnožení LDL-receptorů na buněčné membráně všech buněk, především však hepatocytů, které zvýšeně vylučují LDL cholesterol z cirkulace. Ja-



terní buňky zřejmě vycytávají i částice LDL, tímto se urychlí eliminace LDL částic a sníží se jejich produkce (5,58).

Statiny snižují koncentraci LDL cholesterolu v závislosti na dávce o 25-60%, koncentraci triglyceridů o 10-30% a koncentrace HDL zvýší o 5-10% (1). Koncentraci triglyceridů snižují pravděpodobně prostřednictvím snížení syntézy VLDL v játrech a zvýšením odbourávání VLDL částic prostřednictvím LDL receptorů. Tento příznivý efekt ovšem nelze očekávat u pacientů s homozygotní familiární hypercholesterolemií, při níž se nemohou tvořit funkce schopné LDL-receptory (5,58).

Zdvojnásobení dávky statinu nevede ke zdvojnásobení účinku. Platí pravidlo šesti. Zdvojnásobením dávky statinu se sníží LDL cholesterol jen o cca 6%. Zvyšováním dávek se však zvyšuje riziko nežádoucích účinků. Z tohoto důvodu se raději doporučuje kombinační léčba, nežli terapie vysokými dávkami statinu.

## **6.2 Farmakokinetika**

Po perorálním podání se statiny dobře vstřebávají. Lovastatin a simvastatin jsou laktony vlastních účinných látek, které se na účinnou formu přeměňují v játrech a později jsou eliminovány zejména žlučí. Játra jsou tedy účinné formě těchto látek výrazně vystavena, zatímco jiné tkáně vytvářející steroidní hormony jsou ušetřeny. Biologický poločas rosuvastatinu je asi 20 hod, atorvastatinu 14 hod, ostatních statinů kolem 4 hod. Všechny statiny lze podávat v jedné denní dávce, nejlépe na noc, neboť syntéza endogenního cholesterolu probíhá zvýšeně v nočních hodinách (1,58).

## **6.3 Nežádoucí účinky**

Kromě trávicích poruch a nežádoucích kožních reakcí, stojí za zmínku zvýšená aktivita jaterních transamináz (58).

Statiny mohou způsobit poškození svalové tkáně. Mezi klinické příznaky poškození svalů patří svalová slabost, bolest, ztuhlost nebo otok (59,82). V těchto případech by měl být statin okamžitě vysazen.

Závažnou komplikací je rhabdomyolýza. Uvolnění velkého množství myoglobinu ze svalů a jeho následné toxické působení v ledvinách může způsobit až akutní selhání ledvin (60,82).

Riziko se zvyšuje při současném užívání fibrátů nebo léčiv, které inhibují cytochrom P450. Proto kombinační léčba patří vždy do rukou zkušeného lékaře. Doporučuje se pravidelně kontrolovat aktivitu transamináz a kreatinfosfokinázy (58).

Mezi nežádoucí účinky patří také zánět slinivky břišní a periferní neuropatie (61).

#### **6.4 Kontraindikace**

Mezi kontraindikace statinů je řazena přecitlivělost na účinnou látku, hepatální insuficience, hepatitida, gravidita a laktace. Statiny nesmí užívat ženy ve fertilním věku bez účinné antikoncepce (3).

## 6.5 PLEIOTROPNÍ PŮSOBNÍ STATINŮ

Výsledky experimentálních i klinických studií poukazují, že příznivé působení statinů není založeno pouze na jejich hypolipidemickém účinku, ale i na tzv. pleiotropních účincích, které se taktéž podílí na snížení koronární mortality (12,62).

Mezi nejvýznamnější pleiotropní účinky statinů řadíme (12,62):

- antiagregační působení, udržování příznivé rovnováhy mezi fibrinolytickými a protrombotickými mechanismy
- protizánětlivé působení
- normalizace a zlepšení funkce endotelu
- stabilizace aterosklerotických plátů

Při dlouhodobé terapii statiny byla pozorována vyšší hodnota kostní denzity a nižší incidence kostních zlomenin (58).

Statiny mají také imunomodulační účinky, působí na povrchový antigen HLA II a jejich efekt se zkoumá v souvislosti s autoimunitními chorobami (63). Vedou k poklesu leukocytů, T-lymfocytů, ICAM-1, leukotrienů a interferonu gamma (64). Působí imunosupresivně a brání rejekci transplantátu (62).

Vykazují také příznivý vliv u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, snižují proteinurii, působí nefroprotektivně a vazoprotektivně zvýšením produkce NO a snížením exprese adhezivních molekul (ICAM-1) (65,66, 67).

Prostřednictvím svého vlivu na PPAR receptory příznivě ovlivňují kompenzaci diabetu a inzulínovou rezistenci. Snižují produkci zánětlivých cytokinů a zlepšují transport glukózy a inzulínu. Zpomalují také rozvoj demence u Alzheimerovy choroby. Zvýšením aktivity alfa-sekretázy snižují tvorbu amyloidních plaků (68,69.).

Statiny ovlivňují metabolismus makrofágů a snižují jejich aktivaci. Mezi jednotlivými statiny existují rozdíly. Fluvastatin a simvastatin inhibují esterifikaci cholesterolu v makrofázích a mohou tak snižovat tvorbu pěnových buněk. Všechny statiny kromě pravastatinu inhibují proliferaci myocytů cévní stěny (12).

### **Vliv statinů na funkci endotelu**

Po podání statinů dochází ke zlepšení endoteliální funkce a ke stabilizaci aterosklerotického plátu. Děje se tak prostřednictvím jejich hypolipidemického efektu. Endoteliální dysfunkce a porucha endotelu je prvním stádiem aterosklerotického procesu a souvisí s nedostatkem vazodilatačních substancí (5).

Statiny přispívají k obnově produkce oxidu dusnatého prostřednictvím zvýšení exprese a aktivity NO-syntetázy. Klinické studie prokázaly, že po 3měsíční terapii statiny dochází ke zvýšené arteriální dilataci (70).

Vyznačují se také antioxidační aktivitou, brání hypertrofii myokardu a zlepšují jeho prokrvení (71,3).

