

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA ŠTAMPAR

**PRIMERJAVA UČINKOV ATEROGENE DIETE NA NASTANEK
SPREMEMB V SRČNO-ŽILNIH TKIVIH BUDRE POD VPLIVOM
DELOVANJA ATORVASTATINA IN VALSARTANA**

**EFFECTS OF ATORVASTATIN AND VALSARTAN ON
CARDIOVASCULAR TISSUES OF GUINEA PIG FED WITH
ATHEROGENIC DIET**

Diplomska naloga

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol..

Zahvale

Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. za mentorstvo pri nalogi ter za vzpodbudne in tehtne pripombe ob nastajanju tega dela.

Zahvaljujem se dr. Gorazdu Drevenšku, ki mi je omogočil raziskovalno delo v laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, za nasvete in podporo med mojim raziskovalnim delom.

Zahvaljujem se prof. dr. Danielu Petroviču, dr. med. z Inštituta za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete v Ljubljani za pomoč pri histološki obdelavi vzorcev in analizi rezultatov. Poloni Sajovic, univ. dipl. ing., se zahvaljujem za pomoč pri pripravi histoloških preparatov.

Zahvaljujem se Lovru Žiberni, mag. farm. in Mojci Lunder, dr. med., mladima raziskovalcema na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, za sodelovanje pri raziskovalnem delu in nasvete ob nastajanju tega dela.

Petri Ponebšek se zahvaljujem za tehnično pomoč pri delu.

Zahvaljujem se tudi svoji družini, Petru in prijateljem za moralno vzpodbudo, podporo, potrpljenje ter lepe trenutke v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. zn. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol..

Peta Štampar

VSEBINA

VSEBINA	III
POVZETEK.....	V
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 Normalna zgradba žilne stene	2
1.2 Vloga endotelijskih celic pri vzdrževanju žilne homeostaze	3
1.3 Adrenergični in muskarinski receptorji v žilni steni	4
1.4 Endotelijkska disfunkcija	5
1.5 Ateroskleroza	6
1.5.1 Dejavniki tveganja	6
1.5.2 Koncept aterogeneze	6
1.5.3 Zapleti	8
1.5.4 Ateroskleroza aorte	8
1.5.5 Ateroskleroza zunajlobanjskih možganskih arterij	9
1.5.6 Zdravljenje	9
1.6 Statini	10
1.6.1 Atorvastatin	10
1.6.2 Pleiotropni učinki statinov	11
1.7 Sartani	12
1.7.1 Valsartan	12
1.7.2 Pleiotropni učinki sartanov	13
1.8 Budre ali morski prašički (<i>Cavia porcellus</i>) kot potencialni model za študijo ateroskleroze	14
1.8.1 Presnova holesterola in lipoproteinov	15
1.8.2 Model za aterosklerozo in vnetje	16
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 Uporabljeni reagenti in raztopine	20
3.2 Poskusne živali	23
3.3 Sestava aterogene diete	23
3.4 Odmerki učinkovin	25
3.5 Krmljenje	25
3.6 Žrtvovanje	26
3.7 Poskusi na izoliranih žilah	27
3.7.1 Naprava za poskuse na izoliranih žilah	27
3.7.2 Protokol poskusov	28
3.7.3 Obdelava podatkov	29
3.8 Morfometrija	30
3.9 Histološki preparati	31

4 REZULTATI.....	33
4.1 Tehtanje živali.....	33
4.2 Poskusi na izoliranih žilah	33
4.2.1 Vpliv acetilholina na sprostitev žilnih obročkov predhodno skrčenih s FE	33
4.2.2 Vpliv fenilefrina na skrčitev žilnih obročkov.....	35
4.3 Morfometrija.....	36
4.4 Histološki preparati	40
4.4.1 Osnovna prehrana.....	40
4.4.2 Aterogena dieta	41
4.4.3 Aterogena dieta in atorvastatin.....	42
4.4.4 Aterogena dieta in valsartan.....	43
4.4.5 Aterogena dieta, atorvastatin in valsartan	43
5 RAZPRAVA.....	44
5.1 Razpravljanje o metodah.....	44
5.1.1 Uporabljene snovi in učinkovine.....	44
5.1.2 Poskusne živali	45
5.2 Razpravljanje o rezultatih	47
5.2.1 Poskusi na izoliranih žilah.....	47
5.2.2 Morfometrija	49
5.2.3 Histološki preparati	50
5.3 Ugotovitve	53
6 SKLEP	54
7 LITERATURA	56

POVZETEK

Izhodišče: Ustrezni živalski modeli, ki omogočajo preučevanje vpliva različne prehrane in zdravilnih učinkovin na metabolne procese ter presnovo, so bistvenega pomena za razumevanje mehanizmov aterogeneze. Tem kriterijem med drugimi ustrezajo budre (*Cavia porcellus*), ki imajo po navedbah novejših raziskav sestavo lipoproteinov in holesterola zelo podobno človeku. S prehrano so jim v večini raziskav uspešno inducirali aterogenezo, saj so se pojavile funkcionalne in morfološke spremembe žilja. Sklepali smo, da bi se aterosklerotične spremembe zmanjšale, če bi hrani dodajali statine, ki delujejo kot kompetitivni zaviralci HMG-CoA reduktaze in s tem zmanjšajo sintezo holesterola, ter sartane, ki so antagonisti angiotenzina II in preprečujejo njegovo vezavo na AT₁ receptor, kar zniža krvni tlak. Zmajajo tudi izražaje LOX-1 receptorjev, ki so odgovorni za prenos oksidiranega LDL v steno žil.

Namen: Namen raziskave je ugotoviti, ali so budre primeren živalski model za induciranje aterogeneze in preučevanje sprememb na srčno-žilnem sistemu. Preučiti želimo, ali dodatek subterapevtskih odmerkov atorvastatina in valsartana vpliva na zmanjšanje morfoloških in funkcionalnih sprememb ob aterogeni dieti ter ali ima kombinacija obeh učinkovin močnejše antiaterogeno delovanje.

Metode: Budre smo razdelili v pet skupin (osnovna prehrana, aterogena dieta, aterogena dieta z atorvastatinom, aterogena dieta z valsartaom in aterogena dieta z atorvastatinom ter valsartanom), jih krmili 11 tednov in nato preučevali žilno funkcijo. Obročkom torakalne aorte smo merili odzivnost s pomočjo izometričnega mehansko-električnega pretvornika. Najprej smo izzvali skrčitev z 0,01 mM fenilefrina, nato pa s kumulativnim dodajanjem acetilholina opazovali sproščanje. Izvedli smo poskuse krčenja žilnih obročkov s kumulativnim dodajanjem fenilefrina. Abdominalne aorte boder smo vzdolžno prerezali ter žilni lumen barvali z raztopino Oil red O, da smo ugotovili prisotnost maščobnih leh. Pod svetlobnim mikroskopom smo opazovali aterosklerotične spremembe na histoloških preparatih karotidnih arterij in razcepiščih aortnega loka.

Rezultati: Primerjava odzivov žilnih obročkov na acetilholin z uporabo enofaktorske analize variance je pokazala, da se vseh pet preiskovanih skupin med seboj statistično značilno razlikuje ($p=0.0074$). Pri primerjavi rezultatov z uporabo Bonferronijevega post-hoc testa ni prišlo do značilnih razlik ($p>0,05$), razen med skupinama aterogena dieta in aterogena dieta z atorvastatinom ($p<0,01$). Primerjava odzivov žilnih obročkov na fenilefrin z uporabo enofaktorske analize variance ni pokazala značilnih razlik ($p=0,9246$). Pri primerjavi površin leh glede na površino lumna aorte so se pokazale razlike med aterogeno dieto in ostalimi skupinami (6,0%; 0,3%; 0,9%; 0,8%). Pri histološkem pregledu se je največ sprememb pojavilo pri skupini z aterogeno dieto. Večina živali je imela blage aterosklerotične spremembe na aorti, ki so se kazale kot zadebelitev intime.

Zaključki: Z raziskavo nam je uspelo potrditi, da so budre primeren model za indukcijo aterogeneze in preučevanje morfoloških ter funkcionalnih sprememb na srčno-žilnem sistemu, saj se je spremenil odziv žilnih obročkov, pojavile so se maščobne lehe in blage aterosklerotične spremembe. Dokazali smo, da subterapevtske koncentracije atorvastatina in valsartana ohranijo žilno funkcijo ob aterogeni dieti. Nismo pa potrdili hipoteze, da ima kombinacija učinkovin močnejše antiaterogeno delovanje kot posamične učinkovine, saj smo dobili podobne rezultate ob uporabi obeh ali pa smo ene učinkovine.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

AC	adenilatna ciklaza
ACAT	acil-CoA-holesterol-aciltransferaza
ACE	angiotenzinska konvertaza
Ach	acetylholin
AD	aterogena dieta
ApoB	apolipoprotein B
ApoB/E	apolipoprotein B/E
[Ca ²⁺] _i	znotrajcelična koncentracija kalcijevih ionov
Ca ²⁺ kanali	kalcijevi kanali
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
CETP	holesteril-ester prenosni protein
CRP	C-reaktivni protein
DAG	diacil glicerol
EDCF	krčitveni dejavnik endotelijskega izvora (angl. <i>Endothelium-Derived Contracting Factor</i>)
EDHF	hiperpolarizacijski dejavnik endotelijskega izvora (angl. <i>Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor</i>)
EDRF	sprostitveni dejavnik endotelijskega izvora (angl. <i>Endothelium-Derived Relaxing Factors</i>)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
eNOS	endotelijska konstitutivna NO sintaza
FE	fenelefrin
GMC	gladkomišične celice
HDL	lipoprotein visoke gostote
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A
IFN-γ	interferon-γ
IL-6	interlevkin 6
IP ₃	inozitol-3-fosfat
KO	knock-out miši (imajo izbit gen za apo B receptor)
LCAT	lecitin-holesterol-acil-transferaza
LDL	lipoprotein nizke gostote

LOX-1 receptor	lektinu podoben receptor, na katerega se vežejo oksidirani lipoproteini majhne gostote (angl. <i>Lectin-like oxidized LDL receptor-I</i>)
LPL	lipoprotein lipaza
MCP-1	monocitni kemoatraktantni protein-1
M-CSF	makrofagni kolonijo stimulirajoči dejavnik
NO	dušikov oksid
NOS	NO sintaza
oxLDL	oksidirani lipoproteini majhne gostote
PG	prostaglandin
PIP ₂	fosfatidil inozitol difosfat
PKA	proteinska kinaza A
PLC	fosfolipaza C
Povp.	povprečje
raztopina KH	Krebs-Henseleit puferska raztopina
SD	standardna deviacija
SEM	standardna napaka ocen aritmetičnih sredin
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze
trang	transgene miši
T _{tal}	temperatura tališča
VLDL	lipoprotein zelo nizke gostote

1 UVOD

Srce in ožilje omogočata preskrbo telesnih tkiv in organov s kisikom in hranili ter iz njih odstranjujeta presnovne produkte, ki se nato izločajo preko pljuč, ledvic in jeter. S tem vzdržuje primerno notranje okolje celic, ki je nujno za njihovo preživetje ter delovanje v organizmu. Vsako odstopanje od fiziološkega delovanja predstavlja nevarnost za preživetje organizma, zato je delovanje srčno-žilnega sistema zelo natančno uravnavno. Pri tem imajo poleg srca in krvi pomembno vlogo žile, ki pod nadzorom endotelijskih celic sproščajo različne snovi in uravnavajo žilni tonus skladno s potrebami organizma.

V zadnjem času še vedno raste število žilnih obolenj, ki so v večini posledica endotelijске poškodbe oz. disfunkcije koronarne arterije. Najpogosteji vzrok obolevanja in posledično umrljivosti v razvitem svetu predstavlja bolezenski procesi, povezani z aterosklerozo. Žilno bolezen so dolgo povezovali zgolj z nalaganjem lipidov na stene arterij. V današnjem času pa vemo, da imajo vlogo pri nastanku in poteku te bolezni tudi vnetni in drugi procesi.

Mnogi raziskovalci so si prizadevali odkriti spojine, ki bi učinkovito zniževale raven lipidov v krvi, predvsem holesterola, ki predstavlja poglavitni vzrok za razvoj ateroskleroze. V začetku 70. let prejšnjega stoletja so iz plesni vrste *Penicillium citrinum* izolirali njen metabolit, mevastatin (1). Z dodatnimi raziskavami so ugotovili, da omenjena spojina zavira ključni encim v biosintezi holesterola in s tem zmanjša njegovo nastajanje. V naslednjih letih je bilo odkritih ali umetno sintetiziranih več deset statinov, ki so danes najpogosteje predpisana skupina zdravil (2). V nadaljnjih raziskavah se je izkazalo, da predstavlja tudi učinkovito zdravilo pri nekaterih bolezenskih stanjih, ki niso povezana s povišano koncentracijo lipidov v krvi (3). Ta ugotovitev in dejstvo, da na potek ateroskleroze močno vpliva vnetje, sta sprožila razmišljanje o protivnetnem delovanju statinov (2).

Za uspešno preizkušanje delovanja učinkov in razumevanje mehanizmov aterogeneze pa so potrebni tudi primerni živalski modeli, ki omogočajo preučevanje vpliva vrste hrane, načina prehranjevanja, delovanja zdravilnih učinkov na presnovo ter so glede na metabolne procese in presnovo lipoproteinov ter holesterola čim bolj podobni človeku. V

dosedanjem razvoju statinov so večinoma uporabljali model gensko spremenjenih miši (apo B), ki zaradi neprimerljivega prenosa lipidov še vedno ne ustreza želenim kriterijem. Po navedbah novejših raziskav pa je lipoproteinski profil budre (*Cavia porcellus*) zelo podoben človeškemu, zato smo se v pričajoči raziskavi odločili, da budram z aterogeno prehrano induciramo morfološke in funkcionalne spremembe na žilah ter preučimo delovanje atorvastatina v primerjavi z valsartanom. Te snovi naj bi tudi v subterapevtskih odmerkih zaščitno delovale na srčno-žilni sistem.

1.1 Normalna zgradba žilne stene

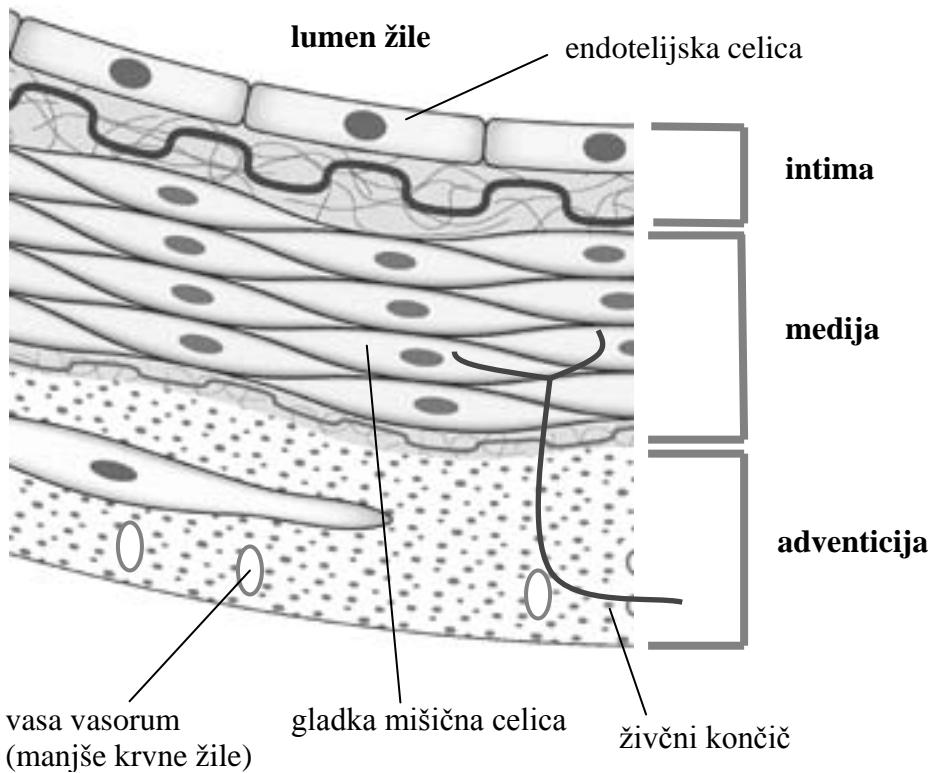
Ožilje sestavlja arterije elastičnega tipa, arterije mišičnega tipa, arteriole, kapilare, venule in vene, ki se med seboj razlikujejo v zgradbi žilne stene. Glavne razlike med njimi so v sestavi medije. Pri arteriolah je delež gladkih mišičnih celic največji, pri arterijah mišičnega tipa nekoliko manjši, medtem ko je pri arterijah elastičnega tipa medija večinoma prepletena z elastičnimi vlakni. Arterije elastičnega tipa (npr. aorta) so prevodne arterije, ki hkrati blažijo velika nihanja v pretoku. Arterije mišičnega tipa, kamor sodijo karotidne arterije, uravnavajo pretok glede na potrebe organa, ki ga oskrbujejo. Razlike v zgradbi med posameznimi tipi žil vplivajo na hemodinamske lastnosti žile in na učinkovanje vazoaktivnih snovi (4).

Žilno steno sestavlja v smeri od lumna proti zunanjosti žile tri plasti (Slika 1):

Intima je razmeroma tanka plast in predstavlja notranji sloj žilne stene. Sestavljena je iz enojne plasti z glikokaliksom prekritih endotelijskih celic in iz bazalne lamine. Endotelijске celice tvorijo hemodinamsko bariero med krvjo in notranjim delom žile. Vsebujejo številne receptorje za snovi, ki vplivajo na tonus žile in aktivno izločajo vazoaktivne snovi. Prehranjujejo se z difuzijo iz krvi v lumnu žile (4).

Medijo gradijo koncentrični sloji gladkih mišičnih vlaken, med katera se vrivajo elastična, kolagenska in retikularna vlakna, proteoglikani ter glikoproteini (4). Gladke mišične celice vzdržujejo tonus žil, ki se spreminja glede na lokalno koncentracijo vazoaktivnih snovi, aktivnost simpatičnih živčnih končičev, izločajo pa tudi citokine in ostale rastne regulatorne faktorje (4, 5). Imajo sposobnost sinteze in izločanja kolagena, elastina in proteoglikanov (6).

Adventicija je zunanjja plast žilne stene. Sestavljajo jo elastična in kolagenska vlakna ter živčni končiči avtonomnega živčnega sistema (Nervi vasorum). Pri večjih žilah v adventiciji poteka tudi kapilarna mreža (vasa vasorum) za difuzijo kisika in hranilnih snovi zunanje ter srednje plasti žilne stene (7).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe arterijske žilne stene. Prirejeno po (8).

