proLékaře.cz | 12.7.2025

Fellowship ČSAT: Leiden Academic Centre for Drug Research – Leiden University

27. 8. 2017 až 28. 2. 2018, Leiden, Nizozemsko

Soňa Čejková[1,2]
[1]Centrum experimentální medicíny, IKEM, Praha
[2]LACDR, Leiden University, Nizozemsko

✉ **Mgr. Soňa Čejková** | cejs@ikem| www.ikem.cz

Doručeno do redakce/Doručené do redakcie/Received 20. 6. 2018

V termínu 27. 8. 2017 až 28. 2. 2018 proběhla má stáž na výzkumném pracovišti prof. Mirandy Van Eck na oddělení Biotherapeutics – Leiden Academic Centre for Drug Research – Leiden University, Nizozemsko. Zde jsem se byla zapojena do řešení širšího projektu – Atherosclerosis Regression: A challenging goal with the macrophage as therapeutic target. Tento projekt se zabývá možnostmi navození regrese aterosklerózy s perspektivou potencionální léčby pacientů s již rozvinutou formou aterosklerózy.

Byť byla možnost regrese aterosklerózy zamítána a považována za nepravděpodobnou zejména u pokročilých lézí s nekrotickým jádrem, velkým množstvím vaziva a kalcifikace [13], v posledních 20 letech studie provedené jak v rámci klinických studií, tak na zvířecích modelech (ApoE nebo LDL- recepror knock outované myši) přinesly důkazy o reverzibilitě aterosklerotického plaku [4]. Dnes je koncept regrese aterosklerózy namnoze přijímán, byť jeho základní mechanizmy a případná užitečnost v klinické praxi, vyžadují další výzkum.

Tento projekt je zaměřen zejména na úlohu makrofágů, které hrají významnou roli jak v rozvoji časných, tak i v pokročilých aterosklerotických lézích. Během progrese aterosklerózy monocyty migrují do cévní stěny v důsledku působení chemokinů produkovaných zejména buňkami již diferencovanými v lézích [5–6]. Monocyty se následně diferencují na makrofágy a pohlcují lipidové částice, což může vést až k formaci tzv. pěnových buněk [7–10]. Tyto makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny a řadu matrix-degradujících enzymů, vedoucích k tenčení vazivové čepičky (fibrous cap) a tkáňové faktory vedoucí k ruptuře plaku, formaci trombu nebo až ucpání cévy [11–17]. Na druhou stranu makrofágy disponují i schopností efluxu cholesterolu, což vede k odstraňování nadbytečného obsahu lipidů, a touto cestou případně až k regresi aterosklerotického plaku [18]. Není však známo, jsou-li pěnové buňky schopny se transformovat na makrofága nebo v dendritické buňky schopné migrace a následně migrovat z léze zpět do oběhu. Je možné, že pěnové buňky, zejména v případě pokročilého aterosklerotického plátu, již potřebují alternativní přístup zahrnující např. indukci programované buněčné smrti (apoptózy). Jiným přístupem k indukci regrese aterosklerózy může být snížení infiltrace nebo diferenciace od prozánětlivých k protizánětlivým makrofágům. V rámci tohoto projektu se studují mechanizmy nezbytné pro zahájení regrese aterosklerotické léze se zaměřením na makrofágy.

V rámci své stáže jsem pracovala zejména na projektech doktorandky Olgy Snip. Na 3 zvířecích modelech byl analyzován (1) vliv cyklodextrinu na regresi aterosklerózy u ApoE KO myší, (2) vliv ApoA1 mimetik (CS6213) u myší po transplantaci kostní dřeně od ApoA1 KO myší do ApoE KO příjemců a (3) znovuzavedení apolipoproteinu E prostřednictvím adeno-asociovaného viru s dalším podáváním CCR2 antagonisty (15a) pro inhibici influxu nových makrofágů. Pro tyto projekty jsem na základě literární rešerše navrhla a také zavedla 3 panely pro analýzu průtokovou cytometrií – panel zaměřený na (a) krvinky bílé řady obecně, (b) makrofágy a (c) monocyty.