### **Antiagregační působení statinů**

Statiny příznivě ovlivňují hemostatické a hemoreologické vlastnosti krve prostřednictvím snížení viskozity krve, inhibice agregace krevních destiček a snížením hladiny fibrinogenu (3).

Zvýšená hladina cholesterolu narušuje vazomotorickou regulaci cév. Antiagregační působení souvisí také s příznivým vlivem statinů na funkci endotelu. Správná funkce endotelu je nezbytná pro regulaci vazomotorického tonu, podporuje fibrinolýzu, inhibuje aktivitu krevních destiček a snižuje riziko vzniku trombózy (3,72).

## Působení statinů na zánětlivé stavy

Statiny snižují hladinu zánětlivého markeru CRP. CRP je bílkovina přítomná v krvi při zánětlivých systémových či revmatických chorobách (4) Pacienti se zvýšenou hladinou CRP mají vyšší riziko vzniku kardiovaskulárních komplikací. Potlačení zánětu a snížením CRP dochází ke stabilizaci aterosklerotického plátu (12).

Tabulka 2: Pleiotropní účinky statinů ( dle [www.zdn.cz](http://www.zdn.cz) ( 30.4.2011))

<b>Tab. 1 – Pleiotropní účinky statinů</b>	
Endoteliální buňky	↑ aktivity eNOS
	↑ exprese tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA)
	↓ exprese aktivátoru inhibitoru plazminogenu 1 (PAI 1)
	↓ syntézy a exprese endotelinu 1 (ET1)
	↓ reaktivních kyslíkových radikálů
	↓ exprese prozánětlivých cytokinů (IL-1b, IL-6, COX-2)
Hladké svalové buňky	↓ migrace a proliferace
	↓ reaktivních druhů molekul kyslíku
	↓ exprese receptoru AT1 pro angiotenzin II
	↑ apoptózy
Destičky	↓ reaktivity
	↓ syntézy tromboxanu A2 (TxA2)
Monocyty a makrofágy	↓ růstu
	↓ exprese a sekrece matrixových metaloproteináz
	↓ exprese a aktivity tkáňového faktoru
	↓ exprese inducibilní NO syntázy
	↓ exprese prozánětlivých cytokinů (IL-1b, IL-6, COX-2)
	↓ sekrece IL-8
Zánětlivá cévní reakce	↓ hs-CRP
	↓ leukocytární adheze
	↓ exprese adhezivních molekul
	↓ aktivace nukleárního faktoru κB

## 6.6 ATORVASTATIN

Atorvastatin je nejprodávánějším statinem. Používá se samostatně nebo do kombinační léčby s ostatními hypolipidemiky. Nevýhodou je neutrální, až mírně negativní vliv vysokých dávek atorvastatinu na HDL cholesterol (5).

Používá se k léčbě primární a familiární hypercholesterolemie a smíšené hyperlipidemie. Po perorálním podání je rychle absorbován a maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 1-2 hodinách. Jeho nízká systémová dostupnost (12%) je připisována vysokému first-pass metabolismu (61).

Jeho příznivý efekt na hladinu krevních lipoproteinů potvrdila řada studií, v nichž snižoval riziko kardiovaskulárních příhod a celkovou mortalitu prostřednictvím snížení hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, apo B a TG (61).

Má také řadu extralipidových účinků.

Obrázek 12: Schéma nelipidových účinků atorvastatinu (73).



## **7 CÍL PRÁCE-ZADÁNÍ**

Cílem této diplomové práce bylo popsat vliv atorvastatinu na expresi člena TGF- $\beta$ /endoglin signalizační kaskády, konkrétně fosforylované formy SMAD 3. K tomu byly využity imunohistochemické metody. Dále jsme sledovali vliv atorvastatinu na spektrum lipidů a velikost aterosklerotických plátů.

## **8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **8.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA**

Pro pokus bylo použito 16 samic ApoE/LDL receptor deficitních myší kmene C57BL/6J. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin. První kontrolní skupina byla 8 týdnů krmena standardní dietou. Po stejnou dobu byla stejnou stravou krmena i zvířata druhé (atorvastatinové) skupiny. Zvířata druhé skupiny dostávala v potravě navíc atorvastatin v dávce 50 mg na 1 kilo živé váhy denně.

Každé zvíře bylo chováno v samostatné kleci a dostávalo denně 4 g stravy (ve speciálně upravených granulích). Všechna zvířata měla neomezený přístup k vodě. Během pokusu nebyly zaznamenány žádné rozdíly ve spotřebě stravy mezi jednotlivými zvířaty.

Na konci pokusu byla zvířata přes noc vyhladověna a usmrcena éterem. Byly vyjmuty tkáňové vzorky obsahující aortu společně s horní částí srdce k následné analýze. Vzorky byly umístěny do vhodného media (Leica, Praha, Česká republika) a následně zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny při teplotě -80 stupňů Celsia. Dále byly odebrány vzorky krve pro Biochemické vyšetření.

### **8.2 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA**

Nejdříve byly získány jednotlivé frakce sérových lipoproteinů využitím analytické ultracentrifugace (Beckman TL 100, Palo Alto, CA, USA). Koncentrace lipoproteinových frakcí byly zjištěny enzymaticky podle konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a pomocí spektrofotometrické analýzy (cholesterol při vlnové délce 510 nm, triglyceridy při vlnové délce 540 nm, ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Švédsko).



### **8.3 HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ**

Pro detekci lipidů v aterosklerotických lézích byly použity zmrazené části vzorků. Řezy byly sušeny na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 30 minut, poté byly 30 minut vystaveny působení olejové červeně a následně barveny Gillovým hematoxylinem.

### **8.4 IMUNOHISTOCHEMIE**

Pro imunohistochemickou analýzu byly nakrájeny řezy obsahující semi-lunární chlopně s aortou. Následně byly pořízeny příčné řezy tlusté 7  $\mu\text{m}$  a umístěny na podložní sklíčko potažené vrstvou želatiny. Pro detekci exprese SMAD 3 proteinu byla použita metodika Avidin-Biotin (ABC) s detekčním činidlem diaminobenzidinem (DAB), který v případě pozitivní reakce poskytuje hnědou barevnou reakci.