1.2 Vloga endotelijskih celic pri vzdrževanju žilne homeostaze

Endotelij ni samo pasivna bariera med plazmo in ekstracelularno tekočino, temveč predstavlja tudi vir številnih potencialnih kemijskih posrednikov. Endotelij ima aktivno vlogo pri vzdrževanju homeostaze, uravnava upornost žil in s tem vpliva na krvni tlak ter pretok skozi tkiva. Aktivno se odziva na hemodinamske (npr. strižne sile) in humoralne spremembe (npr. spremembe v parcialnem tlaku O₂ in v pH) s sproščanjem vazoaktivnih snovi, ki povzročajo krčenje ali sprostitev gladkih mišic ter s tem modulira tonus gladkih mišičnih celic.

Snovi, ki jih izločajo endotelijalne celice in povzročajo krčenje gladkih mišičnih celic so endotelini, tromboksan A₂, angiotenzin II, superoksidni anion ($O_2^{\bullet^-}$), nekateri izoprostani, vmesni produkti sinteze prostaglandinov (PGG₂ in PGH₂) in krčitveni dejavnik endotelijalnega izvora (EDCF – Endothelium Derived Contracting Factor) (9, 10). Snovi, ki jih izločajo endotelijalne celice in omogočajo sprostitev gladkih mišičnih celic pa so NO (dušikov oksid, pred odkritjem poimenovan kot sprostivni dejavnik endotelijalnega izvora oz. EDRF - Endothelium Derived Relaxing Factor), PGI₂ (prostaciklin), PGE₂, C-natriuretični peptid, adrenomedulin in skupina še neznanih snovi, ki jih označujemo s skupnim imenom hiperpolarizacijski dejavniki endotelijalnega izvora (EDHFs – Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors) (9, 11, 12).

Ravnotežje med temi snovmi omogoča žilno homeostazo (13) in v fizioloških razmerah preprečuje aterosklerozo. Porušenje žilne homeostaze pripomore k povečanemu krčenju žil, zlepjanju (adherenci) levkocitov, aktivaciji trombocitov, mitogenezi gladkih mišičnih celic, peroksidaciji elementov žilne stene, trombozi, vnetju in remodeliranju krvnih žil, kar lahko vodi v nastanek ateroskleroze (14).

1.3 Adrenergični in muskarinski receptorji v žilni steni

Na površini endotelija in gladkih mišičnih celic se nahajajo α_1 , α_2 , β_1 in β_2 adrenoreceptorji ter muskarinski receptorji M₃. Pomembni so za mehanizme krčenja oz. vzdrževanja žilnega tonusa.

Adrenergični receptorji prenesejo signal preko posebnega G-proteina z receptorja na efektor. Stimulacija adrenergičnih receptorjev α na gladkih mišičnih celicah vodi do aktivacije fosfolipaze C (PLC), ki cepi fosfatidilinozitol difosfat (PIP₂). Tako pride do nastanka inozitol-3-fosfata (IP₃) ter diacil glicerola (DAG) in s tem povišanja intracelularne koncentracije kalcija [Ca²⁺]_i, kar vodi do skrčitve gladke mišične celice. Stimulacija adrenergičnih receptorjev β aktivira adenilatno ciklazo (AC), ki poveča količino cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) znotraj celice in preko aktivacije proteinske kinaze A (PKA) privede do relaksacije žile (15). Na podoben način povzroči aktivacija adrenergičnih receptorjev α na površini endotelija povišanje intracelularne koncentracije kalcija [Ca²⁺]_i znotraj endotelijalne celice. Ca²⁺ poveča aktivnost NO sintaze

(NOS), kar privede do sprostiteve gladke mišične celice. Aktivacija adrenergičnih receptorjev β poveča aktivnost adenilat ciklaze (AC) in zviša ciklični adenozin monofosfat (cAMP) znotraj endotelijskih celic. cAMP aktivira proteinsko kinazo A (PKA), ki fosforilira specifične regije na endotelijski konstitutivni NO sintazi (eNOS) in s tem poveča občutljivost encima za Ca^{2+} (9).

V žilni steni se nahajajo tudi muskarinski receptorji M_3 . Prav tako so povezani z efektorji preko posebnih G proteinov. Ob vezavi na endotelijsko celico efektor fosfolipaza C (PLC) poveča stimulacijo inozitol-3-fosfata (IP_3), kar privede do povišane koncentracije intracelularnega kalcija $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ki aktivira endotelijsko konstitutivno NO sintazo (eNOS) in poveča sproščanje vazodilatatorja dušikovega oksida (NO). Hkrati pa poteka vezava tudi na muskarinske receptorje na gladkih mišičnih celicah, kjer vezava povzroči krčenje mišičnih celic zaradi povečanja prostega intracelularnega kalcija $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (16).

1.4 Endotelijkska disfunkcija

Odkrivanje funkcijskih motenj v delovanju endotelija sodi med najzgodnejše zaznavne spremembe, ki jih je možno meriti in tako spremljati potek aterogeneze. *In vivo* lahko merimo razširitev žile s pomočjo ultrazvočnega aparata ali določamo krvne sestavine, ki kažejo na okvaro endotelija. *In vitro* lahko preizkušamo relaksacijo in krčenje izoliranih žil (17).

Endotelijkska disfunkcija predstavlja motnjo v delovanju endotelija, za katero je značilno porušeno ravnotesje med vazodilatacijskim in vazokonstriktornim delovanjem (17). Nesposobnost razširitve žile in povečanja pretoka v njej po fizioloških ali farmakoloških dražljajih je verjetno najzgodnejša motnja v delovanju endotelijskih celic, ki imajo aktivno vlogo pri uravnavanju tonusa žilne stene, pretoku krvi in funkciji trombocitov (18). Pri določenih (pato)fizioloških stanjih, kot so ateroskleroza, kajenje, hipertenzija, sladkorna bolezen in hiperlipidemija se zmanjša izločanje NO ter poveča tvorba vazokonstriktornih snovi (19).

1.5 Ateroskleroza

Ateroskleroza je kronična napredujoča bolezen arterij, ki predstavlja vodilni vzrok umrljivosti v razvitem svetu, tudi v Sloveniji. Zanjo je značilno nalaganje lipidov in fibroznih elementov v obliki aterosklerotičnih leh predvsem v velikih in srednje velikih elastičnih in mišičnih arterijah. S svojo velikostjo lahko otežujejo tok krvi skozi arterijo, vendar je najpomembnejši klinični zaplet nastanek krvnih strdkov na poškodovanih lehah (21).

1.5.1 Dejavniki tveganja

Dejavnike tveganja za nastanek ateroskleroze razdelimo po načinu delovanja in možnosti vplivanja nanje v tri skupine:

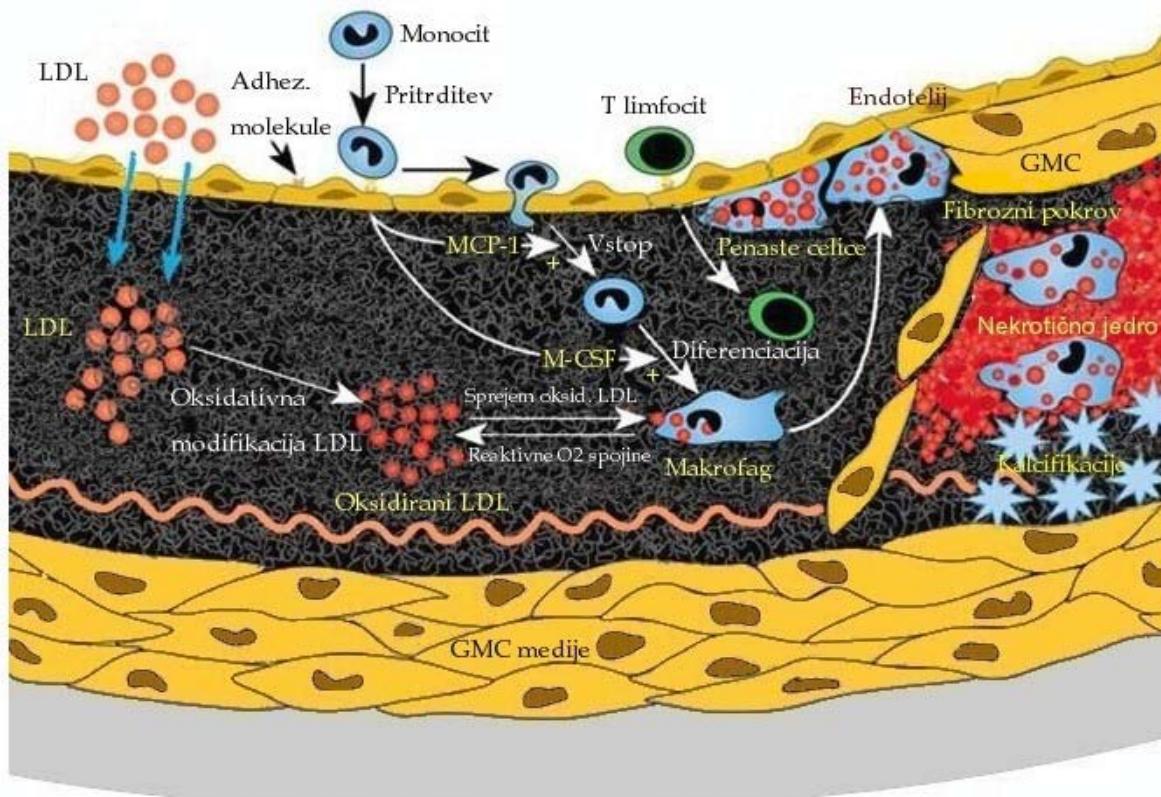
- življenski slog in družbeni vplivi (te dejavnike odpravimo s spremembo življenskih navad): kajenje, nezdravo prehranjevanje in povečan indeks telesne mase, telesna neaktivnost, stres,
- biološki vplivi ali dednost (na te dejavnike ne moremo vplivati): spol, starost, družinska podvrženost,
- bolezemska stanja: dislipidemija, zvišan krvni tlak, slatkorna bolezen, okužba (21).

Eden glavnih dejavnikov tveganja za nastanek ateroskleroze je visoka koncentracija holesterola v plazmi vezanega na LDL (holesterol LDL). Iz tega razloga je dolgo veljalo, da je v proces aterogeneze, ki vodi do nastanka aterosklerotičnih leh, v glavnem vključeno nalaganje lipidov na stene arterij. Po ugotovitvah novejših raziskav pa aterosklerozo uvrščamo med vnetne bolezni, saj se v njenem poteku prepletajo mehanizmi prirojene in pridobljene imunosti, ki sodelujejo v vnetnih reakcijah (20).

1.5.2 Koncept aterogeneze

Raziskave na živalskih modelih, poskusi na celičnih kulturah in preiskave vzorcev človeških tkiv podpirajo mnenje, da začetek ateroskleroze predstavlja odziv imunskega sistema na nalaganje in modifikacijo lipoproteinov v steni arterij (20). Pri visoki koncentraciji LDL v plazmi je tudi kopiranje le-tega v intimi hitrejše. Tam se LDL modificira, najpogosteje pride do oksidacije s pomočjo reaktivnih dušikovih in kisikovih

spojin. Oksidiran LDL spodbudi endotelijske celice, da začnejo na svoji površini prekomerno izražati adhezijske molekule in izločati monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1). To omogoči vezavo monocitov in limfocitov na endotelijske celice (22). Pritrditvi sledi povečano izločanje kemokinov v intimi, kar spodbudi celice k prehajjanju preko stikov med endoteljnimi celicami v subendotelni prostor (21).



Slika 2: Shematski prikaz procesa aterogeneze od disfunkcije endotelija do nastanka aterosklerotičnega plaka. Razlaga kratic: adhez. – adhezijske; GMC – gladkomišične celice; LDL – lipoproteini nizke gostote; MCP-1 – monocitni kemoatraktantni protein-1; M-CSF – makrofagni kolonijo stimulirajoči faktor; O₂ - kisik (21).

Tam se monociti pod vplivom makrofagne kolonije spodbujajočega dejavnika (M-CSF)-citokina oz. rastnega dejavnika, ki ga prav tako izločajo endotelijske celice, diferencirajo v makrofage. Le-ti imajo odstranjevalne receptorje, na katere se veže oksidirani LDL. Če se v makrofagih nakopiči preveč LDL, se spremenijo v t.i. penaste celice, ki sčasoma propadejo, njihova lipidna vsebina pa se nalaga v intimi v obliki nekrotičnega jedra maščobne lehe. Ob nadaljevanju procesa se začnejo okoli lipidnega jedra razmnoževati tudi gladkomišične celice (20, 22), ki izločajo proteine zunajceličnega matriksa, kot sta

kolagen in elastin, kar omogoča nastanek fibroznega pokrova. Morfološko tako iz maščobne lehe sčasoma nastane aterosklerotična leha (plak, aterom). Ateromi se večajo in z nadaljevanjem procesa brazgotinjenja (fibroza) napredujejo v fibrozne plake, vanje pa se pogosto odlaga tudi kalcij (21).

V okolini jedra lehe se nahajajo številni makrofagi in limfociti T. Večina teh celic je aktiviranih in izločajo vnetne citokine, npr. IL-1, TNF- α in IFN- γ . Med njimi je še posebej pomemben TNF- α , ker spodbuja nastanek prostih kisikovih radikalov. S tem se vzdržuje začaran krog vnetja in oksidacije LDL, vse dokler je v plazmi prisoten LDL (20, 22).

1.5.3 Zapleti

Na najbolj preprosti ravni ločimo dve vrsti aterosklerotičnih leh: stabilne in nestabilne. Za akutne zaplete so zlasti nevarne nestabilne lehe, ki so mnogokrat nehomogene, imajo velike lipidne vložke, tanek fibrozni pokrov, malo gladkomišičnih celic ter vsebujejo večje število vnetnih celic (zlasti limfocitov T). Kadar so limfociti in makrofagi aktivirani, izločajo različne proteolitične encime, ki razgrajujejo vezivno ogrodje aterosklerotične lehe, in s tem povzročijo njen neodpornost na hemodinamski stres. Zato takšne lehe ob neugodnih hemodinamskih pogojih lahko počijo. Posledica je tromboza ali embolizacija (21).

Ob nastanku večjega krvnega strdka, ki povsem zapre žilno svetlino, pride do akutnih zapletov z značilnimi kliničnimi posledicami. Če nastane manjši krvni strdek, ki ne moti toka krvi, takšna sprememba običajno ne povzroči klinično zaznavnih posledic. Neokluzivni krvni strdek lahko preraste vezivo, s tem pa se aterosklerotična leha postopoma veča. Takšne lezije, ki se počasi večajo in zožujejo žilno svetlino, praviloma niso nevarne za akutne zaplete, kajti z ožanjem žile se vzporedno razvijajo kompenzatorni (izravnalni) mehanizmi, zlasti kolateralni krvni obtok in prilagoditev tkiva na hipoksijo (21).

1.5.4 Ateroskleroza aorte

Aorta je lahko eden od modelov za raziskavo patofiziologije ateroskleroze in za študij učinkovitosti različnih zdravil, ki se uporabljajo za preprečevanje ateroskleroze. Za aorto so značilne anevrizmatske razširitve (velike tudi do štirikratnega premera aorte), ki so

povezane z različnimi zapleti. Tvegan je nastanek disekcije (23), pri kateri se notranja plast aortne stene pretrga, zunanja pa ostane cela. Kri steče skozi raztrganino, razkolje srednjo plast in ustvari nov kanal v steni aorte (24). Prav tako so dilatativne aterosklerotične spremembe, zlasti v območju prsne aorte in aortnega loka, povezane s tveganjem za možganske in periferne tromboembolizme. Ta t.i. ateroembolični sindrom se lahko kaže kot ledvična odpoved s spremembami na koži (livedo reticularis), s sindromom modrega palca ali kot multisistemska organska odpoved, povzročena z mikroembolizmi iz aterosklerotičnih leh v aorti (23).

1.5.5 Ateroskleroza zunajlobanjskih možganskih arterij

Bolezenske spremembe na zunajlobanjskih možganskih arterijah sodijo v okvir sistemske aterosklerotične bolezni. Pri osebah, ki imajo predklinične ali klinične aterosklerotične spremembe na karotidnih arterijah, je pojav sistemskih aterosklerotičnih zapletov dvakrat večji kot pri zdravih. Posebnost ateroskleroze zunajlobanjskih možganskih arterij je, da za zaplete ni prvenstveno odgovorna stopnja zožitve arterije zaradi aterosklerotične lehe, temveč večino zapletov povzročijo embolizmi iz trombotičnega materiala, ki se nabira na okvarjeni arterijski steni. Zato je pomembno, da se poleg stopnje zožitve poskuša ugotoviti tudi sestavo aterosklerotičnih leh (23).

1.5.6 Zdravljenje

Procese pri aterosklerozi lahko zaviramo in preprečujemo na različne načine. Najbolj poznan je model zdravega življenskega sloga (zdravo prehranjevanje, nizek indeks telesne mase, telesna aktivnost in izogibaje stresu ter kajenju). Na omenjen način lahko z izključitvijo dejavnikov tveganja preprečimo razvoj ateroskleroze in delno zavremo njen napredovanje (25).

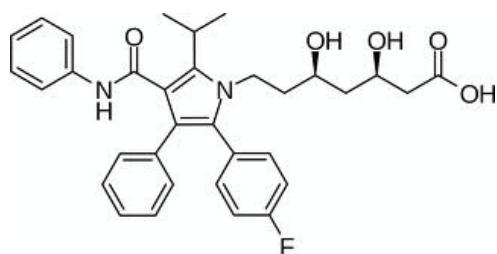
Aterosklerozo lahko tudi učinkovito zdravimo, saj z nekaterimi farmakološkimi pristopi zmanjšamo aterosklerotične plake. Uporabljamo zdravila za zdravljenje hiperholesterolemije (statini, fibrati, smole, ki vežejo žolčne kisline, nikotinska kislina in zdravila, ki zavirajo absorpcijo holesterola iz hrane), zdravila, ki vplivajo na funkcijo endotelija (donorji NO, ACE inhibitorji, sartani), zaviralci kalcijevih kanalov, antioksidanti, zdravila s protivnetnim delovanjem, zaviralci agregacije trombocitov in zdravila, ki vplivajo na razraščanje (proliferacijo) gladkomiščnih celic. Pomembno je tudi

zgodnje odkrivanje bolezni, ki so povezane z aterosklerozo ter izbira pravilne kombinacije zdravil (25).