### **8.5 PROTILÁTKY**

Pro detekci proteinu SMAD 3 byla použita primární monoklonální protilátka rabbit Anti-Mouse p-SMAD 3 (ABCAM) ve zředění 1:50. Jako sekundární protilátka byla použita monoklonální protilátka goat anti-rabbit Ig (Vector laboratories, USA) ve zředění 1:400.

### **8.6 POSTUP**

Podložní sklíčka s tkáňovými řezy byly na 15 minut umístěny do roztoku acetonu uchovávaného při teplotě  $-20$  stupňů Celsia. Po krátkém oschnutí (15 minut) byl postup zopakován, čímž došlo k lepšímu přilnutí vzorku na sklíčko. Poté byly řezy opět krátce osušeny (15 minut), následně vloženy do roztoku PBS (2x5

minut) a připraveny pro analýzu. Nejprve byl nanesen 10 % roztok goat séra v PBS (30 minut) za účelem blokace nescifických vazebných míst. Následně se řezy inkubovaly s roztoky anti-avidinu a anti-biotinu (Vector Laboratoires, USA). Poté byla provedena inkubace (1 hodina) s primární protilátkou při pokojové teplotě. Následoval oplach v roztoku PBS (2x5 minut) a patnáctiminutová inkubace v 3% roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po dalším oplachu PBS (2x5 minut) byla nanesena sekundární protilátka (30 minut). Poté se řezy opět vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dalším krokem bylo nanesení enzymu peroxidázy konjugovaného s Avidin-Biotin komplexem. Následovalo přidání detekčního činidla DAB (Dako, Dánsko). V další fázi experimentu byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xylenu (10:1, 3 minuty), aceton-xylenu (1:10, 3 minuty) a v xylenu (3x2 minuty). Závěrem byly řezy ukotveny pomocí Eukittu.

Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu byla provedena za použití digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Ottawa, Kanada) pomocí softwaru NIS (Labortory Imaging, Česká republika).

## **8.7 STATISTICKÁ ANALÝZA**

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u skupin zvířat byl použit nepárový T test. Rozdíly byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$ , kde  $\alpha=0,05$ . K výpočtu byl použit GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA).

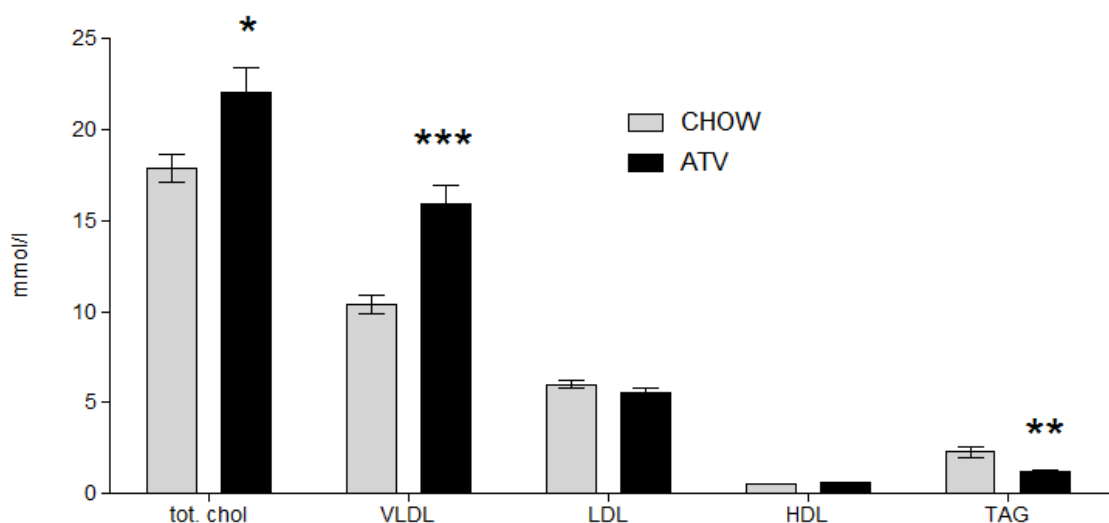
## 9. VÝSLEDKY

### 9.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA HLADIN CHOLESTEROLU U MYŠÍ

Biochemické analýzy krevních vzorků ApoE/LDLR dvojité deficitních myší prokázaly, že podávání 50mg/kg atorvastatinu denně mělo za následek prokazatelné zvýšení celkového cholesterolu ( $18 \pm 0.8$  vs.  $22 \pm 1.4$  mmol/l,  $p < 0.05$ ) a VLDL cholesterolu ( $10 \pm 0.5$  vs.  $16 \pm 1.0$  mmol/l,  $p < 0.001$ ) v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 1). Naproti tomu hladina LDL ( $6.0 \pm 0.2$  vs.  $5.5 \pm 0.3$  mmol/l) a HDL ( $0.5 \pm 0.01$  vs.  $0.6 \pm 0.03$  mmol/l) cholesterolu nebyla léčbou atorvastatinu ovlivněna. Léčba atorvastatinem však výrazně snížila hladinu TG v porovnání s kontrolní skupinou myší ( $2.3 \pm 0.3$  vs.  $1.2 \pm 0.1$  mmol/l,  $p < 0.01$ ) (Graf 1).