1.6 Statini

1.6.1 Atorvastatin

Atorvastatin je zaviralec glavnega encima v sintezni poti holesterola, 3-hidroksi-3-metilglutaril koencima A (HMG-CoA) reduktaze in se uporablja za zdravljenje hiperlipidemije s povišanim holesterolom LDL (26). Njegovo kemijsko ime je (3*R*,5*R*)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirol-1-il]-3,5-dihidroksiheptanojska kislina (27).



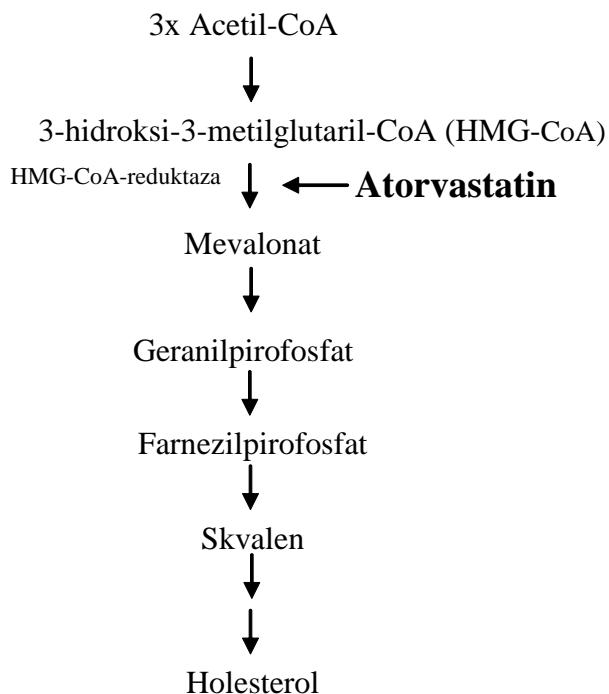
Slika 3: Strukturna formula atorvastatina.

Osnovni učinek atorvastatina je zniževanje plazemske koncentracije celokupnega in LDL holesterola. Poleg tega v manjši meri znižuje tudi koncentracijo plazemskih trigliceridov in povečuje koncentracijo HDL holesterola (26).

1.6.1.1 Mehanizem delovanja atorvastatina

Delovanje atorvastatina temelji na kompetitivni inhibiciji HMG-CoA reduktaze, ki v sintezni poti holesterola katalizira pretvorbo HMG-CoA v mevalonat (slika 4). Del molekule je strukturno analogen HMG-CoA, poleg tega se na encim veže z več kot 1000-krat višjo afiniteto kot naravni substrat. Zmanjšana sinteza holesterola v jetnih celicah sproži povečano sintezo LDL-receptorjev na površini teh celic in posledično povečan privzem holesterola iz krvi (1). Ker atorvastatin zavira tudi izločanje holesterola VLDL v jetrih, je to najverjetnejše mehanizem zmanjšanja koncentracije trigliceridov v krvi, saj se zmanjša njihova vezava na proteinski nosilec Apo B, s tem pa se poveča njihov očistek iz

plazme. Atorvastatin tudi poviša koncentracijo HDL holesterola, mehanizmi še niso natančno pojasnjeni (26).



Slika 4: Shematski prikaz sinteze poti holesterola.

1.6.2 Pleiotropni učinki statinov

Statini imajo poleg osnovnega delovanja (vpliva na koncentracijo holesterola) tudi dodatne, t.i. pleiotropne učinke, ki so neodvisni od znižanja koncentracije holesterola. Statini v endotelnih celicah inducirajo endotelno sintazo dušikovega oksida (eNOS), kar povzroči povečano nastajanje dušikovega oksida (NO), in s tem izboljšano delovanje endotelija. Preko inhibicije izražanja adhezijskih molekul na površini endotelijskih celic statini zmanjšajo prisotnost vnetnih celic v intimi žile ter zmanjšajo vnetno dogajanje. V več raziskavah so pokazali, da statini delujejo protivnetno, saj neodvisno od znižanja koncentracije serumskih lipidov znižajo vrednost C-reaktivnega proteina (CRP) za 15-30%. Zgoraj opisani in ostali učinki statinov so prikazani na sliki 5 (25).

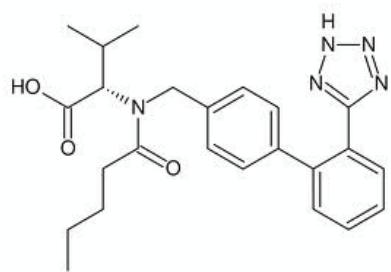


Slika 5: Prikaz različnih učinkov statinov (25).

1.7 Sartani

1.7.1 Valsartan

Valsartan je specifičen antagonist receptorjev za angiotenzin II, ki se uporablja za zdravljenje hipertenzije, simptomatskega srčnega popuščanja ter za bolnike po nedavnem miokardnem infarktu (28). Njegovo kemijsko ime je (*S*)-3-metil-2-[*N*-(4-[2-(2*H*-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil)metil]pentanamido]butanojska kislina (27).

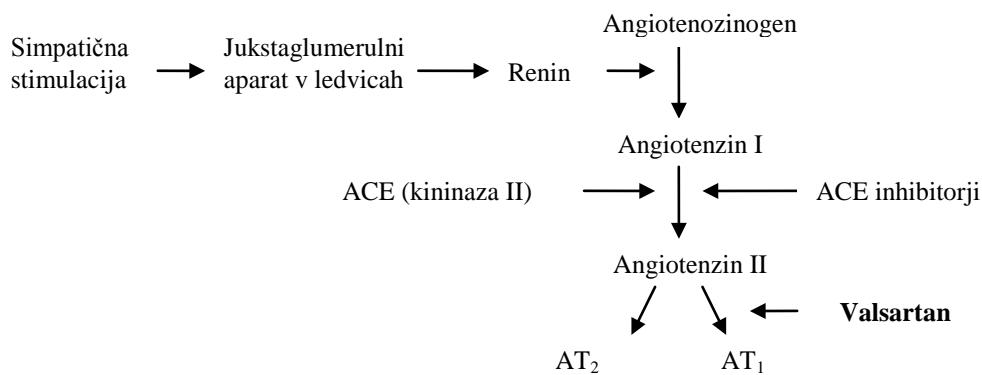


Slika 6: Struktorna formula valsartana.

1.7.1.1 Mehанизem delovanja valsartana

Zaviralci receptorjev angiotenzina II delujejo na renin-angiotenzin-aldosteronski sistem (Slika 7). Z vezavo na angiotenzinski receptor preprečujejo delovanje angiotenzina II, ki po vezavi na receptorje tipa AT₁ povzroči vazokonstrikcijo, povečano izločanje

aldosterona, zadrževanje soli in vode v ledvicah ter povečano dejavnost simpatičnega živčnega sistema. Zaviralci receptorjev angiotenzina II kompetitivno zavirajo naštete učinke angiotenzina II. Posledica je vazodilatacija in s tem zmanjšanje perifernega upora, kar vodi do znižanja krvnega tlaka pri bolnikih s hipertenzijo. Ker zaviralci zasedejo receptorje, se angiotenzin II nanje ne more vezati, zato se njegova koncentracija v krvi zviša. Prebitek angiotenzina II se veže na receptorje tipa AT₂ in jih spodbuja. Ti receptorji zavirajo proliferacijo tkiva, zato zaviralci receptorjev angiotenzina II ščitijo oz. izboljšajo strukturne spremembe srca in ožilja, ki so posledica arterijske hipertenzije (29). Za razliko od zaviralcev angiotenzinske konvertaze (ACE) ta skupina antihipertenzivov ne zavira razgradnje bradikinina, zato ne povzroča suhega kašla, ki je pogost pri uporabi zaviralcev ACE (28).



Slika 7: Shematski prikaz renin-angiotenzinskega sistema.

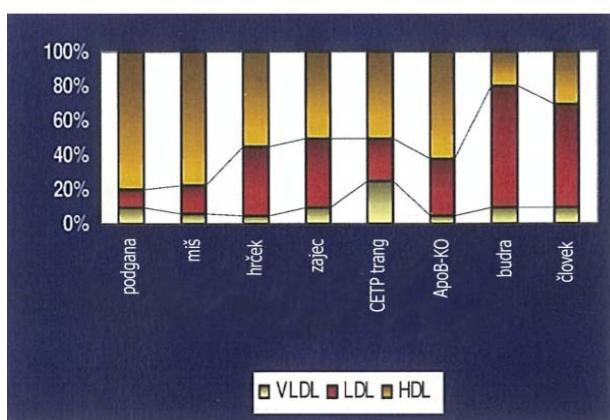
1.7.2 Pleiotropni učinki sartanov

Sartani, poleg tega da so učinkoviti in varni antihipertenzivi, se klinično uporabljajo tudi za zdravljenje srčnega popuščanja in diabetične nefropatije pri bolnikih z visokim tveganjem za bolezni srčno-žilnega sistema. Zaščitno delujejo tudi pred možgansko kapjo. Varovalni učinek sartanov je posledica dvojnega delovanja, in sicer blokade AT₁ in hkratne stimulacije AT₂ receptorjev, kar zmanjšuje lokalno vazokonstrikcijo in povečuje lokalno vazodilatacijo. Ta ukrep prepreči razširitev poškodbe možganov in pospešuje okrevanje. Sartani delujejo zaščitno tudi v procesu ateroskleroze, saj zaradi preprečevanja vezave angiotenzina II zmanjšajo izražanje lektinu podobnih receptorjev (LOX-1 receptor) na površini endotelijskih celic, na katere se vežejo oksidirani lipoproteini majhne gostote (oxLDL) in preko katerih prehajajo ter se odlagajo v žilni steni. Poleg tega zmanjšajo

oksidativni stres, opisujejo pa tudi zaščitno delovanje pri sladkorni bolezni, agregaciji trombocitov in atrijski fibrilaciji (30).

1.8 Budre ali morski prašički (*Cavia porcellus*) kot potencialni model za študijo ateroskleroze

Ustrezni živalski modeli, ki omogočajo preučevanje vpliva različne prehrane in zdravilnih učinkovin na metabolne procese ter presnovo holesterola in lipoproteinov so bistvenega pomena za razumevanje mehanizmov aterogeneze. V raziskavah metabolnih poti holesterola so večinoma uporabljali transgene ali KO (knock-out) miši (imajo izbit gen za apo B receptor), vendar imajo ti modeli v primerjavi z ljudmi drugačno razmerje lipoproteinov in holesterola v krvi, zato so pridobljeni podatki lahko le delno primerljivi. V novejših raziskavah pa so ugotovili, da so budre po količini prenosa maščob v obliki LDL in v razmerju LDL/HDL najbolj podobne človeku (Slika 8). V večini raziskav so s prehrano uspešno inducirali aterogenezo, saj so se pojavile funkcionalne ter morfološke spremembe žilja in spremembe v koncentraciji lipoproteinov in holesterola (31).



Slika 8: Primerjava razmerij lipoproteinov in holesterola v krvi med različnimi živalskimi modeli in ljudmi. Razlaga kratic: CETP trang – holesteril-ester prenosni protein transgene miši; ApoB-KO – »knock-out« miši (imajo izbit gen za apolipoprotein B receptor). Prirejeno po (31).

1.8.1 Presnova holesterola in lipoproteinov

Najpomembnejša podobnost v lipoproteinskem profilu med budrami in ljudmi je, da se večina holesterola v krvi prenaša v obliki LDL lipoproteinov. Primerljivo je tudi razmerje HDL/LDL (Slika 8).

Druge ključne točke, ki podpirajo uporabo buder kot modela za presnovo lipoproteinov in holesterola so:

- Samice imajo višje vrednosti HDL kot samci. Budre z odstranjenimi jajčniki imajo plazemski lipidni profil podoben kot postmenopavzalne ženske.
- V nasprotju z drugimi glodalci imajo veliko bolj aktiven holesteril-ester prenosni protein (CETP), pomembno komponento za reverzno holesterolno pot.
- Imajo tudi aktivne lecitin-holesterol-acil-transferazne (LCAT) in lipoproteinske lipazne (LPL) encime, ki prispevajo k preoblikovanju plazemskih lipoproteinov. Posledično se oblikujejo lipoproteinski podrazredi z različnimi morfološkimi in fiziološkimi funkcijami, vključno z njihovo vlogo kopičenja lipidov v aorti in razvojem aterosklerotičnega plaka.
- Podobno kot pri ljudeh se vezavno mesto za LDL receptor apo B razlikuje med normalno in mutirano domeno.
- Vitamina C, za razliko od podgan, ne morejo sinteizirati same, temveč ga morajo vnesti s hrano. Vitamin C je antioksidant, ki ima najverjetneje pomembno vlogo pri preprečevanju oksidacijskih procesov in s tem posledično tudi aterogeneze.
- V nasprotju s hrčki nimajo prednjega želodca, ki fermentira vlaknine, še preden pridejo v tanko črevo (31).

1.8.1.1 Vpliv nasičenih maščobnih kislin v hrani na presnovo

Vpliv vnosa nasičenih maščobnih kislin na plazemske lipide v budrah so preučevali v številnih raziskavah. Ugotovili so, da je koncentracija plazemskega LDL nižja, če je hrana bogata z večkrat nenasicienimi maščobnimi kislinami, kot pa če je bogata z nasičenimi maščobnimi kislinami (31). Vnos koruznega olja, ki je bogato z večkrat nenasicienimi maščobnimi kislinami, zniža koncentracijo celotnega plazemskega in LDL holesterola ter poveča izražanje jetrnih receptorjev za LDL in HDL v primerjavi z nasičeno mastjo ali

enkrat nenasičenim olivnim oljem (32). Poleg tega dolžina verige maščobne kisline vpliva na presnovo jetrnega holesterola in lipoproteinov. Hrana, bogata z lavrinsko (12C) in miristinsko (14C) kislino ima največji učinek na zvišanje koncentracije holesterola, ki najverjetneje nastane zaradi povečane sinteze VLDL in večje acil-CoA-holesterol-aciltransferazne (ACAT) aktivnosti v jetrih (31).

1.8.1.2 Vpliv holesterola v hrani na presnovo

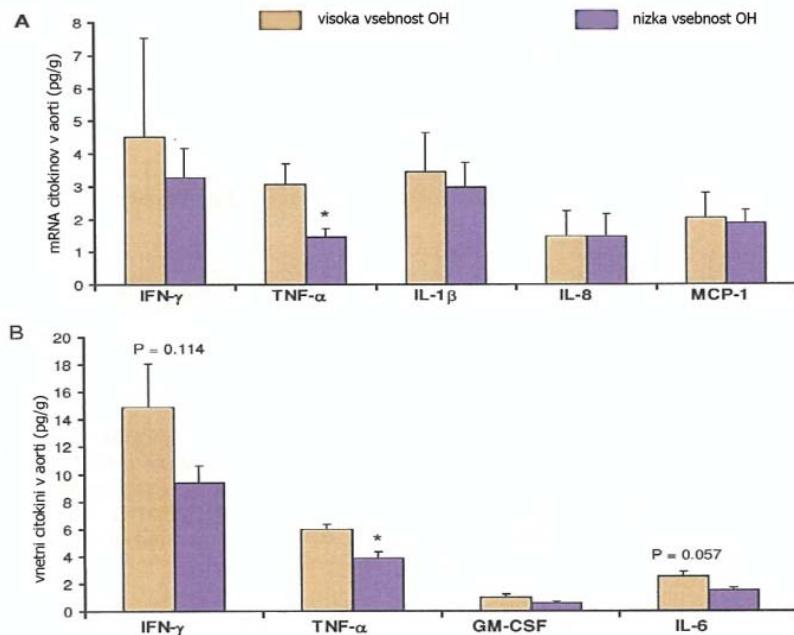
Ugotovili so, da povečanje koncentracije holesterola v hrani vodi v kopičenje holesterola v jetrih in posledično povišanje njegove plazemske koncentracije. Eden izmed mehanizmov, s katerim budre regulirajo oz. zmanjšajo koncentracijo holesterola, je zaviranje HMG-CoA reduktazne aktivnosti. Zmanjša se tudi število LDL receptorjev na membranah jetnih celic (31). Na splošno velja, da ima s hrano vnešen holesterol večji vpliv na koncentracijo holesterola v plazmi in jetrih ter aktivnosti HMG-CoA reduktaze kot pa nasičene maščobe (32).

1.8.2 Model za aterosklerozo in vnetje

Poleg sprememb v koncentraciji plazemskih lipidov, se morajo v ustrezнем živalskem modelu aterogeneze pojaviti tudi morfološke spremembe žilne stene. Pokazali so, da je pri budrah s prehransko indukcijo možno povzročiti aterosklerozo, obseg aterosklerotičnih sprememb pa je odvisen od spola in hormonskega statusa živali. Diete z visoko koncentracijo holesterola inducirajo kopičenje holesterola v aorti, nekatere sestavine hrane ali dodatek učinkovin pa lahko zmanjšajo njegovo koncentracijo v aorti tudi v prisotnosti diete z visoko vsebnostjo holesterola (31).

Kot smo že omenili, so v zadnjih letih ugotovili, da ateroskleroza ni zgolj posledica nalaganja holesterola v stene arterij, ampak proces, pri katerem v žilni steni potekajo vnetni procesi. Glede na naravo vnetja, naj bi idealen živalski model za aterosklerozo imel podobne bolezni kot ljudje, tako v smislu presnove holesterola kot tudi pri vnetnih procesih. Pri budrah so ugotovili, da se po 12 tednih zelo poveča količina aortnih citokinov tistim, ki so bile krmljene z visoko vsebnostjo holesterola v primerjavi s tistimi, ki so bile krmljene z nizko vsebnostjo holesterola. Ravno tako velja, da omejitev ogljikovih hidratov v krmi po 12 tednih zmanjša izražanje genov za vnetne citokine (slika A) oz. količino

vnetnih citokinov (slika B), kar lahko opazimo pri primerjavi koncentracije interferona (IFN)- γ , dejavnika tumorske nekroze (TNF)- α in interlevkina 6 (IL-6) v aorti (31).



Slika 9: Gensko izražanje (A) in koncentracija vnetnih citokinov (B) v aorti budet (povprečna vrednost \pm SEM, n = 10 budet na skupino) krmljenih bodisi z nizko (12% energije) ali visoko (40% energije) kolicino ogljikovih hidratov, ki vsebuje 0,25% holesterola. Prirejeno po (31).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

V raziskavi želimo ugotoviti ali so budre primeren model za induciranje aterogeneze in preučevanje morfoloških sprememb na srčno-žilnem sistemu. Glede na rezultate novejših raziskav imajo sestavo in presnovo lipoproteinov ter holesterola najbolj podobno človeku. Da bomo lahko opazovali spremembe, jih bomo razdelili v več skupin ter jih krmili z proaterogeno dieto z ali brez učinkovin.