**Graf 1: Hladiny plazmatického cholesterolu a TG u experimentálních myší (CHOW a ATV)**

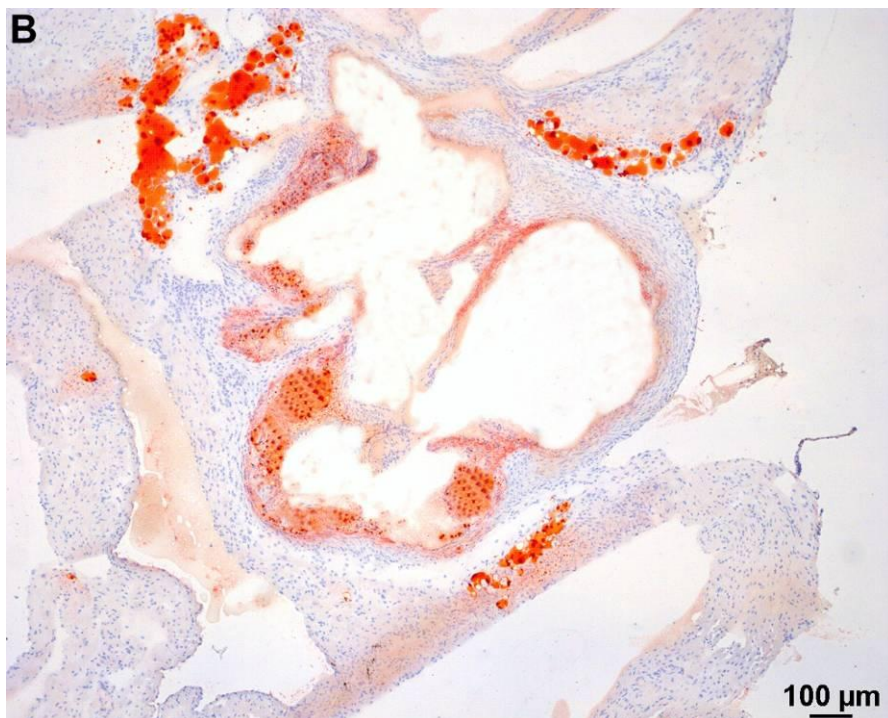
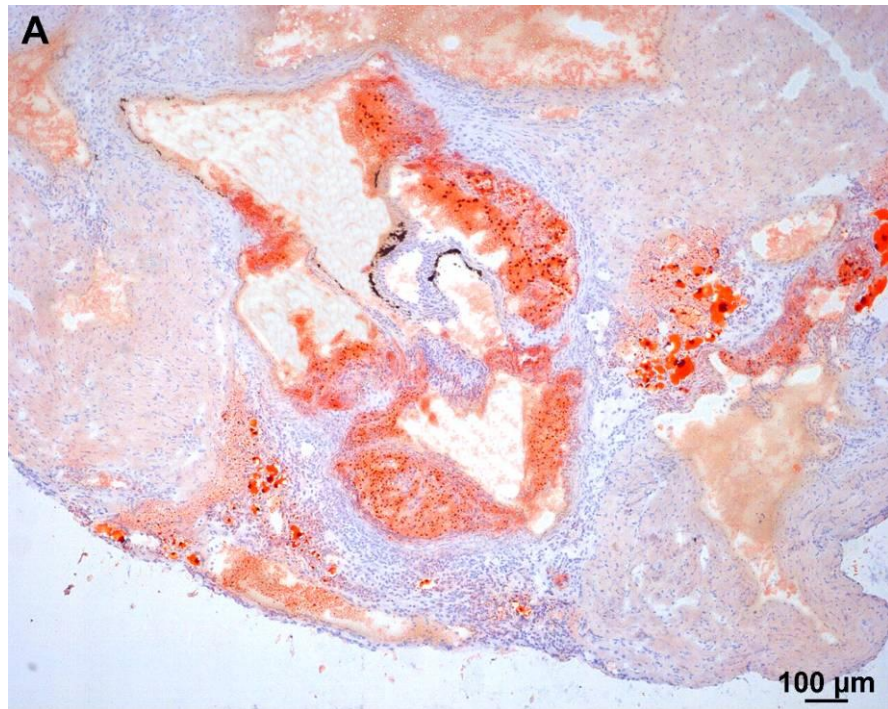
Léčba atorvastatinem zdatelně zvyšuje hladiny celkového a VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Hladiny LDL a HDL cholesterolu však zůstávají po léčbě atorvastatinem nezměněny. Léčba atorvastatinem snižuje hladiny TG, ve srovnání s kontrolní skupinou (\*\* $P < 0.01$ ).



## **9.2 HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ**

U všech řezů v kontrolní i atorvastatinové skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí (obr. 13). Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Aterosklerotické léze byly výrazně vyvinuty, přičemž u řady z nich byla již nalezena ateromová nekrotická jádra. Velikost aterosklerotických lézí v aortálním sinu je menší u myší léčených atorvastatinem (obr. B) v porovnání s kontrolní skupinou (obr. A).

**Obrázek 13: Reprezentativní obrázek plochy obarvené olejovou červení v aortálním sinu u ATV myši (obr. B) a kontrolní skupiny (obr. A). Léčba atorvastatinem zmenšila plochu barvení v porovnání s kontrolní skupinou. Řezy byly obarveny kontrastním barvivem hematoxylinem. Provedeno v měřítku 100  $\mu$ m.**



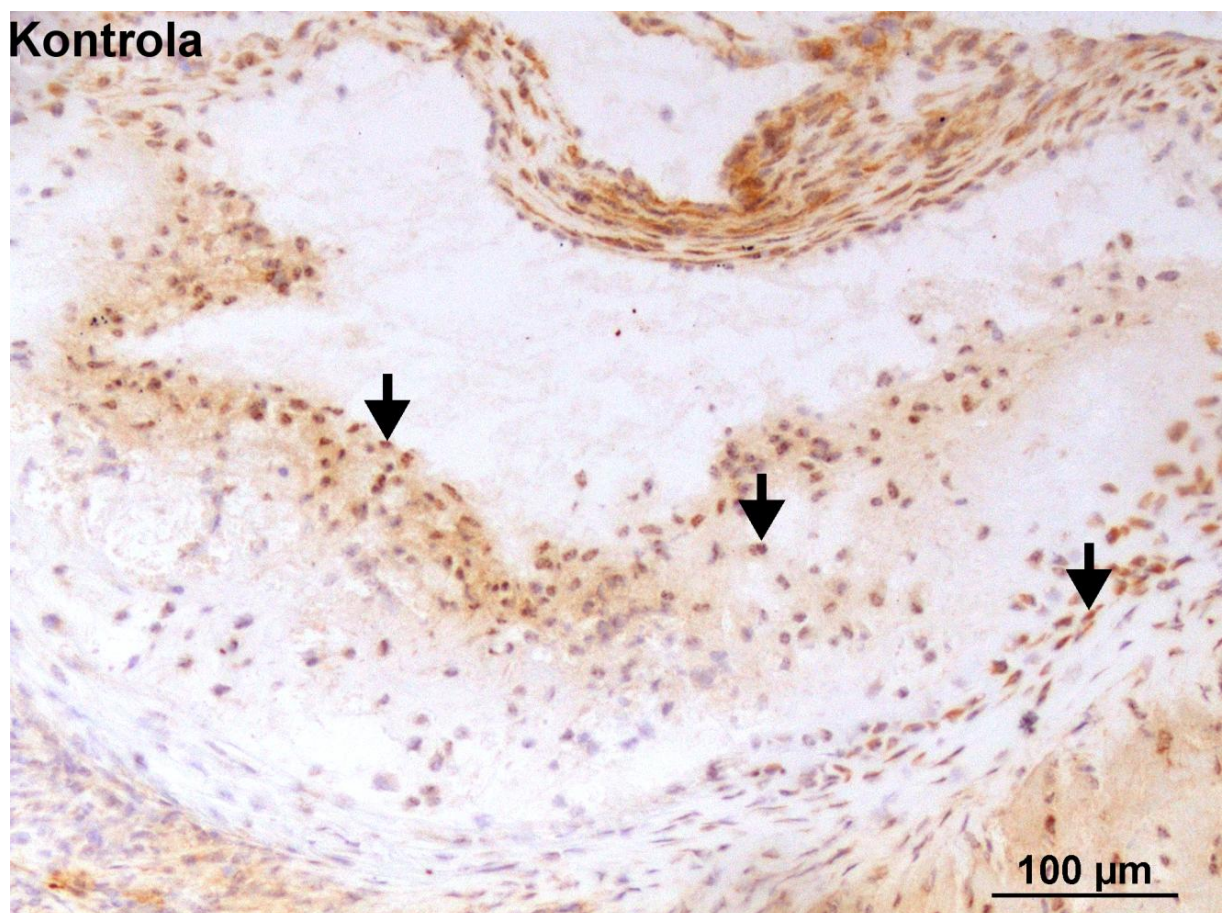
### 9.3 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ U MYŠÍ

Imunohistochemické barvení bylo provedeno v aortálním sinu všech myší. Zaměřili jsme se na expresi proteinu SMAD 3 v aterosklerotických lézích, v cévní medií a neporušeném endotelu aorty.

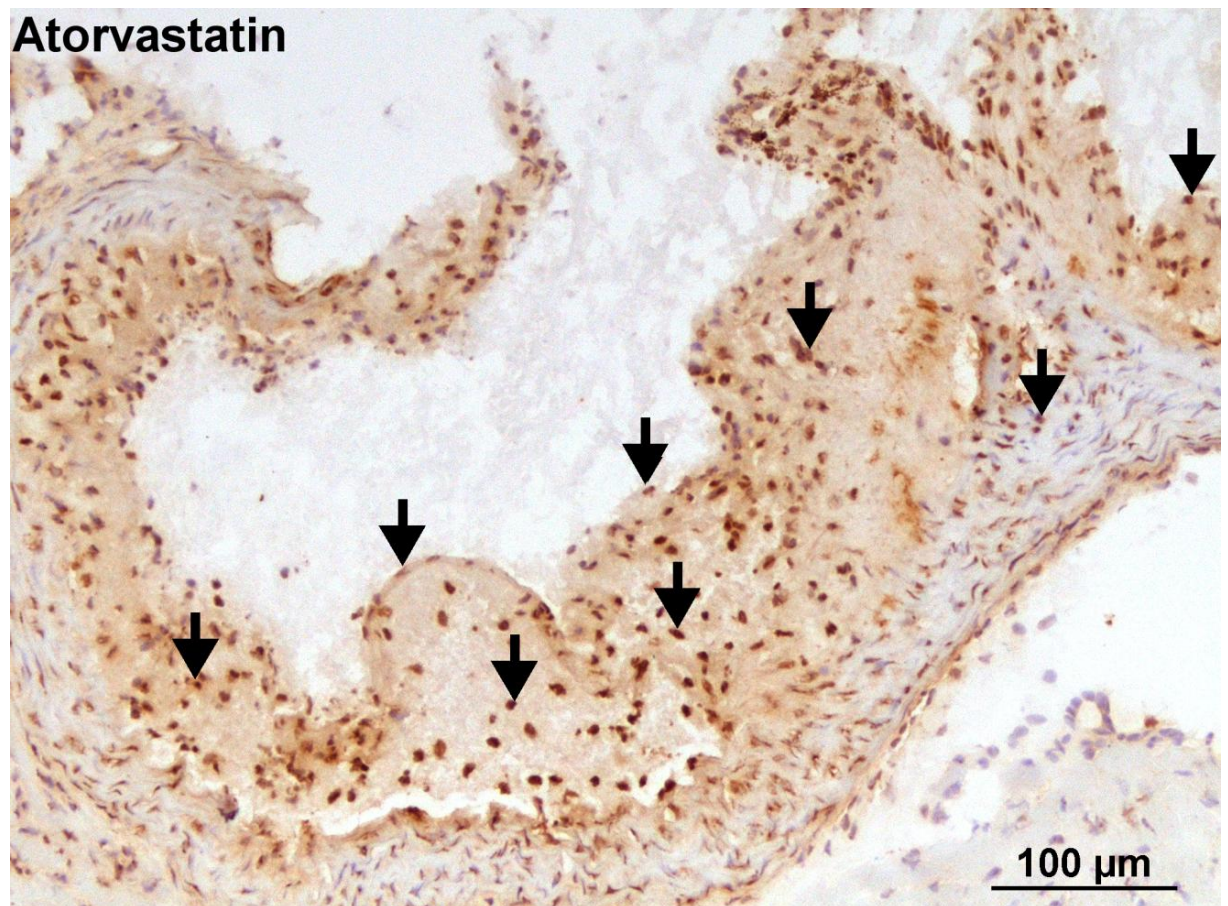
Fosforylované formy SMAD 3 proteinu byly prokázány v buněčných jádrech. Exprese SMAD 3 proteinu je viditelná v cévní adventicii a medii, v aterosklerotických plátech a v endotelu. Intenzita zabarvení SMAD 3 pozitivních jader byla silnější ve skupině léčené atorvastatinem v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 14).