Iz proaterogenih prehranskih dodatkov kot so maščobe, holesterol, ogljikovi hidrati in beljakovine želimo sestaviti recepturo za aterogeno dieto, ki bo v čim krajšem času povzročila dovolj velike morfološke in funkcionalne spremembe na žilah, da jih bomo lahko zaznali, analizirali in ovrednotili. Primerjali jih bomo z odzivom in spremembami na žilah živali, krmljenih z navadno prehrano.

Namen našega dela je ugotoviti ali so histomorfološke in funkcionalne spremembe na žilah manjše, če živali poleg aterogene diete prejemajo tudi subterapevtske odmerke valsartana ali atorvastatina ter ali je kombinacija obeh učinkovin močnejša pri zmanjševanju sprememb na srčno-žilnem sistemu. Odzivnost žil bomo ovrednotili z acetilholinom, ki deluje preko vezave na muskarinske receptorje tipa M₃ in žile sprošča ter s fenilefrinom, ki deluje preko vezave na α₁ membranske receptorje in žile krči. Rezultate bomo primerjali z uporabo enofaktorske analize variance in Bonferronijevega post-hoc testa. Lumen abdominalnih aort bomo barvali z raztopino Oil red O, ki obarva maščobne lehe. S tem bomo ugotovili ali so le-te prisotne v žilah in med skupinami primerjali njihove površine. S histološko analizo bomo ovrednotili zadebelitev in strukturo žil ter jih primerjali med posameznimi skupinami živali.

Naše delovne hipoteze so:

1. Budre so primeren model za induciranje aterogeneze in preučevanje histomorfoloških sprememb na srčno-žilnem sistemu.
2. Z ustrezeno aterogeno dieto lahko induciramo morfološke in funkcionalne spremembe na žilah budet.
3. Pod vplivom valsartana so morfološke in funkcionalne spremembe na žilah manjše.
4. Pod vplivom atorvastatina so morfološke in funkcionalne spremembe na žilah manjše.
5. Kombinacija obeh učinkovin je močnejša pri zmanjševanju sprememb na srčno-žilnem sistemu.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 *Uporabljeni reagenti in raztopine*

Acetilholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA; M = 181,7). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 10 mmol/L.

Heparin (Krka, Novo mesto, Slovenija) je glikozaminoglikan, ki se veže na trombin III in ga aktivira. Uporablja se kot antikoagulant. V viali je 5 ml raztopine za injiciranje, ki vsebuje 25000 i.e. heparina v obliki natrijeve soli. Pred izolacijo aort smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin v odmerku 0,3 ml / žival (približno 500 i.e / 100 g telesne mase živali).

KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija; M = 74,56). Pripravili smo matično raztopino koncentracije 3 mol/L.

Fenilefrin (FE) (hidroklorid) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija; M = 203,7) je selektivni α_1 agonist, ki deluje direktno na žilno muskulaturo in povzroča dvig krvnega tlaka. Uporablja se pri hipotenziji in šoku. Pri poskusih smo pripravili matično raztopino koncentracije 10 mmol/L.

Uretan (etyl karbamat) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija, M = 89,09) je anestetik, ki se uporablja v veterini in je kancerogen. Pri poskusih smo pripravili matično raztopino koncentracije 2,24 mol/L (20 g uretana/100 mL). Za anestezijo pred odvzemom tkiv smo uporabili 0,7 mL raztopine na 100 g telesne mase živali.

K-H raztopina (modificirana raztopina po Krebs-Henseleitu): 118 mmol/L NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija); 4,7 mmol/L KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija); 1,2 mmol/L KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška); 1,2 mmol/L MgSO₄ (Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija); 25 mmol/L NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Nemčija); 2,5 mmol/L CaCl₂ x 2H₂O (Merck, Darmstadt, Nemčija); 11 mmol/L glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška).

Karbogen (plinska mešanica 95% O₂ in 5% CO₂) (jeklenke polni Messer, Slovenija): plinsko mešanico smo uporabili za prepihanje raztopine K-H v kivetah.

Raztopina Oil red O; Oil red O stock: 0,7 g Oil red O (Sigma-Aldrich O-0625, St. Louis, ZDA; M = 408,5); 200 ml izopropanola (Merck, Darmstadt, Nemčija) in Oil red O delovna raztopina: 6 delov Oil red O stock, 4 deli demineralizirane vode.

Formalin: 4% vodna raztopina formaldehida (za histološke preiskave) (Merck, Darmstadt, Nemčija), 10% vodna raztopina formaldehida (za morfometrijo) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija).

Parafin (Merck, Darmstadt, Nemčija): mešanica ogljikovodikov z dolgo in razvejano verigo, T_{tal}: 57 - 60°C.

Ksilol (dimetilbenzen) (Merck, Darmstadt, Nemčija) je organsko topilo iz skupine aromatskih ogljikovodikov.

Etanol različnih koncentracij (od 70% do absolutnega) (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Kanadski balzam (Kemika, Zagreb, Hrvaška): smola z odličnimi optičnimi lastnostmi in lepilnimi sposobnostmi za leče, zaradi česar se veliko uporablja v mikroskopiji.

Hematoksilin eozin (HE): barvilo za histološko barvanje preparatov; hematoksilin (Merck, Darmstadt, Nemčija) je naravno bazično barvilo, eozin (Kemika, Zagreb, Hrvaška) je kislo barvilo.

Holesterol (KEFO, Ljubljana, Slovenija).

Fruktoza (DM-Drogerie Markt, Karlsruhe, Nemčija).

Jedilna svinjska mast (Mercator, Slovenija).

Atorvastatin (Krka, Novo mesto, Slovenija) smo uporabili v obliki kalcijeve soli.

Valsartan (Krka, Novo mesto, Slovenija).

Jajčni rumenjak; (jajca Mercator generik, Slovenija) sestava na 100 g: 26,54 g maščob; 1234 mg holesterola; 3,59 g ogljikovih hidratov; 15,86 g beljakovin; 52,31 g vode.

Briketi za osnovno krmljenje buder; (Altromin 3123, Lage, Nemčija) surova hrana: 14% surovih beljakovin; 4% surovih maščob; 19,5% surovih vlaknin; 7,5% surovega pepela; 0,8% kalcija; 0,6% fosforja.

Briketi za doječe budre; (Altromin 3113, Lage, Nemčija) surova hrana: 15,5% surovih beljakovin; 4% surovih maščob; 19,5% surovih vlaknin; 8% surovega pepela; 0,8% kalcija; 0,6% fosforja.

Vse matične raztopine smo pripravili v bidestilirani vodi ter jih redčili do končnih koncentracij, ki so navedene pri posameznem reagentu.

3.2 Poskusne živali

Pri izvedbi poskusov smo uporabili budre (*Cavia porcellus*) reje DHN (Dunkin Hartley), ki so tehtale od 1030 do 1380 g. Na začetku poskusa so bile stare med 8 in 9 mesecev. Razdelili smo jih v pet skupin po 3-5 živali s približno enako težo, starostjo in enakim spolom. V prvih treh skupinah so bili samo samci, v preostalih dveh pa samo samice. Dodatnih skupin, kjer bi bila prisotna oba spola, nismo imeli, saj smo bili omejeni s številom kletk in živali. Vsako skupino smo vzrejali v svoji kletki z neomejeno količino prilagojene diete za namen poskusa (Tabela 1). Živali so imele ves čas na razpolago poljubno količino vode (*ad libitum*). Krmili smo jih v stalnih pogojih (temperatura okolja 24 +/- 1 °C) z menavo dnevno-nočne osvetlitve na 12 ur.

Tabela 1: Razporeditev buder po skupinah (M - samci, Ž - samice).

Skupina (kletka)	Vrsta diete
1- M	Osnovna prehrana
2- M	Aterogena dieta (AD)
3 - M	AD + atorvastatin
4 - Ž	AD + valsartan
5 - Ž	AD + atorvastatin + valsartan

Za opravljanje poskusov smo pridobili Dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih št. 34401-23/2009/3, ki ga je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije.

3.3 Sestava aterogene diete

Aterogeno dieto za indukcijo ateroskleroze smo pripravili iz briketov za krmljenje buder in tekoče homogene zmesi, s katero smo brikete oblili. Homogena zmes je bila sestavljena iz proaterogenih snovi. Pri določanju njihove vsebnosti pa smo izhajali iz podobnih raziskav (33, 34, 35, 36, 37, 38, 39). Ker so bile aterogene diete v drugih raziskavah zelo različne, smo si pomagali tudi s preizkušanjem in tako pripravili dieto, ki je bila dovolj obstojna in proaterogena za čim hitrejšo in čim večjo indukcijo ateroskleroze.

Za vsak preskus smo pripravili po 100 g krme, jo posušili in opazovali, če sestavine homogene zmesi dobro penetrirajo v brikete.

Pri prvem preskusu priprave diete smo za homogeno zmes uporabili holesterol, fruktozo in celo jajce (Tabela 2), vendar briketi po namakanju in sušenju zaradi prevelike količine vode v beljaku niso imeli primerne konsistence.

*Tabela 2: Sestava prve poskusne aterogene diete.
(celo jajce, svež = 50,0 g; % vode = 75,8; celo jajce, posušeno = 12,1 g)*

Sestava	%
Jajce, posušeno	12,1
Holesterol	0,1
Fruktoza	7,8
Briketi	80

V drugo smo za pripravo uporabili jajčne rumenjake, holesterol in fruktozo (Tabela 3). Tokrat so briketi obdržali ustrezno konsistenco.

*Tabela 3: Sestava druge poskusne aterogene diete.
(jajčni rumenjak, svež = 18,0 g; % vode = 52,3; jajčni rumenjak, posušen = 8,6 g)*

Sestava	%
Jajčni rumenjak, posušen	8,9
Holesterol	0,1
Fruktoza	8,1
Briketi	82,9

Nazadnje smo dieti dodali še svinjsko mast. Z njo smo nato krmili živali (Tabela 4).

Iz jajčnih rumenjakov, holesterola, svinjske masti in fruktoze smo pripravili homogeno zmes, v katero smo 24 ur namakali brikete. Če je bila krma namenjena skupini živali, ki so prejemale tudi učinkovine, smo le-te vmešali v homogeno zmes v ustreznih koncentracijah. Med namakanjem smo vse skupaj večkrat premešali. Prepojene brikete smo nato sušili 4 dni pri 25°C in visokem pretoku zraka (izmenjava 6 x na uro).

Tabela 4: Sestava aterogene diete s katero smo krmili živali.

Sestavina	[%]
Jajčni rumenjak, posušen	8,6
Holesterol	1
Svinjska mast	5
Fruktoza	8,4
Briketi za osnovno hranjenje buder	38,5
Briketi za doječe budre	38,5

3.4 Odmerki učinkovin

Odmerke atorvastatina in valsartana smo določili na podlagi preteklih raziskav, kjer so preučevali vpliv enakih skupin zdravil na srčno-žilni sistem buder, kot smo jih nameravali tudi v našem poskusu. Iz losartana (3 mg/kg/dan), ki so ga uporabili v podobni študiji, smo izračunali odmerek valsartana glede na razmerje priporočenih dnevnih odmerkov pri človeku (40). Dobili smo rezultat 4,8 mg/kg/dan. V eni od raziskav so preverjali učinek atorvastatina (10 mg/kg), zato preračunavanje ni bilo potrebno (41). Zaradi namena poskusa, da ugotovimo vpliv subterapevtskih odmerkov učinkovin na srčno-žilni sistem buder, smo dobljene vrednosti atorvastatina in valsartana prepolovili.

Tabela 5: Odmerki učinkovin na budro.

Učinkovina	Oderek
Atorvastatin	5 mg/kg/d
Valsartan	2,4 mg/kg/d

3.5 Krmljenje

Budre smo krmili 11 tednov po načelu *ad libitum*. Vsak dan so doble novouzalogo krme, ki so je lahko pojedle v neomejenih količinah. Na razpolago so imele tudi poljubno količino vode. Povprečna poraba hrane na dan je bila 50 g na budro in predstavlja le približno oceno, pridobljeno na podlagi porabljenih krme v vseh kletkah .

Za vsako skupino smo na začetku poskusa pripravili po 10 kg krme (Tabela 6). Ko je kateri izmed skupin krme zmanjkalo, smo naredili novo zalogo po istem vzorcu. Shemo smo

ponavljali do žrtvovanja, le da smo pripravili po manjše količine glede na število buder v skupini. Med krmljenjem smo živali tudi tehtali, in sicer pred pričetkom krmljenja, po 4 tednih in tik pred žrtvovanjem.

Tabela 6: Shematski prikaz vzorca priprave hrane.

Kletka - vrsta diete	Osnovni briketi (kg)	Briketi za dojenje (kg)	Jajca (rumenjaki)	Mast (g)	Holesterol (g)	Fruktoza (g)	Atorvastatin (mg)	Valsartan (mg)
1 - Osnovna prehrana	10							
2 - Aterogena dieta (AD)	3,85	3,85	100	500	100	840		
3 - AD + atorvastatin	3,85	3,85	100	500	100	840	1000	
4 - AD + valsartan	3,85	3,85	100	500	100	840		480
5 - AD + atorvastatin + valsartan	3,85	3,85	100	500	100	840	1000	480

3.6 Žrtvovanje

Anestezijo smo izvedli z intraperitonealno injekcijo uretana v odmerku 0,7 ml matične raztopine (0,14 g uretana) / 100 g telesne mase živali. Za preprečitev strjevanja krvi smo živalim intraperitonealno vbrizgali heparin v odmerku 1000 i.e./100 g telesne mase živali. Ko so bile živali v primerno globoki anesteziji, smo pričeli s preparacijo.

Trebušno steno smo odprli v višini 2 cm pod ksifoidnim izrastkom spodnjega dela prsnice. Z odstranitvijo trebušne prepone smo si prikazali srce in velike žile v mediastinumu. Živalim smo odvzeli kri iz spodnje vene kave in jo dali v epruvete s tremi različnimi dodatki.

- EDTA (hemogram, hematologija),
- litijev heparinat (biokemija) in
- z gelom, za kasnejšo ločitev krvnega strdka od seruma (biokemija).

Po odprtju prsnega koša smo od descendantne torakalne aorte odstranili vezivo in maščevje. S pripravo žilnih obročkov smo pričeli v višini 5 mm pod izhodiščem leve arterije subklavije in pripravili 8 žilnih obročkov premera 3-4 mm. Žilne obročke smo namestili v kivete naprave za poskuse na izoliranih žilah, ki so bile napolnjene z raztopino K-H.

Izolirali smo tudi 1 cm abdominalne aorte, ki se nahaja pod diafragmo, do razdelitve v levo in desno iliakalno arterijo. Najprej smo jo očistili okolnega maščevja in veziva. Fiksirali smo jo v 10% formalinu za 24-48 ur.

Za histološke preiskave smo izolirali razcepišče aortnega loka. Prav tako smo prerezali zgoraj ležečo kožo in podkožno tkivo ter izolirali karotidne arterije na obeh straneh. Oba tkivna vzorca smo fiksirali v 4% formalinu.

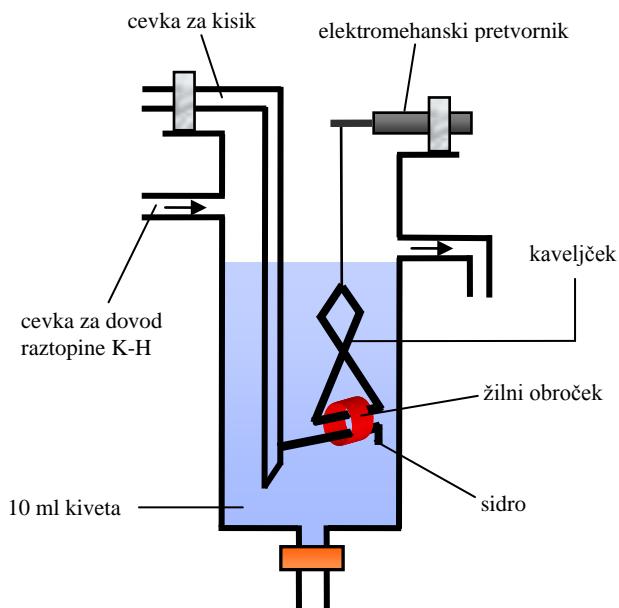
3.7 Poskusi na izoliranih žilah

3.7.1 Naprava za poskuse na izoliranih žilah

Naprava za poskuse na izoliranih žilah je bila izdelana v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Naprava je sestavljena iz vodne kopeli z osmimi 10 ml kivetami, ki imajo ločene priključke za izmenjavo hranilne raztopine (raztopina K-H) in dovod plinske mešanice za oksigenacijo. Raztopino smo preprihovali s 95% O₂ in 5% CO₂ in tako ustvarili normoksične razmere. S pomočjo termostatsko nadzorovane vodne črpalke smo vzdrževali temperaturo kopeli pri $37,0 \pm 0,5$ °C. Ostale snovi smo v kivete dodajali s pipetami.

Skozi lumen izoliranih žilnih obročkov smo vstavili dve vzporedni nerjaveči žici: ena (sidro) je bila pritrjena na držalo znotraj kivete, druga (kaveljček) je bila preko nerjaveče žice povezana z mehansko-električnim pretvornikom (ITIS, Ljubljana, Slovenija), ki je spremembo sile pri izometričnem krčenju pretvarjal v spremembe električne napetosti. Spremembe električne napetosti (izražene v mV) smo prek ojačevalnika in A/D pretvornika (National Instruments, NI PCI-6013, USA) zapisovali na trdi disk osebnega računalnika in jih obdelali s programsko opremo DeweSoft 6.1 (Dewetron, Trbovlje, Slovenija).



Slika 10: Shematski prikaz naprave za poskuse na izoliranih žilah (8).

3.7.2 Protokol poskusov

Odzivnost žilnih obročkov vseh živali smo preverili po enakem postopku. Kontrolno vrednost so predstavljali poskusi odzivnosti endotelija pri živalih z osnovno prehrano, primerjane skupine pa tiste, ki so prejemale aterogeno dieto ali aterogeno dieto z učinkovino.

Na začetku vseh poskusov smo žilne obročke za 90 minut (ekvilibracijski čas) uravnotežili pri mirovni napetosti 20 mN. Med tem smo raztopino K-H v kiveti menjavali na vsakih 15 minut. Ko so bile napetosti aortnih obročkov pri 20 mN stabilne, smo preizkusili njihovo odzivnost z dodatkom 60 mmol/L KCl. Ko je skrčitev dosegla stabilni plato, smo žilne obročke izprali in postopek ponavljali z enako koncentracijo KCl kot prej, dokler nismo dosegli enakomernosti odziva.

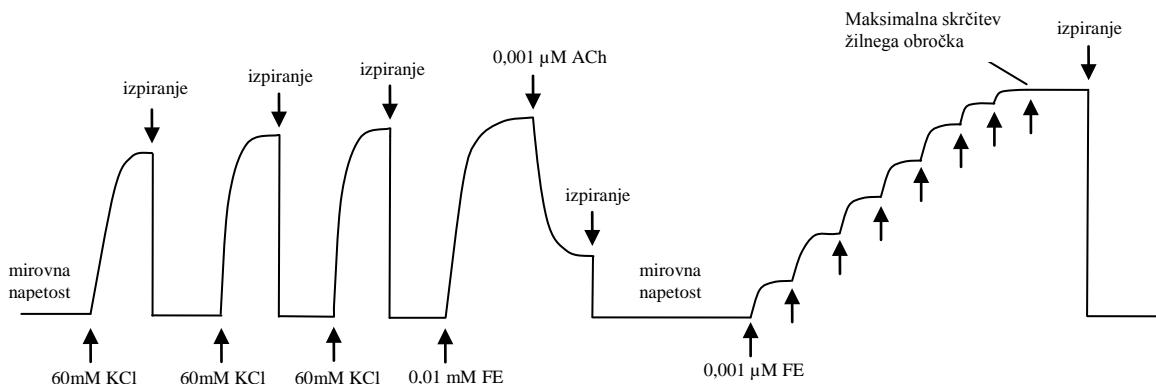
3.7.2.1 Vpliv acetilholina na sprostitev žilnih obročkov predhodno skrčenih s fenilefrinom

Po izpiranju in stabilizaciji v raztopini K-H smo vsak žilni obroček predhodno skrčili s fenilefrinom koncentracije 0,01 mmol/L. Ko je skrčitev dosegla stabilni plato, smo z acetilholinom izzvali sprostitev. S kumulativnim dodajanjem ustreznih volumnov matične

raztopine acetilholina (10 mmol/L) smo v kiveti dosegli končne koncentracije: 0,001/ 0,003/ 0,01/ 0,03/ 0,1/ 0,3/ 1/ 3/ 10/ 30/ 100 μ mol/L. Po odzivih smo žilne obročke izprali z raztopino K-H in tako povzročili, da so se vrnili na mirovno napetost.

3.7.2.2 Vpliv fenilefrina na skrčitev žilnih obročkov

Po doseženi mirovni napetosti smo v kivete z žilnimi obročki postopno dodajali ustrezen koncentracije fenilefrina. S kumulativnim dodajanjem ustreznih volumnov smo dosegli končne koncentracije: 0,001/ 0,003/ 0,01/ 0,03/ 0,1/ 0,3/ 1/ 3/ 10/ 30/ 100 μ mol/L. Višjo koncentracijo smo dodali šele, ko je skrčenje po predhodnem dodatku doseglo stabilni plato. Tako smo ustvarili postopno skrčitev žilnega obročka in pri najvišji koncentraciji morebitno maksimalno skrčitev.



Slika 11: Shematski prikaz poteka poskusa na izoliranih žilah. Prve tri krivulje prikazujejo postopek za doseganje enakomernosti odziva na KCl (uravnoteženje žilnih obročkov). Sledi prikaz konstrukcije krivulje po kumulativnem dodajanju Ach po predhodni skrčitvi žilnih obročkov s FE. Nazadje je prikazana konstrukcija kumulativno-skrčitvene krivulje. Puščice prikazujejo kumulativno dodajanje ustreznih koncentracij vazokonstriktorja FE.

3.7.3 Obdelava podatkov

S pomočjo računalniškega programa za zajem in obdelavo podatkov DeweSoft 6.1 (Dewetron, Trbovlje, Slovenija) smo določili višino platojev (silo izometrične kontrakcije) pri posameznih poskusih. Podatke smo nato statistično in grafično obdelali z računalniškim programom GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, ZDA). Rezultate meritev pri posameznih koncentracijah smo povprečili in izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Število obročkov v posamezni poskusni skupini smo prikazali pri rezultatih.

Pri poskusih, kjer smo merili sprostitveni odziv, smo za vsako koncentracijo acetilholina v kiveti izračunali odstotek sprostitive. Za 100% referenčno vrednost smo vzeli razliko med višino platoja, ki jo je dosegel predhodno skrčen žilni obroček s FE in mirovnim stanjem. Iz odvisnosti med koncentracijo acetilholina in sprostitvijo žile smo iz povprečja odzivov pri različnih koncentracijah acetilholina izdelali kumulativno koncentracijsko-relaksacijsko krivuljo. Določili smo tudi vrednosti sprostitive pri končni koncentraciji acetilholina v posamezni skupini obročkov. Za primerjavo rezultatov smo uporabili enofaktorsko analizo variance. V primeru, da je prišlo do statistično pomembne razlike smo aritmetične sredine skupin primerjali z Bonferronijevim post-hoc testom. Pri vseh statističnih analizah smo upoštevali vrednost $p < 0,05$ kot statistično pomembno razliko rezultatov.

Izmerjene vrednosti skrčitve pri poskusih s fenilefrinom smo izrazili kot odstotek med maksimalno skrčitvijo in mirovnim stanjem. Iz povprečja odzivov pri različnih koncentracijah uporabljenega vazokonstriktorja smo izdelali koncentracijsko-skrčitvene krivulje. Aritmetične sredine odzivov pri različnih koncentracijah fenilefrina smo primerjali z uporabo enofaktorske analize variance. V primeru, da je prišlo do statistično pomembne razlike smo aritmetične sredine skupin primerjali z Bonferronijevim post-hoc testom. Vrednost $p < 0,05$ je predstavljala statistično pomembno razliko.

3.8 Morfometrija

Za morfometrično vrednotenje žil smo le-te barvali z raztopino Oil red O. Poskus smo izvajali v Laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Pred začetkom barvanja smo pripravili raztopino Oil red O »stock«. Določen delež te raztopine in demineralizirane vode smo uporabili za pripravo Oil red O delovne raztopine, ki je bila sveža pred vsakim barvanjem aort.

Abdominalne aorte smo za 24-48 ur fiksirali v 10% formalinu. Za tem smo jih vzdolžno prerezali, 15 min barvali v Oil red O raztopini in zraven ves čas mešali. Pobarvane aorte smo spirali z demineralizirano vodo, jih fiksirali med dve majhni ploščici pleksi stekla ter skenirali.

Dobljene slike smo s pomočjo računalniškega programa Adobe Photoshop CS3 Extended povečali in opazovali prisotnost maščobnih leh v lumnu preparata, ki so se kazale kot temnejše rdeče pike. Označili smo jih s črno obrobo, da so bile bolje prepoznavne. Nato smo izračunali površino leh glede na površino lumna aorte in rezultate primerjali med posameznimi skupinami. Za primerjavo velikosti leh smo izračunali odstotek leh skupin z učinkovinami glede na aterogeno dieto in rezultate prikazali s stolpičnim diagramom. Statistične analize zaradi majhnosti vzorca (ena ali dve pobarvani abdominalni aorti na skupino) nismo izvedli.

3.9 Histološki preparati

S histološko tehniko, ki smo jo izvajali na Inštitutu za histologijo in embriologijo, smo pripravili tkivo za mikroskopski pregled. Iz tkivnega vzorca smo izdelali histološke preparate, jih pobarvali in analizirali.

Tkivni vzorec, velik med 4 in 8 mm, smo fiksirali v 4% formalinu. Čas fiksacije smo prilagodili velikosti tkiva, hitrosti difuzije fiksativa, volumnu, koncentraciji, temperaturi ter pH-ju fiksativa in je bil v razponu med 6-timi in 24-timi urami. Po fiksaciji smo tkivo dehidrirali z etanolom rastoče koncentracije od 70%, preko 96% do absolutnega alkohola. Nato smo alkohol odstranili z organskim topilom ksilolom, da je tkivo postalo bolj prosojno. Fiksirane tkivne vzorce smo prepajali s parafinom, ki zagotovi tkivnemu vzorcu zadostno trdoto. Uporabili smo dve parafinski kopeli, saj je v prvi kopeli parafin še onesnažen s ksilolom.

Glede na veliko število tkivnih vzorcev je postopek dehidracije, bistrenja in prepajanja potekal po vnaprej pripravljenem programu v posebnem aparatu – histokineti, ki ima na krožni plošči deset posod, v katerih so zaporedoma etanoli naraščajoče koncentracije, ksilol, ter dve ogrevani parafinski kopeli. Avtomatsko prepajanje s parafinom je trajalo 24 ur.

Po prepajanju s parafinom smo oblikovali parafinski blok s tkivnim vzorcem. Najprej smo kopel za izdelovanje parafinskih blokov segreli na 80°C. Tkvne vzorce smo vzeli iz histokinete, jih položili na toplotno kopel in odstranili plastične pokrovčke. Nato smo v

pripravljene jeklene posodice naliili parafin, katerega smo hranili v termostatu na 60°C. V parafin smo položili tkivne vzorce. Ker smo pripravljali preparate iz žil, smo morali paziti, da je bil viden žilni lumen. Jeklene posodice smo pokrili s plastično posodico, v kateri je bil tkivni vzorec med dehidracijo, bistrenjem in prepajanjem. Iz parafinskih blokov smo z drsnim mikrotomom izrezali 4-5 µm histološke rezine. Po rezanju smo le-te položili na gladino termostatirane vodne kopeli, da so se izravnale. Nato smo jih lepili na objektnik, predhodno obdelan z APTES-om (3-amino-propil-trietoksi-silan) za imunohistokemično barvanje.

Osnovno histološko barvanje za svetlobno mikroskopsko diagnostiko je barvanje s hematoksilin eozinom (HE). Omenjeno barvilo smo kanili na histološke rezine na objektniku. Le-te so se hitro obarvale. Nato smo preparat vklopili v smolo kanadski balzam ter ga pokrili s pokrivalko. Smola je počasi otrdela in fiksirala pokrivalko. Tako smo obdržali trajnost preparata.

Pripravljene histološke preparate iz levih in desnih karotidnih arterij ter razcepišča aortnega loka smo nato pregledali pod svetlobnim mikroskopom (40x ali 100x povečava) in diagnosticirali morebitne nastale spremembe.

4 REZULTATI

4.1 Tehtanje živali

Med krmljenjem smo živali tudi trikrat tehtali, in sicer pred pričetkom krmljenja, po 4 tednih in tik pred žrtvovanjem.

Tabela 7: Povprečna teža vseh živali v skupini izražena v odstotkih \pm standardna deviacija. Podana je kot relativna vrednost glede na prvotno težo (kletke: 1 – osnovna prehrana, 2 – aterogena dieta, 3 – AD z atorvastatinom, 4 – AD z valsartanom, 5 – AD z obema učinkovinama).

	Kletka 1 (povp.% \pm SD)	Kletka 2 (povp.% \pm SD)	Kletka 3 (povp.% \pm SD)	Kletka 4 (povp.% \pm SD)	Kletka 5 (povp.% \pm SD)
1.tehtanje	100 \pm 9,0	100 \pm 9,3	100 \pm 5,6	100 \pm 11,2	100 \pm 9,5
2.tehtanje	97,6 \pm 10,5	97,6 \pm 8,5	91,6 \pm 7,8	106,4 \pm 6,0	87,9 \pm 6,3
3.tehtanje	99,8 \pm 10,1	95,7 \pm 5,4	87,5 \pm 6,4	112,5 \pm 7,0	89,4 \pm 11,5

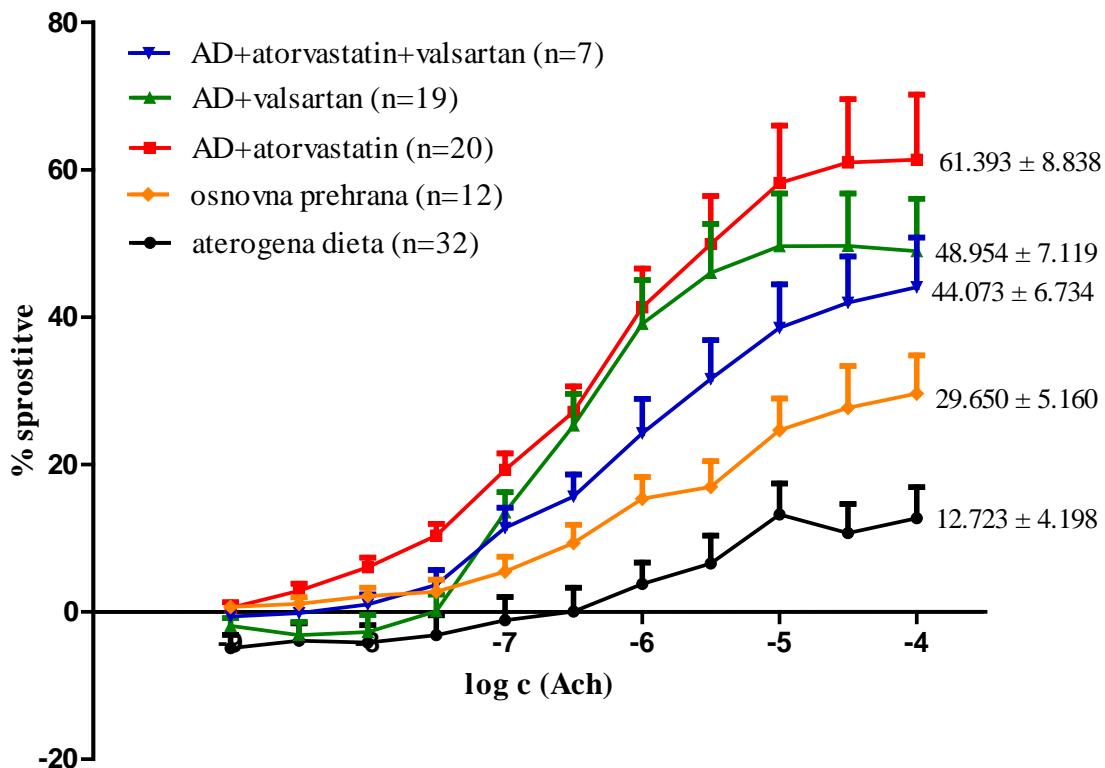
4.2 Poskusi na izoliranih žilah

4.2.1 Vpliv acetilholina na sprostitev žilnih obročkov predhodno skrčenih s fenilefrinom

Ugotavljali smo sprostitev žilnih obročkov predhodno skrčenih s fenilefrinom pri različnih koncentracijah acetilholina (konstrukcija koncentracijsko-relaksacijske krivulje) za vse skupine živali (osnovna prehrana, aterogena dieta, aterogena dieta in atorvastatin, aterogena dieta in valsartan, aterogena dieta, atorvastatin in valsartan).

Primerjava aritmetičnih sredin odzivov pri različnih koncentracijah acetilholina z enofaktorsko analizo variance je pokazala, da se koncentracijsko-relaksacijske krivulje vseh petih preiskovanih skupin statistično značilno razlikujejo ($p=0.0074$). Z uporabo Bonferronijevega post-hoc testa smo ugotovili, da pri medsebojni primerjavi skupin ni prišlo do statistično pomembnih razlik, razen med skupinama aterogena dieta in aterogena dieta z atorvastatinom (Tabela 8). Z enakima analizama smo primerjali tudi aritmetične sredine odzivov žil pri končni koncentraciji acetilholina. Vse preiskovane skupine so se po primerjavi z enofaktorsko analizo variance statistično značilno razlikovale ($p<0,001$).

Bonferronijev post-hoc test je pokazal, da je do statistično pomembnih razlik prišlo med skupinama aterogena dieta in aterogena dieta z atorvastatinom ter aterogena dieta in aterogena dieta z valsartanom (Tabela 8).



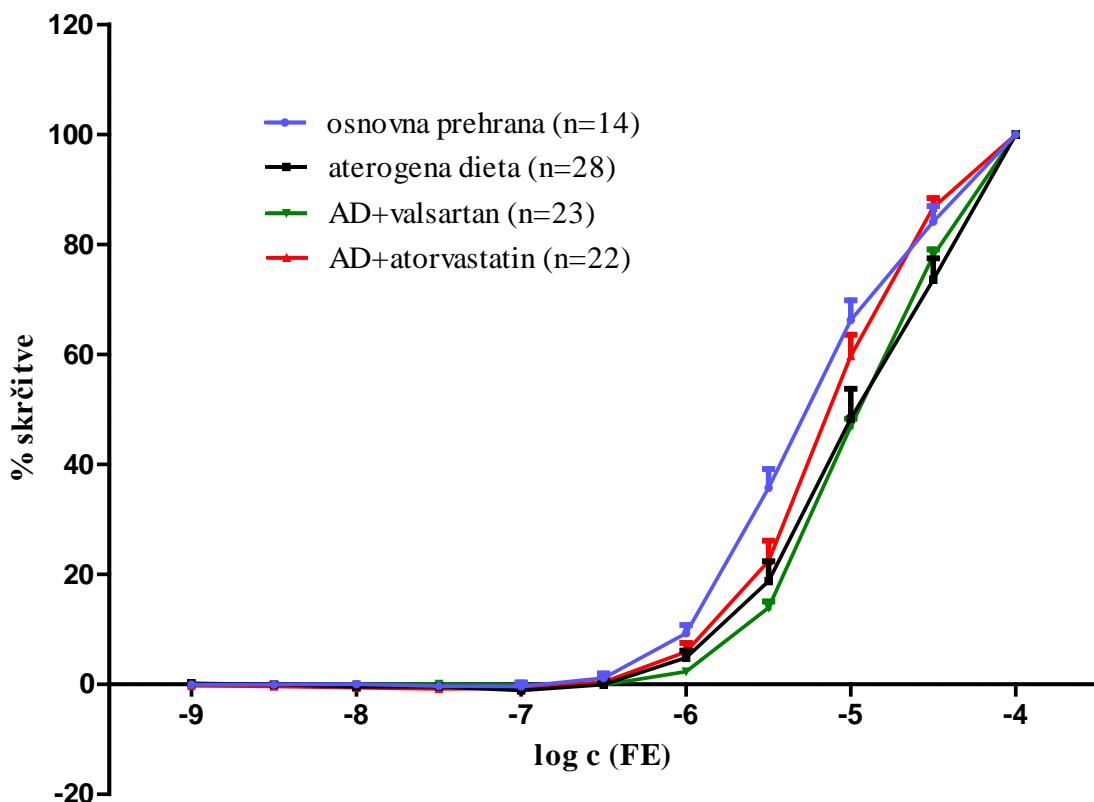
Slika 12: Koncentracijsko-relaksacijska krivulja. Sprostitev s FE predhodno skrčenih žilnih obročkov po kumulativnem dodajanju acetilholina. Rezultati so navedeni kot odstotek sprostitev v odvisnosti od logaritma koncentracije acetilholina. Navedene so tudi vrednosti sprostitev obročkov \pm SEM pri končni koncentraciji acetilholina (0,1 mmol/L), in sicer za vse skupine živali (n =število poskusov v posamezni skupini).