**Obrázek 14: Reprezentativní obrázek exprese proteinu SMAD 3 u ATV myší v porovnání s kontrolní skupinou.** Šipky poukazují na pozitivitu SMAD 3 proteinu v buněčných jádrech. Exprese SMAD 3 proteinu je pozorovatelná v cévní adventitii a medii, v aterosklerotických plátech a také v endotelu. Intenzita zbarvení (SMAD 3 pozitivních jader) byla silnější u ATV myší léčených atorvastatinem v porovnání s kontrolní skupinou. Řezy byly obarveny kontrastním barvivem hematoxylinem. Zobrazeno v měřítku 100  $\mu\text{m}$ .

Obrázek 14A: Exprese SMAD 3 proteinu v kontrolní skupině



Obrázek 14B: Exprese SMAD 3 proteinu ve skupině léčené atorvastatinem





## 10. DISKUZE

Ateroskleróza je difúzní proces, který začíná v časném dětství, postupně asymptomaticky progreduje a v dospělosti se klinicky manifestuje jako ischemická choroba srdeční, ischemické poškození centrálního nervového systému a periferní cirkulace. V současné době je jasně potvrzována teorie ve které hraje hlavní roli v procesu aterogeneze zánětlivá reakce (80). Tuto zánětlivou reakci může zásadně ovlivňovat Transformující růstový faktor TGF- $\beta$ , který má mimo jiné významné protizánětlivé účinky (75).

Transformující růstový faktor je multifunkční cytokin, člen rodiny strukturálně podobných polypeptidů označované jako „transforming growth factor superfamily“, který se podílí na řadě regulačních činností souvisejících s proliferací, diferenciací, migrací a přežíváním různých buněk v lidském těle (76). TGF- $\beta$  působí prostřednictvím svých receptorů a tzv. SMAD proteinů. Finálním krokem signalizační kaskády TGF- $\beta$  je translokace aktivních komplexů SMAD do jádra, kde modulují expresi příslušných genů, většinou ve spolupráci s různými koaktivátory a korepresory (81).

Cílem této diplomové práce bylo popsat změny exprese fosforylované formy SMAD 3 v aterosklerotických plátech po podávání atorvastatinu u ApoE/LDLR-deficitních myší.

Léčba atorvastatinem v dávce 50mg/kg/den po dobu 8 týdnů měla za následek výrazné zvýšení hladin cholesterolu u myší léčených atorvastatinem. Tento hypercholesterolemický efekt byl již objasněn (77), přesto je v rozporu s předcházejícími studiemi, kde podávání atorvastatinu s „western typem diety“ vedlo k výraznému hypolipidemickému efektu (79). Tato data ukazují, že použitá dieta může dramaticky změnit vliv atorvastatinu na hladiny cholesterolu u ApoE/LDLR dvojitě deficitních myší. Tento biochemický efekt podněcuje snahu studovat tzv. pleiotropní účinky atorvastatinu v této studii.

V dalším kroku jsme se zaměřili na plochu aterosklerotického plátu v aortálním sinu. Navzdory hypercholesterolemickému efektu atorvastatinu se

plocha léze zmenšila, což podporuje vliv extralipidových účinků atorvastatinu (jak bylo již dříve uvedeno) (77).

Imunohistochemická analýza dále prokázala výrazně zvýšenou expresi fosforylované formy SMAD 3 v aterosklerotických plátech myší, kterým byl podáván atorvastatin. Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že SMAD 3 má výrazně inhibiční účinky na aktivitu T-lymfocytů, makrofágů, iNOS a MCP-1 (74) produkci lze usuzovat, že zvyšování exprese SMAD 3 po podávání statinů by mohlo přispívat k jejich protizánětlivým účinkům. Tato teorie obecně souvisí s aktivací signalizační kaskády endoglin/ALK-5/SMAD 2/SMAD 3, která se jeví jako potenciálně protektivní ve smyslu aterogeneze. Tyto výsledky však byly zatím pozorovány pouze u myší a jejich význam v lidské medicíně musí být teprve objasněn.

## 11. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zaměřila na sledování vlivu podávání atorvastatinu na expresi fosforylované formy SMAD 3 v aterosklerotických plátech u hypercholesterolemických ApoE/LDLR-deficitních myšič.

Podávání atorvastatinu v dávce 50mg/kg/den pro každé zvíře vedlo k signifikantnímu zvýšení hladin cholesterolu a VLDL cholesterolu.

Navzdory hypercholesterolemickému účinku atorvastatinu došlo také k poklesu velikosti aterosklerotických plátů.

Imunohistochemická analýza prokázala expresi SMAD 3 proteinu v celé stěně aorty včetně endotelu, plátu a cévní medie.

Podávání atorvastatinu dále vedlo ke zvýšení exprese SMAD 3 proteinu v porovnání s neléčenou skupinou.

Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že SMAD 3 má výrazné protizánětlivé účinky, lze usuzovat, že zvyšování exprese SMAD 3 po podávání statinů by mohlo přispívat k jejich protizánětlivým účinkům.