*Tabela 8: Prikaz rezultatov z uporabo Bonferronijevega post-hoc testa za sproščanje žilnih obročkov predhodno skrčenih s fenilefrinom po kumulativnem dodajanju acetilholina in pri najvišji koncentraciji acetilholina. Statistično pomembno razliko je predstavljala vrednost $p < 0,05$ (*** je $p < 0,001$; ** je $p < 0,01$; * je $p < 0,05$).*

	Različne koncentracije acetilholina (kumulativno dodajanje)	Najvišja koncentracija acetilholina
	$P < 0,05$	$P < 0,05$
aterogena dieta - AD+atorvastatin	da (**)	da (***)
aterogena dieta - AD+valsartan	ne	da (***)
aterogena dieta - AD+atorvastatin+valsartan	ne	ne
aterogena dieta - osnovna prehrana	ne	ne
AD+atorvastatin - AD+valsartan	ne	ne
AD+atorvastatin - AD+atorvastatin+valsartan	ne	ne
AD+atorvastatin - osnovna prehrana	ne	ne
AD+valsartan - AD+atorvastatin+valsartan	ne	ne
AD+valsartan - osnovna prehrana	ne	ne
AD+atorvastatin+valsartan - osnovna prehrana	ne	ne

4.2.2 Vpliv fenilefrina na skrčitev žilnih obročkov

Ugotavljali smo krčenje žilnih obročkov v odvisnosti od koncentracije fenilefrina (konstrukcija koncentracijsko-skrčitvene krivulje) pri štirih skupinah živali (osnovna prehrana, aterogena dieta, aterogena dieta z atorvastatinom in aterogena dieta z valsartonom). Primerjava aritmetičnih sredin odzivov pri različnih koncentracijah fenilefrina z uporabo enofaktorske analize variance je pokazala, da se krivulje med seboj značilno ne razlikujejo ($p=0,9246$).



Slika 13: Koncentracijsko-skrčitvena krivulja po kumulativnem dodajanju FE. Rezultati so navedeni kot odstotek skrčitve v odvisnosti od logaritma koncentracije fenilefrina, in sicer za žilne obročke štirih skupin živali (n=število poskusov v posamezni skupini).

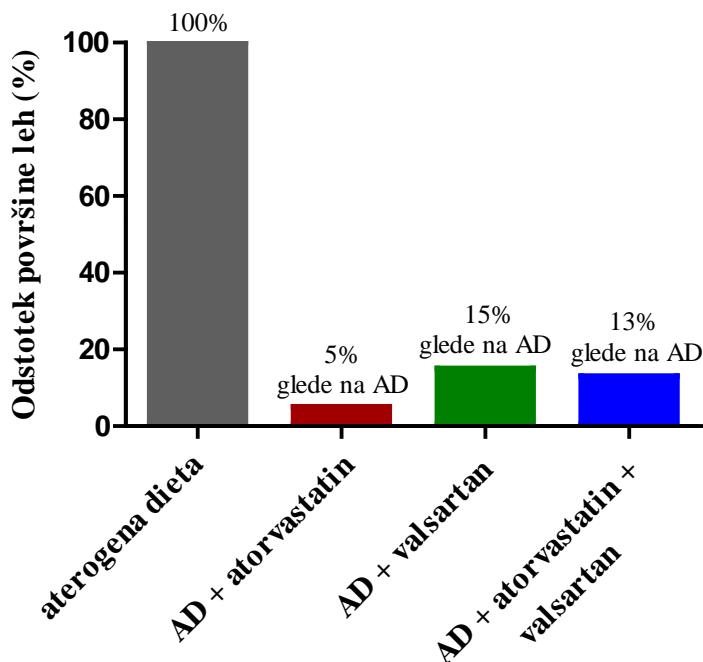
4.3 Morfometrija

Abdominalne aorte štirih skupin živali (aterogena dieta, aterogena dieta z atorvastatinom, aterogena dieta z valsartanom in aterogena dieta z atorvastatinom ter valsartanom) smo vzdolžno prerezali ter žilni lumen barvali z Oil red O raztopino, da smo ugotovili prisotnost maščobnih leh, ki so se kazale kot temnejše rdeče pike.

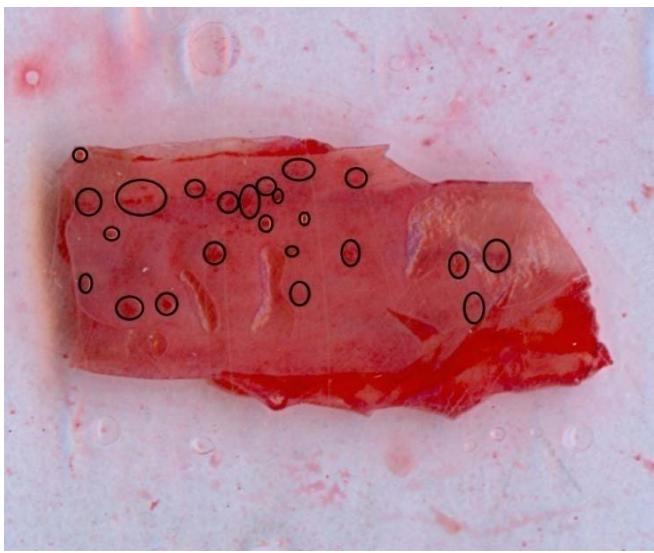
Primerjava površin leh glede na površino lumna aorte je pokazala, da je prišlo do razlik med aterogeno dieto in ostalimi skupinami (Tabela 9). Rezultate nakazujejo tudi prikazane slike (Slika 15, 16, 17, 18). Pri primerjavi velikosti leh med skupinami so najmanjšo površino zavzemale lehe pri aterogeni dieti z atorvastatinom, največjo pa lehe pri skupini z aterogeno dieto. Preostali skupini (aterogena dieta z valsartanom in aterogena dieta z obema učinkovinama) imata približno enak delež leh v lumnu abdominalne aorte glede na površino leh pri aterogeni dieti, kar je razvidno iz stolpičnega diagrama (Slika 14).

Tabela 9: Prikaz odstotka površine lehe glede na površino lumna aorte pri posamezni skupini živali (n =število aort v posamezni skupini).

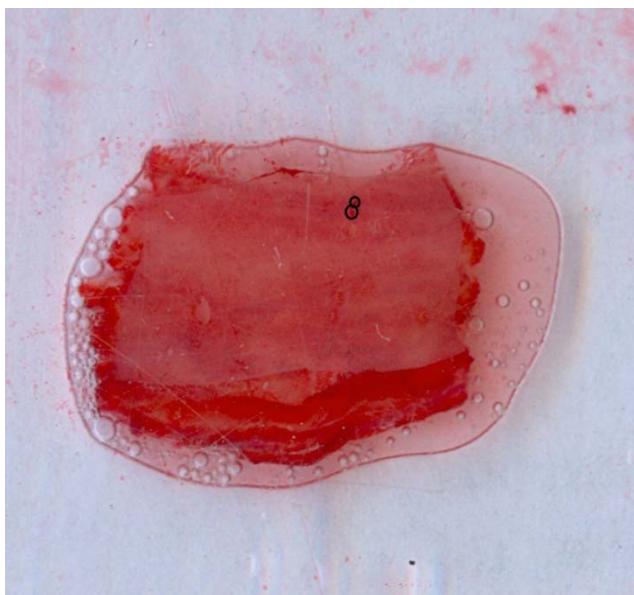
	Odstotek površine leh glede na površino lumna aorte
aterogena dieta ($n=2$)	6,0%
aterogena dieta+atorvastatin ($n=1$)	0,3%
aterogena dieta+valsartan ($n=2$)	0,9%
aterogena dieta+atorvastatin+valsartan ($n=1$)	0,8%



Slika 14: Primerjava velikosti leh med skupinami prikazana kot stolpični diagrami. Rezultati so podani glede na površino leh pri aterogeni dieti (6,0% predstavlja celoto) (AD – aterogena dieta).



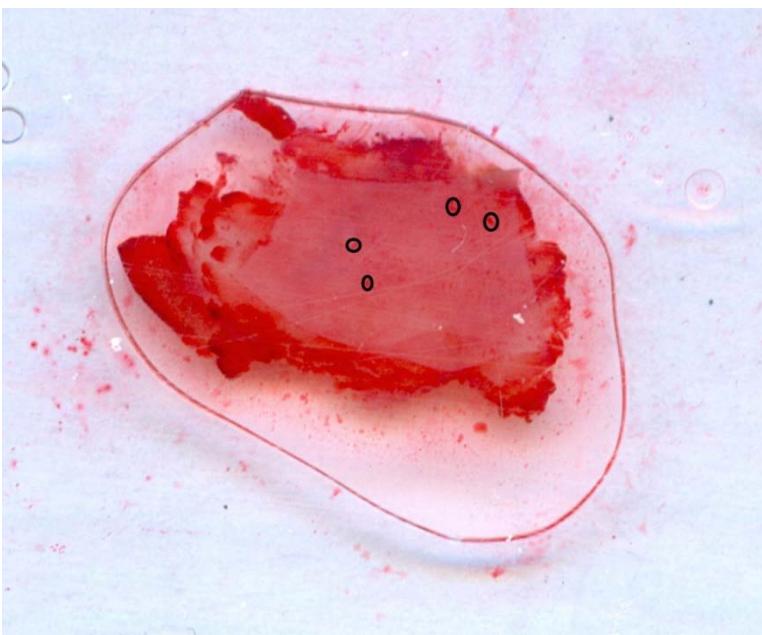
Slika 15: Vzdolžno prerezana in z raztopino Oil red O barvana abdominalna aorta živali, krmljene z aterogeno dieto. S črno barvo so obkrožene prisotne lehe v lumnu.



Slika 16: Vzdolžno prerezana in z raztopino Oil red O barvana abdominalna aorta živali, krmljene z aterogeno dieto in atorvastatinom. S črno barvo so obkrožene prisotne lehe v lumnu.



Slika 17: Vzdolžno prerezana in z raztopino Oil red O barvana abdominalna aorta živali, krmljene z aterogeno dieto in valsartanom. S črno barvo so obkrožene prisotne lehe v lumnu.



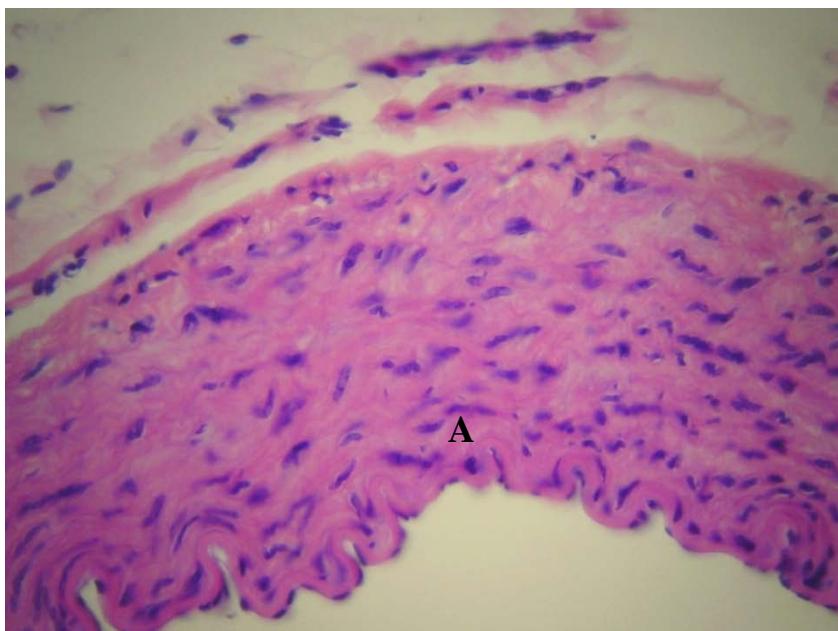
Slika 18: Vzdolžno prerezana in z raztopino Oil red O barvana abdominalna aorta živali, krmljene z aterogeno dieto, atorvastatinom in valsartanom. S črno barvo so obkrožene prisotne lehe v lumnu.

4.4 Histološki preparati

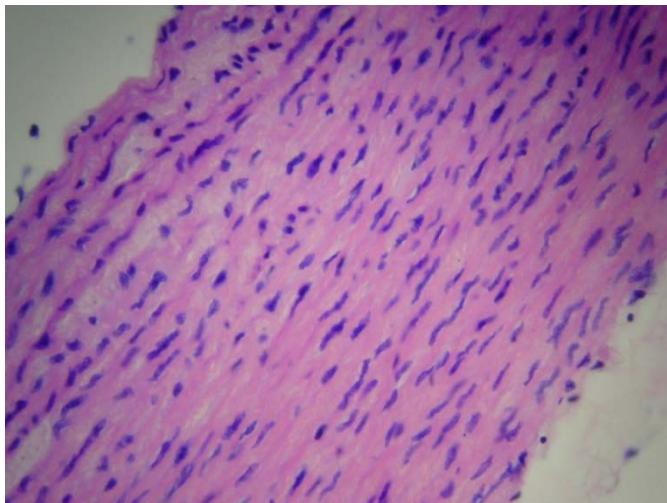
S pripravo histoloških preparatov in pregledom pod svetlobnim mikroskopom smo ugotavljali, ali je prišlo do sprememb na karotidnih arterijah in razcepišču aortnega loka pri vseh skupinah živali (osnovna prehrana, aterogena dieta, aterogena dieta z atorvastatinom, aterogena dieta z valsartanom in aterogena dieta z atorvastatinom ter valsartanom) .

4.4.1 Osnovna prehrana

V raziskavo so bile zajete štiri budre. Histološka slika karotidnih arterij in razcepišča aortnega loka je bila normalna in brez aterosklerotičnih sprememb pri vseh živalih (Slika 19).



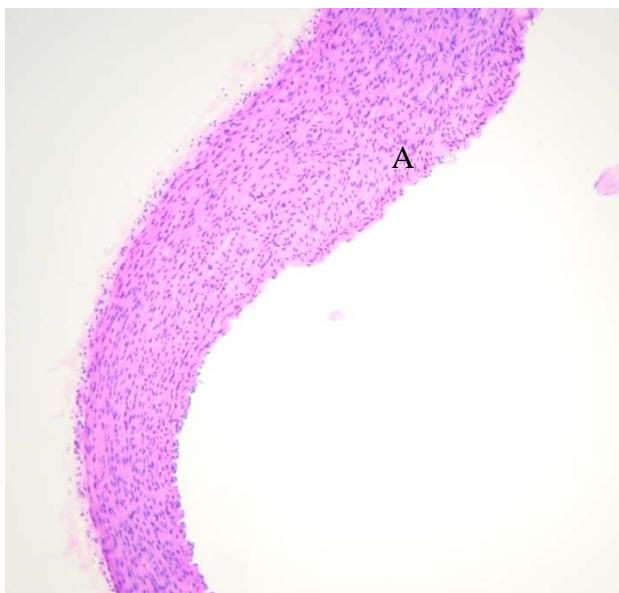
Slika 19: Histološka slika normalne karotidne arterije živali, ki je bila krmljena z osnovno prehrano. V področju A je vidna tanka intima in nepoškodovana plast endotelijskih celic na površju. Medijo tvori 10 plasti gladkih mišičnih celic, ki potekajo krožno okrog svetline (povečava: 100x).



Slika 20: Histološka slika normalnega aortnega loka živali, ki je bila krmljena z osnovno prehrano. Medijo tvori 20-30 plasti gladkih mišičnih celic, ki potekajo krožno okrog svetline (povečava: 100x).

4.4.2 Aterogena dieta

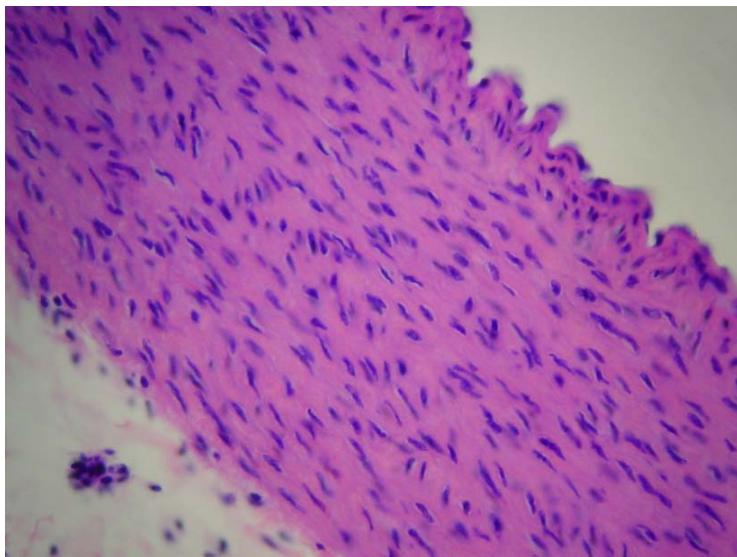
V raziskavi smo pregledali tkiva petih bud. Histološka slika stene karotidnih arterij in razcepišča aortnega loka je bila normalna pri dveh živali. Pri treh so bile vidne blage aterosklerotične spremembe na razcepišču aortnega loka, ki so se kazale kot zadebelitev intime (Slika 21). Karotidne arterije so tudi pri teh živalih ostale nespremenjene.



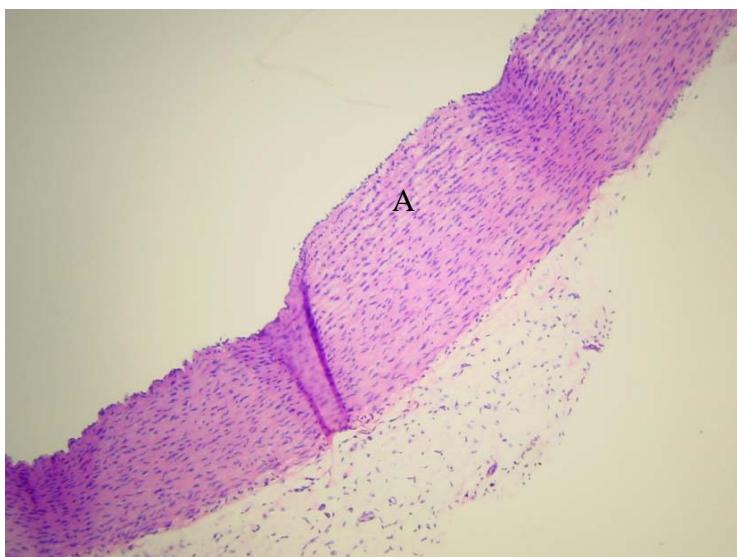
Slika 21: Histološka slika razcepišča aortnega loka z začetnimi aterosklerotičnimi spremembami na živali, ki je bila krmljena z aterogeno dieto. Vidna je zadebelitev intime v področju A (povečava: 40x).

4.4.3 Aterogena dieta in atorvastatin

Histološka slika stene karotidnih arterij je bila normalna pri vseh štirih pregledanih živalih, medtem ko so se aterosklerotične spremembe na razcepišču aortnega loka pojavile pri eni živali (Slika 23). Vidna je bila zadebelitev intime in medije.



Slika 22: Histološka slika normalnega razcepišča aortnega loka živali, ki je bila krmljena z aterogeno dieto in atorvastatinom (povečava: 100x).



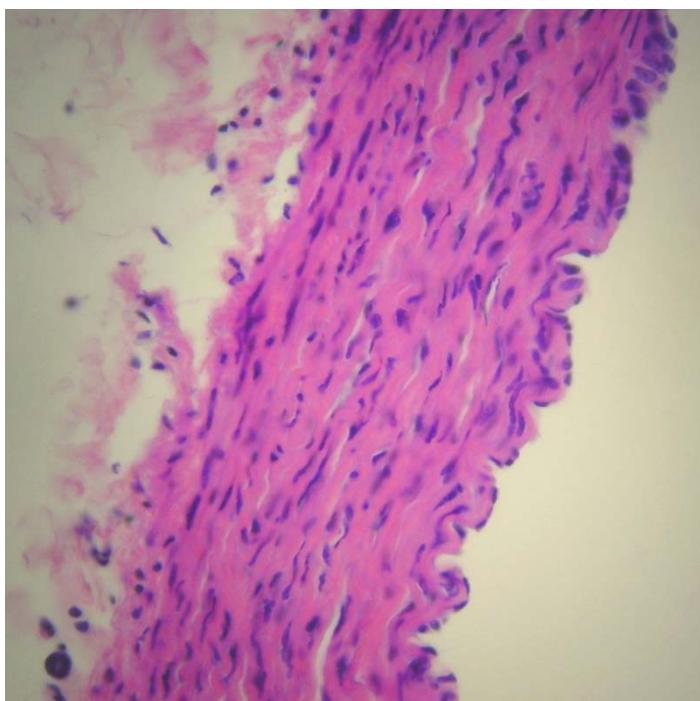
Slika 23: Histološka slika razcepišča aortnega loka z začetnimi aterosklerotičnimi spremembami pri živali, ki je bila krmljena z aterogeno dieto in atorvastatinom. V področju A je vidna zadebelitev intime in medije (povečava: 40x).

4.4.4 Aterogena dieta in valsartan

Histološka slika stene karotidnih arterij in razcepišča aortnega loka je normalna pri vseh štirih živalih.

4.4.5 Aterogena dieta, atorvastatin in valsartan

V raziskavo sta bili zajeti dve budri. Histološka slika razcepišča aortnega loka je bila normalna pri obeh živalih, medtem ko so se blage aterosklerotične spremembe pojavile na karotidnih arterijah pri eni živali. Vidna je bila zadebelitev intime na račun fibrointimalne hiperplazije.



Slika 24: Histološka slika normalne karotidne arterije živali, ki je bila krmljena z aterogeno dieto in atorvastatinom ter valsartanom (povečava: 100x).

5 RAZPRAVA

V pričajoči raziskavi smo ugotavljali primernost budet kot živalskega modela za induciranje morfoloških in funkcionalnih sprememb z aterogeno dieto. Preučevali smo, ali dodatek atorvastatina in valsartana vpliva na zmanjšanje morfoloških in funkcionalnih sprememb ob proaterogeni dieti in ali ima kombinacija obeh učinkovin močnejše antiaterogeno delovanje.

5.1 Razpravljanje o metodah

5.1.1 Uporabljene snovi in učinkovine

5.1.1.1 Aterogena dieta

Aterogena dieta je bila sestavljena iz maščob, holesterola, ogljikovih hidratov in beljakovin. Naštete snovi zvišujejo koncentracijo lipidov in holesterola v krvi, če se vnašajo v telo v preveliki količini, zato predstavljajo dobro osnovo za razvoj funkcionalnih in morfoloških sprememb na žilah.

Po 11-tedenskem krmljenju med julijem in septembrom so se v naši raziskavi pojavili začetni stadiji morfoloških in funkcionalnih sprememb na žilah pri skupini budet krmljenih z aterogeno dieto. Pri skupinah, ki so prejemale učinkovine, je bilo prepoznavnih sprememb zelo malo ali nič. Učinkovine so izboljšale oz. ohranile žilno funkcijo, kar so pokazali rezultati.

Za večje oz. bolj izrazite spremembe na žilah bi bilo potrebno živali krmiti dlje časa ali povzročiti dodatne kemične oz. mehanske poškodbe (lasersko pregrevanje žil, katetrski balon), ki bi pripomogle k nastanku večjih aterosklerotičnih procesov in leh, primernih za študijo učinka zdravil. Primerno bi bilo tudi preizkusiti, kako vplivata spol in starost na nastale spremembe, saj smo preiskušali le en spol z določeno učinkovino oz. smo imeli samo senilne živali. Kot pa je že znano, se s starostjo povečajo možnosti za nastanek mehanskih in morfoloških sprememb, ki spremenijo delovanje žilnega endotelija (42). Prav tako je lahko v skupinah, kjer smo imeli le samičke, vplival spol oz. spolni hormoni na izid

raziskave, zaradi zaščitnega delovanja estrogenov, kar so ugotovili že drugi avtorji (43). Ker smo bili omejeni s številom živali, dodatnih poskusov nismo mogli izvesti.

5.1.1.2 Atorvastatin

Atorvastatin se klinično uporablja v obliki kalcijeve soli, iz katere pripravimo primerne farmacevtske formulacije kot na primer tablete, kapsule, praške in druge za peroralno uporabo. Po zgradbi sodi med sintetične statine, ki se precej razlikujejo od naravnih statinov. Kot takšen lahko veliko bolj posnema strukturo HMG-CoA in s tem močneje inhibira HMG-CoA reduktazo zaradi česar je lahko bolj učinkovit (1). Tudi zmanjšanje vnetnega odziva, ki ga povzročijo statini, lahko pripisemo njihovemu osnovnemu mehanizmu delovanja, zaviranju sinteze holesterola in ostalih intermediatov, ki nastanejo v njegovi sintezni poti. Jetrne celice začnejo privzemati holesterol LDL iz krvi, katerega koncentracija se zato zniža. Manj holesterola LDL v krvi pomeni manjše prehajanje le-tega v stene krvnih žil, kjer se oksidira in spodbudi endotelijske celice k izdelavi in sproščanju kemokinov. Na ta način se v steni žil zbere manj imunskih celic, ki po aktivaciji sproščajo citokine (44, 45).

5.1.1.3 Valsartan

Valsartan v osnovi znižuje krvni tlak in s tem izboljša oz. ohrani žilno funkcijo. Njegovi pleiotropni učinki kažejo na zaščitno delovanje v procesu ateroskleroze, zato smo se odločili preizkusiti njegovo učinkovitost. Zaradi preprečevanja vezave angiotenzina II zmanjša izražanje lektinu podobnih receptorjev (LOX-1 receptor) na površini endotelijskih celic, na katere se vežejo oksidirani lipoproteini majhne gostote (oxLDL) in preko katerih prehajajo ter se odlagajo v žilni steni (30). Posledično se zmanjša adhezija monocitov na endotelijske celice in manjša je endotelijska apoptoza. Manj je aktiviranih trombocitov in levkocitov, ki so odgovorni za vnetni odziv (46).

5.1.2 Poskusne živali

V poskusih smo uporabili budre reje DHN (Dunkin Hartley) obeh spolov. Ugotovili smo, da je zaradi njihove velikosti težje izolirati nekatera tkiva (npr. aorto) in jih težje vzrejati, saj zahtevajo veliko prostora in hrane. Bolj primerne so manjše živali kot podgane ali miši, vsekakor so tudi bolj ekonomični model za preučevanje, saj je vzreja v laboratorijskih

pogojih cenejša in bolj enostavna. Vendar pa je slabost v primerjavi z budrami njihov lipoproteinski profil, ki ni najbolj podoben človeškemu, zaradi česar imajo na njih pridobljeni rezultati le omejeno uporabo (31). Še bolj ustreznii živalski modeli za primerjavo s človekom bi bili veliki sesalci (npr. prašič) (47).

Vpliv okolja na živali je bil nadzorovan s konstantno temperaturo, vlažnostjo in primerno menjavo svetlobe v prostoru v katerem so bivale. Kljub stalnim pogojem so živali med poskusom nekoliko shujšale, saj so imele nižjo telesno težo pri drugem in tretjem tehtanju. Izjema je skupina z aterogeno dieto in valsartanom. Pri skupinah, ki so prejemale poleg aterogene diete tudi učinkovine, je vzrok za nižjo težo lahko grenak okus same učinkovine, ki je zaznaven, če le-te niso vgrajene v farmacevtsko obliko s polnilom. Tudi skupine, ki so bile krmljene samo z aterogeno dieto, niso pridobile na teži, kar si lahko razlagamo s tem, da je bila hrana zanje neprijetnega okusa. Budre so namreč rastlinojede, v hrano pa smo jim dodali živalske maščobe. Ker so bili poskusi izvedeni poleti, lahko sklepamo, da je tudi cirkadialni ritem živali in letnih časov posredno vplival na rezultate (poletje - zmanjšanje teka).

Za raziskave morfoloških in funkcionalnih sprememb navadno uporabljam izolirane organe. Kot izolirani preparati se uporablja skoraj vsi organi ali tkiva, na katerih je mogoče meriti spremembo aktivnosti, torej učinek. V razmerah *in vitro* so prekinjene nevrološke povezave organov z osrednjim živčevjem. Prav tako ni humoralne regulacije. Med posameznimi organi in organskimi sistemi tudi ni funkcionalne povezave in delovanja povratnih regulatornih zank. Takšni poskusi so primerni za ugotavljanje kvalitativnih učinkov (presejalni poskusi, screening), kvantitativne analize učinkov, primerjavo učinkovitosti in merjenju posameznih parametrov učinka (48). Prednost *in vitro* poskusov na izoliranih žilah je tudi, da lahko nadziramo koncentracijo učinkovine na mestu delovanja, tj. ob receptorju in najbolje prikažemo odnos med koncentracijo zdravila in učinkom.

Za anestezijo živali smo uporabili uretan, ki so ga v danih odmerkih uporabili tudi v drugih raziskavah na srčno-žilnem sistemu buder (49). Za preprečevanje strjevanja krvi v žili smo uporabili heparin. Obe učinkovini smo aplicirali intraperitonealno. Sam postopek priprave živali in izolacije organov, je bil vedno enak, standardiziran in hiter.

5.2 Razpravljanje o rezultatih

5.2.1 Poskusi na izoliranih žilah

S poskusi na žilnih obročkih smo žeeli preveriti ali se žile zaradi morfoloških in funkcionalnih sprememb odzivajo drugače oz. ali se odziv izboljša z uporabo učinkovin v primerjavi z osnovno prehrano. Na odzivnost žilnih obročkov namreč poleg koncentracije vazokonstriktorja in vazorelaksatorja vplivajo še ostali dejavniki, kot so npr. spremenljivost debeline gladkega mišičnega sloja in premer žilnega obročka.

5.2.1.1 KCl

Mehanizem delovanja KCl na krčenje žilnega obročka je neodvisen od endotelija in receptorjev, zato je primeren za poskus odzivnosti uravnoteženih žilnih obročkov. Krčenje KCl je namreč posledica depolarizacije membrane gladke mišične celice v stenah žil in odprtja napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov tipa L, čemur sledi vdor Ca^{2+} in krčenje gladkih mišičnih celic (50).

5.2.1.2 Vpliv acetilholina na sprostitev žilnih obročkov predhodno skrčenih s fenilefrinom

Sprostitveni odziv, odvisen od koncentracije acetilholina, smo dokazali v vseh petih skupinah, kar nam prikazuje koncentracijsko-sprostitvena krivulja (Slika 12). Statistično značilna razlika se je pojavila med vsemi skupinami, kar smo dokazali z enofaktorsko analizo variance. Z uporabo Bonferronijevega post-hoc testa pa smo ugotovili, da pri medsebojni primerjavi skupin ni prišlo do statistično pomembnih razlik razen med skupinama aterogena dieta in aterogena dieta z atorvastatinom (Tabela 8). Skoraj enak rezultat smo dobili pri primerjavi aritmetičnih sredin odzivov žil pri končni koncentraciji acetilholina, le da smo tukaj z Bonferronijevim post-hoc testom dobili statistično pomembno razliko med skupinama aterogena dieta in aterogena dieta z atorvastatinom ter aterogena dieta in aterogena dieta z valsartanom (Tabela 8). Domnevamo, da bi bilo statističnih razlik več, če bi imeli večje število poskusnih živali ter bi jih krmili daljši čas, morda pa bi potrebovali tudi dodatno kemično ali mehansko (intraarterialna prekomerna razširitev žile s katetrskim balonom) indukcijo aterogenih leh.

Kljub temu, da s statistično analizo ni prišlo do razlik med vsemi skupinami, lahko iz dobljenih koncentracijsko-sprostivnih krivulj naredimo nekaj zaključkov. Največjo sprostitev smo izzvali v skupini živali, ki je bila krmljena z aterogeno dieto in atorvastatinom, sledijo skupine z aterogeno dieto in valsartanom, aterogeno dieto z obema učinkovinama in osnovno prehrano. Najmanjšo odzivnost je imela skupina z aterogeno dieto. Opazimo lahko tudi, da so se žilni obročki aterogene diete pri nižjih koncentracijah acetilholina krčili namesto širili, kar ja lahko posledica endotelijske disfunkcije, ki poveča skrčitveno sposobnost žil. Po pričakovanju smo dobili večji odziv skupine z osnovno prehrano kot skupine z aterogeno dieto, kar potrjuje, da smo pripravili učinkovito aterogeno dieto, ki je povzročila spremembe na žilah. Rezultati pri skupini z aterogeno dieto in obema učinkovinama so nekoliko nižji od pričakovanih, saj smo predvidevali, da bo odzivnost žil pri tej skupini največja. V bodočih raziskavah bi bilo potrebno narediti tudi poskuse na skupinah živali kot so osnovna prehrana z atorvastatinom, osnovna prehrana z valsartanom ter osnovna prehrana z atorvastatinom in valsartanom. S tem bi preverili, ali je tako odlična odzivnost endotelija posledica preprečevanja lipidov v krvi, ali mogoče drugih procesov. Napaka je lahko tudi v izbiri vazorelaksatorja, saj predhodno nismo imeli nobenih testiranj, ki bi potrdili ustreznost acetilholina, zato ne vemo, če bi bil kakšen drug vazorelaksator primernješi oz. bi se žile drugače odzvale. Na takšna domnevanja nakazuje tudi krivulja pri aterogeni dieti in valsartanu, saj se pri najvišjih koncentracijah acetilholina pojavi ponovno krčenje žilnih obročkov. Acetilolin namreč ne deluje samo na endotelijske celice muskarinskega sistema, ki pripelje do dilatacije, ampak tudi na muskarinske receptorje na gladkih mišičnih celicah. Vezava tukaj povzroči krčenje mišičnih celic. Bolje bi bilo uporabiti bradikinin ali snov P, ker žile sproščata samo preko endotelijskih poti in sta neodvisna od učinkov na gladke mišične celice (16), česar pa v našem poskusu nismo mogli preveriti zaradi premale količine biološkega materiala oz. števila poskusnih živali.

5.2.1.3 Vpliv fenilefrina na skrčitev žilnih obročkov

Fenilefrin je selektivni agonist na adrenergične receptorje α_1 , kjer povzroča vazokonstrikcijo. Krči gladke mišične celice preko adrenergičnih receptorjev α_1 na GMC v stenah žil, ki so z G-proteinom povezani receptorji. Vezava FE na endotelijske adrenergične receptorje α_1 povzroči povečanje intracelularnega kalcija $[Ca^{2+}]_i$ in posledično povečano izločanje snovi kot so NO, PGE₂, EDHF in ostalih (51).

Naši rezultati so v skladu s pričakovanji potrdili skrčitveno sposobnost žilnih obročkov v vseh štirih skupinah po kumulativnem dodajanju fenilefrina. Njegova končna koncentracija (0,1 mM) ni sprožila maksimalnega skrčitvenega odziva obročkov, saj iz naklona krivulje vidimo, da skrčitveni odziv ni dosegel platoja (Slika 13). Iz koncentracijsko-skrčitvene krivulje je prav tako razvidno, da pri koncentracijah nižjih od 0,1 $\mu\text{mol/L}$ ni prišlo do odziva žilnih obročkov. Sklepamo lahko, da je za to kriva le prenizka koncentracija in ne sama izbira vazokonstriktorja, saj smo pri višjih koncentracijah dosegli želene skrčitve. Glede na podatke iz literature obstaja tudi možnost, da pri nižjih koncentracijah FE ni prišlo do krčenja zaradi senilnosti živali, saj starost nespecifično zmanjša odzivnost nekaterih arterij na fenilefrin (42).

Z uporabo enofaktorske analize variance smo dokazali, da je odzivnost žil med vsemi skupinami statistično neznačilna. Rezultati nakazujejo, da naš model aterogene diete ni povzročil takšnih poškodb, ki bi lahko vplivale na skrčitveno sposobnost žil.

5.2.2 Morfometrija

Prisotnost leh v lumnu abdominalne aorte smo dokazali v vseh štirih preiskovanih skupinah. V vsaki skupini smo imeli po eden ali dva vzorca, zato rezultatov nismo mogli statistično analizirati, nakazujejo pa trend, da je do morfoloških sprememb prišlo ter da smo se uspešno lotili zastavljenega poskusa.