## 12. SEZNAM ZKRATEK

ALK 1	activin receptor-like kinase 1
ALK 5	activin receptor-like kinase 2
Apo B	apolipoprotein B
Apo E	apolipoprotein E
BMPs	kostní morfogenetické proteiny (bone morphogenetic proteins)
CMP	cévní mozková příhoda
COX	cyklooxygenáza
CRP	C-reaktivní protein
CYP P-450	cytochrom P-450
DM	diabete mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
eNOS	endoteliální NO syntáza
FGF	fibroblast growth factor
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)
HLA II	systém antigenů II třídy na makrofázích
HMG-CoA	hydroxymethylglutarylkoenzym A
ICAM-1	mezibuněčné adhezní molekuly (inter-cellular adhesion molecules)
IDL	lipoproteiny se střední hustotou (intermediate density lipoproteins)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
KV	kardiovaskulární
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
LDLR-KO	LDL-receptor deficitní myši
MCP 1	monocyte chemotactic protein-1
MS	metabolický syndrom
NO	oxid dusnatý

PDGF	od destiček odvozený růstový faktor (platelet derived growth factor)
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SMAD	protein regulující funkci TGF- $\beta$ , fungující jako transkripční faktor
TG	triacylglycerol
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TGF- $\beta$	růstový transformační faktor $\beta$
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRG- $\beta$ RI-III	receptory typu I-III pro TGF- $\beta$
TSP-1	thrombospondin 1
VCAM-1	cévní adhezní molekula-1 (vascular cell adhesion molekule-1)
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (very low density lipoproteins)
VSMCs	vascular smooth muscle cells

### 13. POUŽITÁ LITERATURA

1. Jiří Vlček, Daniela Fialová a kol., *Klinická farmacie I*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2010, [s. 73-133], ISBN: 978-80-247-3169-8.
2. J. Hradec a S. Býma, *Doporučené postupy pro praktické lékaře - ICHS*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009, [s. 1-2], ISBN: 978-80-86998-36-7.
3. Jiří Widimský, *Léčba dyslipidemií a ICHS*, 1. vydání, TRITON, 1998, s. 202, ISBN: 80-85875-70-5.
4. Martin Vokurka, Jan Hugo a kol., *Praktický slovník medicíny*, 6. vydání, Maxdorf, 2000, [s. 36,29,258,449], ISBN: 80-85912-38-4.
5. Richard Češka a kol., *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*, 1. vydání, TRITON, 2005, s.343, ISBN: 80-7254-738-0.
6. L. Carlos Junqueira, José Carneiro, Robert O. Kelley, *Základy histologie*, 1. vydání, FINIDR, 1997, [s. 204-218], ISBN: 80-85787-37-7.
7. Karel Dvořák, *Obecná a speciální histologie*, 1. vydání, Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, Brno, 1979, [s. 62-65], ISBN: 57-871-79
8. Tomáš Zima, Stanislav Štípek, Jozef Kollár, *Atherosklerosa 2008*, IV. interní klinika 1. LF UK Praha, 2008, [s. S1-S3], ISBN: 978-80-254-2834-4.
9. J. Mačák, J. Mačáková, *Patologie*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 171, 172], ISBN: 80-247-0785-3.

10. Zdravotnictví České republiky 2008 ve statistických údajích. Ústav zdravotnických informací a statistiky, Praha 2009 nebo [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz).
11. M. Anděl, P. Kraml, P. Dlouhý a kol., *Patogeneze aterosklerózy: od metabolických změn k chronickému zánětu s aspekty střádavého onemocnění*. Prakt. Lék. 1997; 77: 266-275.
12. Jiří Widimský, *Léčba dyslipidemií u pacientů s ICHS nebo jiným onemocněním aterosklerotické etiologie a u nemocných s diabeets mellitus*, 1. vydání, TRITON, 2002, s.190, ISBN: 80-7254-252-4.
13. Vojáček J. Malý M. a kol. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 33-43], ISBN: 80-247-0501-X.
14. *Walldius, G. et al.: The AMORIS Study, Lancet, 2001; 358: 2026–2033.*
15. *Yusuf, S. et al.: INTERHEART, Lancet 2004, 364: 937–952.*
16. V. Bláha, R. Češka, O. Herber, *Doporučené postupy pro praktické lékaře - Dyslipidemie*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009, [s. 4,5], ISBN: 978-80-86998-34-3.
17. J. Malík, J. Šimek, [www.kardiologickeforum.cz](http://www.kardiologickeforum.cz), (28.4.2011)
18. R. Fuster V. *The pathogenesis of atherosclerosis*, In eds Fuster V. Ross R. and Topol EJ. *Atherosclerosis and coronary heart disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1996. p. 441-460.

19. R. Rubin, D. S. Strayer et al., *Rubin's Pathology*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, [s. 73-114] ISBN: 978-07817-9516-6.
20. Harrison's et al., *Principles of internal medicine* – 4th. ed. Volume 1. International edition. 1998. ISBN 0-07-115268-7. p. 1345-1350.
21. Ignatowski AC. *Influence of animal food on the organism of rabbits*. S Peterb Izviest Imp Voyenno-Med. Akad 1908; 16: p. 154-173.
22. Drobnik J, Dabrowski R, Szczepanowska A, Giernat L, Lorenc J. *Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vasopressin - induced hypertension or hypercholesterolemia*. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 521-533.
23. Jawień J, Nastalek P, Korbut R. *Mouse models of experimental atherosclerosis*. *Journal of physiology and pharmacology* 2004, 55, 3, p. 503-517.
24. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. I. *Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions*. *Am J Pathol* 1981; 103: 181-190.
25. Paigen B, Morrow C, Brandon C et al. *Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice*. *Atherosclerosis* 1985; 57: 65-73.
26. Liao F, Andalibi A, deBeer FC et al. *Genetic control of inflammatory gene induction and NFkappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice*. *J Clin Invest* 1993; 91: 2572-2579.
27. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. *Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice*. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-240.



28. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. *Science* 1992; 258: 468-471.
29. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K *et al*. *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E - deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. *Cell* 1992; 71: 343-353.
30. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. *Atherosclerosis in mice lacking apoE. Evaluation of lesional development and progression*. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 141-147.
31. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus – mediated gene delivery*. *J Clin Invest* 1993; 92: 883-893.
32. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. *The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4431-4435.
33. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. *Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium - dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2333-2340
34. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R. *Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation*

*and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. FASEB J 1999; 13: 667-675.*

35. M. W. Feinberg, M. K. Jain, *Role of transforming growth factor-beta 1/Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis, PANMINERVA MED 2005;47:169-86, p. 169-186.*

36. Shi Y, Massague J. *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003;113:685-700.*

37. Mehra A, Wrana JL. *TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. Biochem Cell Biol 2002;80:605-22.*

38. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. *Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. J Cell Physiol 2001;187:265-76.*

39. Massague J, Wotton D. *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J 2000;19:1745-54.*

40. Metcalfe JC, Grainger DJ. *TGF-beta: implications for human vascular disease. J Hum Hypertens 1995;9:679.*

41. Grainger DJ. *Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:399-404.*

42. Mallat Z, Tedgui A. *The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. Curr Opin Lipidol 2002;13:523-9.*

43. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC *et al.* *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death.* Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:770-4.
44. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M *et al.* *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.* Nature 1992; 359:693-9.
45. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR *et al.* *The serum concentration of active transforming growth factor beta is severely depressed in advanced atherosclerosis.* Nat Med 1995; 1:74-9.
46. Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC, Bottinger EP. *Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions.* J Cell Sci 2000;113 (Pt 13):2355-61.
47. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. *Smad regulation in TGFbeta signal transduction.* J Cell Sci 2001;114:4359-69.
48. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. *Making sense of latent TGFbeta activation.* J Cell Sci 2003;116:217-24.
49. Dennler S, Huet S, Gauthier JM. *A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3.* Oncogene 1999;18:1643-8.
50. Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P *et al.* *Transforming growth factor-b1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3.* J Biol Chem 2000;275:36653-58.

51. Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T *et al.* *Transforming growth factor-beta 1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3.* J Biol Chem 2004;279:16388-93.
52. Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. *Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site.* Biochem J 2004;381:413-22.
53. Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. *Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction.* Mol Cell Biol 1999;19:2495-504.
54. Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H *et al.* *Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta.* EMBO J 1999;18:1280-91.
55. McKarns SC, Schwartz RH. *Distinct effects of TGF-beta1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3.* J Immunol 2005;174:2071-83.
56. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y *et al.* *Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner.* Am J Physiol 1991;260:H1713-7.
57. Roth M, Nauck M, Tamm M, Perruchoud AP, Ziesche R, Block LH. *Intracellular interleukin 6 mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation of nontransformed cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:1312-6.

58. Heinz Lullmann, Klaus Mohr, Martin Wehling, *Farmakologie a toxokologie*, 2. vydání, Grada Publishing, a.s., 2004, [s. 240-242], ISBN: 80-247-0836-1
59. 2. Evans M, Rees A. *The myotoxicity of statins*. *Curr Opin Lipidol*. 2002; 13: 415–420.
60. Sica DA, Gehr TW. *3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and rhabdomyolysis: considerations in the renal failure patient*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002; 11: 123–133.
61. Michaela Hájková, Bohumil Kratochvíl, Stanislav Rádl, [www.chemicke-listy.cz](http://www.chemicke-listy.cz), (1.5.2011)
62. Zoltán Paluch, Zlata Heřmánková, [www.internimedcina.cz](http://www.internimedcina.cz), (1.5.2011)
63. Tousolis D, Antoniades Ch, Stefanidis CH. *Statins ameliorate atherosclerosis induced by inhibition of nitric oxide synthase: another novel vascular protective mechanism?* *Int J Cardiol*. 2008; 123: 91–93.
64. Kirmizis D, Chatzidimitriou D. *Pleiotropic vasoprotective effects of statins: The chicken or the egg?* *Drug Des Dev and Ther*. 2009; 3: 191–204.
65. Usui H, Shikata K et al. *HMG-CoA reductase inhibitor ameliorates diabetic nephropathy by its pleiotropic effects in rats*. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18: p. 265-272.
66. Kureishi Y, Luo Z et al. *The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals*. *Nat. Med*. 2000;6:p. 1004-1010.

67. <http://nts.prolekare.cz> (2.5.2011)
68. Ravingerová T, Adameová A, Kelly T, et al. *Changes in PPAR gene expression and myocardial tolerance to ischaemia: relevance to pleiotropic effects of statins*. Can. J Physiol Pharmacol. 2009; 87(12): 1028–1036.
69. Liao JK. *Beyond lipid lowering: The role of statins in vascular protection*. Int J Cardiol 2002;86: p. 5-18.
70. Karatzis K, Lekakis J, Papamichael C, et al. *Rapid effect of pravastatin on endothelial function and lipid peroxidation in unstable angina*. Int J Cardiol. 2005; 101: 65–70.
71. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, et al. *HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species*. Hypertension 2001; 37: 1450–1457.
72. CJ Vaughan, MB Murphy, BM Buckley. *Statins do more than just lower cholesterol*. Lancet 1996; 348:1079-82.
73. Češka R, Urbánek K. *Atorvastatinum*. *Remedia* 2004;2: s. 110-120.
74. Feinberg M.W. and Jain M.K. (2005) *Role of transforming growth factor-beta1/Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis*. Panminerva Med 47, 169-186.
75. Goumans M.J., Liu Z. and ten Dijke P. (2009) *TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction*. Cell Res 19, 116-127.

76. Chen B., Peng X., Pentassuglia L., Lim C.C. and Sawyer D.B. (2007) *Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity*. Cardiovasc Toxicol 7, 114-121.
77. Choudhury R.P., Carrelli A.L., Stern J.D., Chereshev I., Soccio R., Elmalem V.I., Fallon J.T., Fisher E.A. and Reis E.D. (2004) *Effects of simvastatin on plasma lipoproteins and response to arterial injury in wild-type and apolipoprotein-E-deficient mice*. J Vasc Res 41, 75-83.
78. Mallat Z. and Tedgui A. (2002) The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. Curr Opin Lipidol 13, 523-529.
79. Nachtigal P., Pospisilova N., Vecerova L., Micuda S., Brcakova E., Pospechova K. and Semecky V. (2009) *Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice*. J Atheroscler Thromb 16, 265-274.
80. Ross R. (1999) *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med 340, 115-126.
81. Saura M., Zaragoza C., Cao W., Bao C., Rodriguez-Puyol M., Rodriguez-Puyol D. and Lowenstein C.J. (2002) *Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression*. Circ Res 91, 806-813.
82. Lubor Golán, [www.solen.cz](http://www.solen.cz), (2.5.2011)