Največ leh je po pričakovnjih imela skupina živali, krmljena z aterogeno dieto. Lehe so bile prisotne praktično po celotni površini žilnega lumna. Aterogena dieta je bila torej uspešna že v tako kratkem času, saj so endotelijalne celice občutljive na izpostavljenost veliki količini lipidov. LDL se začne kopiti v intimi žil, kjer se oksidira in spodbudi endotelijalne celice k izdelavi in sproščanju kemokinov, le-ti pa celice kot so monociti in limfociti k prehajjanju preko stikov med endoteljnimi celicami v subendotelni prostor. Tam se monociti diferencirajo v makrofage, ki so odgovorni za nastanek penastih celic. Te sčasoma propadejo, njihova lipidna vsebina pa se nalaga v intimi v obliki nekrotičnega jedra maščobne lehe (21). V literaturi lahko tudi zasledimo, da se v ožilju buder pojavijo maščobne lehe samo v primeru, če so krmljene z velikimi količinami holesterola in

maščob. V njihovi vegetarijanski prehrani teh snovi ponavadi primanjkuje, zato se spremembe redko razvijejo (52).

Pri skupinah živali, krmljenih z aterogeno dieto in atorvastatinom, aterogeno dieto in valsartanom ter aterogeno dieto z obema učinkovinama so se lehe pojavile v veliko manjšem obsegu. Zavzemale niso niti odstotka površine. Najmanj jih je imela skupina z aterogeno dieto in atorvastatinom. Preostali skupini (aterogena dieta z valsartanom in aterogena dieta z obema učinkovinama) sta imeli približno enak delež leh v lumnu abdominalne aorte. Učinkovine so v subterapevtskih odmerkih delovale antiaterogeno oz. zaščitno na žile.

Da bi lahko natančneje ugotovili pojavnost leh znotraj skupine, bi morali imeti večje število vzorcev abdominalnih aort. Takšne rezultate bi lahko tudi statistično primerjali. Zaradi težavnosti postopka priprave ter prenašanja slik na računalnik vse predvidene abdominalne aorte niso bile primerne za obdelavo rezultatov. Iz vsake živali pa smo pridobili le en odsek aorte, kar je predstavljal še dodatno omejitev. Za večje oz. izrazitejše spremembe bi morali živali krmiti dlje časa in dodatno sprožiti poškodbe žilja za nastanek leh. Morda bi se v tem primeru pojavilo več leh tudi pri skupinah z učinkovinami.

5.2.3 Histološki preparati

5.2.3.1 Histološka tehnika

Histološka tehnika obsega številne postopke, s katerimi pripravimo tkivo za mikroskopski pregled. Z njimi iz tkivnega vzorca izdelamo histološke preparate, ki so primerni za nadaljnje barvanje in analizo.

Pri prvem koraku, fiksaciji, je pomembno, da tkivo takoj po odvzemu potopimo v tekočino (fiksativ), da preprečimo avtolizo in difuzijo topnih tkivnih sestavin, ohranimo pa morfološko strukturo in kemične sestavine tkiva. Na čas fiksacije vplivajo velikost tkiva, hitrost difuzije fiksativa, volumen, koncentracija, temperatura in pH fiksativa. Med fiksacijo se tkivo skrči ali razsiri, večinoma pa otrdi, saj je delovanje fiksativov na tkivo kompleksen proces, kjer med sestavinami tkiva (voda, beljakovine, maščobe, ogljikovi hidrati in soli) in fiksativom sočasno potekajo številne ireverzibilne fizikalno-kemične

reakcije. Fiksiranemu tkivu z etanolom odstranimo vodo, da preprečimo trganje in močno krčenje tkiva. S parafinom damo tkivu zadostno trdoto, da ga lahko režemo v dovolj tanke histološke rezine.

Barvanje s hematoksilin eozinom je osnovno histološko barvanje za svetlobno mikroskopsko diagnostiko. Hematoksilin je naravno bazično barvilo, ki obarva jedra celic, ribosome in druge bazične strukture temno modro. Eozin je kislo barvilo, ki obarva citoplazmo celic (mitohondriji, lizosomi) ter proteine rožnatordeče. Barvanje je posledica afinitete barvila do tkivnih sestavin, kar pomeni, da barvilo pronica iz barvne raztopine v tkivo. Tu se lahko adsorbira na površini posameznih tkivnih struktur, se v njih razaplja (na primer v maščobah) ali pa med sestavnim delom tkiva in reagentom poteka kemična reakcija, katere rezultat je obarvan reakcijski produkt (53).

5.2.3.2 Rezultati histološkega barvanja

Priprava in barvanje histoloških preparatov sta nam omogočila pregled žil pod svetlobnim mikroskopom, da smo lahko ugotavljali njihovo strukturo in spremembe še na mikro ravni. Po pričakovanjih ni bilo sprememb pri skupini živali z osnovno prehrano. Intima je ostala tanka. Plast endotelijskih celic na površju je bila nepoškodovana. Pri aterogeni dieti so tri živali imele blage aterosklerotične spremembe na razcepišču aortnega loka, ki so vidne kot zadebelitev intime. Nastane lahko zaradi povečanega števila in gostote različnih celic kot posledica kopiranja in delovanja LDL, ki se pojavi ob povišani koncentraciji holesterola in maščob v krvi (21). Zadebeljeno intimo in medijo v aortnem loku je imela tudi ena žival pri aterogeni dieti z atorvastatinom. V mediji je vidno povečano število gladkih mišičnih celic. Rezultati nakazujejo, da je aorta lahko tisti del obtočil, kjer se aterosklerotične spremembe najprej pojavijo. Aterogena dieta z valsartanom ni imela nobenih sprememb. Pri skupini z aterogeno dieto in obema učinkovinama se je zadebeljitev intime na karotidni arteriji pojavila pri eni živali zaradi fibrointimalne hiperplazije, za katero je značilna zadebeljena površinska struktura zaradi povečane gostote vezivnega tkiva. Učinkovine so torej pripomogle k ohranjanju žilne morfologije, vendar vseh histoloških sprememb niso povsem preprečile.

Pri pregledu preparatov smo ugotovili, da je prišlo le do blagih in komaj zaznavnih aterosklerotičnih sprememb, ki so povod za nadaljnjo disfunkcijo žilja. Večje spremembe

bi se pojavile ob daljšem času krmljenja npr. v obliki kalcinacij, penastih celic ali fibroznega pokrova v stenah žil. To bi lahko dodatno okrepili oz. dosegli tudi z indukcijo poškodbe žilne stene, npr. z balonskim katetrom ali kemično indukcijo. V raziskavi smo nameravali histološke preparate obdelati še z imunohistološko tehniko, kjer z uporabo specifičnih protiteles prikažemo snovi, ki imajo lastnosti antiga. V našem primeru bi ugotavliali fiziološke in patološke sestavine celic ter natančno opredelili celice v vnetnem infiltratu. Zaradi težavnosti in dolgotrajnosti postopka ter pomanjkanja poskusnih živali tega poskusa nismo izvedli.

5.3 *Ugotovitve*

1. Budre predstavljajo ustrezen živalski model za indukcijo aterogeneze in preučevanje morfoloških in funkcionalnih sprememb na srčno-žilnem sistemu. Pojavijo se maščobne lehe, blage aterosklerotične spremembe na karotidnih arterijah in razcepišču aortnega loka ter spremeni se odziv žilnih obročkov.
2. S pripravljeno aterogeno dieto smo inducirali začetne stadije morfoloških in funkcionalnih sprememb na žilah budet.
3. Rezultati nakazujejo potrebo po dodatnem kemičnem oz. mehanskem povzročanju poškodb za nastanek večjih aterosklerotičnih procesov in leh, primernih za študijo učinka zdravil.
4. Pod vplivom valsartana so morfološke in funkcionalne spremembe na žilah manjše. Funkcija žil se ohrani ali celo izboljša.
5. Pod vplivom atorvastatina so morfološke in funkcionalne spremembe na žilah manjše. Funkcija žil se ohrani ali celo izboljša.
6. Kombinacija obeh učinkovin nima močnejšega antiaterogenega delovanja kot posamezne učinkovine na srčno-žilni sistem budet.

6 SKLEP

Z raziskavo nam je uspelo potrditi, da so budre primeren model za indukcijo aterogeneze in preučevanje morfoloških in funkcionalnih sprememb na srčno-žilnem sistemu, kar je primerljivo z rezultati ostalih avtorjev. Pri našem poskusu so se pojavile maščobne lehe, blage aterosklerotične spremembe na karotidnih arterijah in razcepišču aortnega loka ter spremenil se je odziv žilnih obročkov.

Dokazali smo, da s hrano, ki vsebuje velike količine proaterogenih snovi, lahko vplivamo na endotelijsko funkcijo žil. Sprostitvena odzivnost se v tem primeru poslabša. Če poleg aterogene diete dodajamo še antiaterogene učinkovine kot sta atorvastatin in valsartan, le-te žilno funkcijo ohranijo ali celo izboljšajo, kar smo dokazali z odzivnostjo na acetilholin. V nadaljnem raziskovalnem delu bi bilo potrebno ovrednotiti odzivnost endotelija žil še z drugimi vazorelaksatorji kot sta bradikinin ali snov P, saj sta neodvisna od delovanja na gladke mišične celice, medtem ko acetilholin deluje na endotelij in gladke mišične celice, ki se nanj nasprotno odzivata.

Potrdili smo tudi, da je pripravljena aterogena dieta povzročila začetni pojav aterogeneze, saj so bile v lumnu abdominalne aorte številne maščobne lehe in blage aterosklerotične spremembe na karotidnih arterijah in razcepišču aortnega loka. Pri skupinah, ki so dobivale tudi atorvastatin in valsartan, je bil odstotek leh glede na površino lumna aorte veliko manjši, prav tako je bilo manj histoloških sprememb, kar nakazuje na zaščitno delovanje omenjenih učinkovin. Atorvastatin zmanjša sintezo holesterola in vnetnih reakcij v stenah žil, valsartan pa zniža krvni tlak ter zmanjša prenos oksidiranega LDL v intimo. Z omenjenimi učinki prispevata k manjši endotelijski disfunkciji, kar smo dokazali tudi v pričujoči raziskavi. Nismo pa potrdili hipoteze, da ima kombinacija učinkovin močnejše antiaterogeno delovanje, saj smo dobili podobne rezultate ob uporabi obeh ali pa smo ene učinkovine.

Z nadaljnimi raziskavami bi bilo smiselno ovrednotiti zaščitno funkcijo zaviralcev ACE, saj po navedbah nekaterih avtorjev prav tako zmanjšajo obseg ateroskleroznih procesov z zmanjšanim pretvarjanjem neaktivnega angiotenzina I v aktivni angiotenzin II, ki ima močno proaterogeno delovanje. Prav tako bi lahko izvedli dodatne posege za indukcijo

aterogenih sprememb, s katerimi bi lažje ugotovili, katera učinkovina bolj preprečuje nastanek ateroskleroznih sprememb.

7 LITERATURA

1. Veillard NR, Mach F: Statins: the new aspirin?. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002; 59, 11: 1771-1786.
2. Jain MK, Ridker PM: Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005; 4, 12: 977-987.
3. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Arnold JMO, Wun CC, Davis BR, Braunwald E: The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patient with average cholesterol levels. *The New England Journal of Medicine* 1996; 335, 14: 1001-1009.
4. Junqueira LCU, C.J.: *Basic Histology: Text And Atlas*, Lange Medical Books McGraw-Hill, New York, 2003: 215-231.
5. Thyberg J: Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *Int Rev Cytol* 1996; 169: 183-265.
6. Berne R, L.M.: *Smooth Muscle Physiology*, Human Physiology, Mosby, St. Louis, 2004: 252-262.
7. Kališnik M: *Obtočila, Oris histologije z embriologijo*, DZS, Ljubljana, 2003: 220-224.
8. Žiberna L: Vpliv diazepam na odzivnost izolirane podganje aorte. Diplomsko delo 2007.
9. Rang HP, et al.: *The Vascular System, Pharmacology*, D.M. Rang HP, Ritter JM, Moore PK, Editor., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003: 285-305.
10. Dhein S, et al.: Characterization of a peptide endothelium-derived constricting factor EDCF. *Pharmacol Res* 1997; 35: 43-50.
11. de Wit C and Wolfe SE: EDHF and gap junctions: important regulators of vascular tone within the microcirculation. *Curr Pharm Biotechnol* 2007; 8: 11-25.
12. Yanga Q, Yima AP, and He GW: The significance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human circulation. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5: 85-92.
13. Vanhoutte PM: Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J* 2003; 67: 572-575.
14. Luscher TF and Noll G: The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118: 81-90.
15. Kobilka B: Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15: 87-114.
16. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL: *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, McGraw-Hill, New York, 2006: 184-185, 643-649.
17. Paredes P: Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol* 2002; 21: 109-116.
18. Celermajer DS, et al.: Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1468-1474.
19. Haller H: Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium, in *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities*, B. GVR and S. CJ, Editors., Schattauer, Stuttgart, 1997: 273-286.
20. Plankl M: Vpliv atorvastatina na sintezo citokinov vnetnega in specifičnega imunskega odziva v kulturah humanih mononuklearnih celic iz venske krvi. Diplomsko delo 2009: 4-5.

21. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Ateroskleroza – dejavniki tveganja in zapleti. Medicinski mesečnik 2007; 3 (7/8): 235-240.
22. Hansson GK, Libby P: The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews, Immunology* 2006; 6, 7: 508-519.
23. Poredš P: Pomen in vloga vaskularne medicine. *Zdravniški vestnik* 2008; 77: 151–7.
24. Berkow R, Beers MH, Fletcher AJ: Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000: 137-141.
25. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G: Preprečevanje in zdravljenje ateroskleroze. Medicinski mesečnik 2007; 3 (9): 293-299.
26. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Atoris, www.zdravila.net; zadnja revizija 2009.
27. British Pharmacopoeia, London, The Stationary Office, 2003.
28. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Diovan, www.zdravila.net; zadnja revizija 2010.
29. Slovensko zdravniško društvo, Sekcija za arterijsko hipertenzijo: Zbornik, IX. strokovni sestanek sekcije za arterijsko hipertenzijo. 2000; IX: 45-49.
30. Steven G. Chrysant MD, PhD, George S. Chrysant MD: The Pleiotropic Effects of Angiotensin Receptor Blockers. *The Journal of Clinical Hypertension* 2006; 8: 261-268.
31. Fernandez ML, Volek JS: Guinea pigs: A suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutrition & Metabolism* 2006; 3:17.
32. Lin ECK, Fernandez ML, McNamara DJ: Dietary fat type and cholesterol quantity interact to affect cholesterol metabolism in guinea pigs. *The Journal of Nutrition* 1992; 122: 2019-2029.
33. Leite JO, Vaishnav U, Puglisi M, Fraser H, Trias J and Fernandez ML: A-002 (Varespladib), a phospholipase A2 inhibitor, reduces atherosclerosis in guinea pigs. *BMC Cardiovascular Disorders* 2009; 9:7.
34. Torres-Gonzalez M, Volek JS, Sharmanb M, Contoisc JH, Fernandez ML: Dietary carbohydrate and cholesterol influence the number of particles and distributions of lipoprotein subfractions in guinea pigs. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2006; 17: 773-779.
35. Zern TL, West KL, Fernandez ML: Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs: *The Journal of Nutrition* 2003; 133(7): 2268-72.
36. Fernandez ML, Vergara-Jimenez M, Conde K, Behr T and Abdel-Fattah G: Regulation of apolipoprotein B-containing lipoproteins by dietary soluble fiber in guinea pigs. *American Journal of Clinical Nutrition* 1997; 65: 814-822.
37. Fernandez ML, Sun DM, Tosca MA and McNamara DJ: Citrus pectin and cholesterol interact to regulate hepatic cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism: a dose-response study in guinea pigs. *American Journal of Clinical Nutrition* 1994; 59: 869-878.
38. Fernandez ML: Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum, and psyllium. *The Journal of Lipid Research* 1995; 36: 2394-2404.
39. Vergara-Jimenez M, Conde K, Erickson SK and Fernandez ML: Hypolipidemic mechanisms of pectin and psyllium in guinea pigs fed high fat-sucrose diets:

- alterations on hepatic cholesterol metabolism. *The Journal of Lipid Research* 1998; 39: 1455-1465.
40. Schwemmer M, Sommer O, Bassenge E: Blockade of angiotensin signaling improves myocardial function in hypercholesterolemia independent of changes in eicosanoid release. *Cardiovasc Drugs and Therapy* 2000; 14: 317-27.
41. Mangathayaru K, Kuruvilla S, Balakrishna K, Venkhatesh J: Modulatory effect of Inula racemosa Hook. f. (Asteraceae) on experimental atherosclerosis in guinea-pigs. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2009; 61: 1111-8.
42. Andrade CR, Correa AFM, Oliveira AM: Aging and total stenosis triggers differential responses of carotid and basilar arteries to endothelin-1 and phenylephrine. *J Smooth Muscle Res* 2009; 45 (6): 307-321.
43. Thompson LP, Pinkas G, Weiner CP: 17 β -Estradiol Replacement Increases Nitric Oxide-Mediated Vasodilation of Guinea Pig Coronary Microcirculation. *Circulation* 2000; 102: 445-451.
44. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407, 9: 233-241.
45. Lunder M, Žiberna L, Drevenšek G, Šabovič M: Zaščitni pleiotropni učinki statinov. *Zdravniški vestnik* 2010; 79: 39-49.
46. Sawamura T: LOX-1, a lectin-like oxidized LDL receptor identified from endothelial cells, in endothelial dysfunction. *International Congress Series* 2004; 1262: 531-534.
47. Hughes, G.C., et al. Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1689-1701.
48. Budihna VM: Delo z izoliranimi organi, Farmakološke metode. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo. internetna stran:
<http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/1c5b38fd2c21a78e9dd227609452ddb6.pdf>.
49. Hauser DS, Stade M, Schmidt A, Hanauer G: Cardiovascular parameters in anaesthetized guinea pigs: a safety pharmacology screening model. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2005; 52, 1: 106-114.
50. Ratz, P.H., et al. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: 769-783.
51. Carrier GO, White RE: Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 682-7.
52. Kriegstein J, et al.:Damage of Guinea Pig Heart and Arteries by a Trioleate-Enriched Diet and of Cultured Cardiomyocytes by Oleic Acid. *PloS ONE* 2010; 5(3): e9561
53. Cor A, Pajer Z, Petrovič D, Štiblar-Martinčič D, Vraspir-Porenta O, Zorc M, Zorc-Pleskovič R: Histologija z embriologijo, navodila za vaje, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo, Ljubljana, 2003: 7-10.