(a) Panel je zaměřený na lymfocyty obecně. Z tohoto panelu jsme získali informace o zastoupení B-buněk ($CD19^+$), T-buněk ($CD4^+$ a $CD8^+$ T-buňky), monocytů (Ly6C/Ly6G), makrofágů ($CD11b^+F4/80^+$) a jejich polarizaci ($CD62L^+CD44^+$, $CD62L^-CD44^+$) v analyzovaných tkáních. (b) Makrofágový panel se zaměřoval na analýzu polarizace makrofágů, což bylo i naším hlavním cílem. Základní znakem makrofágů byla double pozitivita buněk pro F4/80 a CD11b a zároveň negativita CD161 (marker pro NK buňky) a Ly6G (znak neutrofilních granulocytů). Polarizace takto definovaných makrofágů byla dále hodnocena na základě exprese prozánětlivých (CD38, CCR7, MHC II) a protizánětlivých (CD206, CD62L) markerů. (c) Panel pro analýzu monocytů a slezinných makrofágů včetně gateovací strategie byl designován na základě publikace Rose et al [19]. Tento panel byl využit zejména kvůli faktu, že komerčně dostupné protilátky proti F4/80 značí slezinné makrofágy velmi slabě [19]. Po očištění od nemonocytárních populací monocyty/makrofágy ($Ly6G^-Ly6C^{low\text{-}neg}$/$Ly6G^-Ly6C^{Hi}$) byly dále analyzovány na základě exprese CCR2 a CD62L proteinů podílející se zejména na extravazaci monocytů z oběhu (jedná se o převážně protizánětlivé znaky). Kromě těchto panelů jsme ve vybraných studiích kvantifikovali množství lipidů v makrofázích respektive pěnových buňkách. K tomu bylo využito barvivo Bodipy (fluorescenčně značí neutrální lipidy kumulované v lipidových kapénkách) v kombinaci se značením proti makrofágům. Prostřednictvím těchto komplexních panelů jsme získali informace o řadě typů leukocytů (monocyty/makrofágy, T-buňky, B-buňky, NK-buňky, eozinofilní a neutrofilní granulocyty) včetně jejich diferenciace v závislosti na typu použité léčby v krvi, slezině a peritoneální dutině, případně i v srdečních lymfatických uzlinách a aortě.

Největší vliv na počty a polarizaci makrofágů v analyzovaných tkáních měla právě poslední forma terapie adenovirem v kombinaci s CCR2-antagonistou. Na základě publikovaných dat CCR2-antagonista vede ke snížení infiltrace makrofágy [20], což se potvrdilo. A léčba v kombinaci s adenovirem vedla k významnému poklesu počtu makrofágů a polarizaci

proLékaře.cz | 12.7.2025

spíše protizánětlivým směrem. Navíc tyto makrofágy měly významně nižší obsah lipidů ve srovnání s negativní kontrolou.

Výsledky z průtokové cytometrie ostatních 2 zvířecích modelů nevedly v námi sledovaných parametrech k tak zásadním změnám. V rámci mé stáže jsme bohužel nestihli provést další analýzy, jako jsou genové exprese, změny v zastoupení lipidů v krevní plazmě a histologické barvení a hodnocení oblasti kořene aorty a oblouku aorty.

Celkově hodnotím svou stáž na pracovišti v Leidenu jako zdařilou a velice přínosnou pro svůj další profesní růst. Je přínosné nahlédnout do fungování zahraniční laboratoře i vzdělávacího systému, v řadě skutečností odlišného od našeho. Stážovala jsem ve fakultní laboratoři, jež zajišťuje z velké části praxe pro studenty. Bakalářští studenti musí závěrem studia splnit několik kratších praxí (4 týdny) zahrnujících vyřešení malého projektu na několika různých pracovištích. To bych přirovnala k našim mírně rozšířeným praktickým cvičením s rozšířeným závěrečným protokolem. Magisterští studenti mají 9 měsíců na naměření experimentální části a sepsání výsledků ve formě diplomové práce. Obě úrovně pregraduálních studentů jsou většinou vedeny doktorandy. Magisterští studenti řeší samostatně ucelenou část projektu, která bývá součástí projektu supervizora, což urychluje řešení a vyhodnocování experimentů. Jedná se však o fakultní pracoviště s převážně pregraduálními studenty, kteří se teprve učí zacházet s laboratorním vybavením, což má často za následek nefunkčnost nebo nepřesnost vybavení, případně neřád v jeho umístění. Ač se kvalita vybavení a témat výzkumu na „západě“ neliší od našich, bylo by pro nás přínosné si osvojit jejich schopnost a chuť prezentovat a diskutovat jakékoli dílčí výsledky a ideje.

Moje stáž byla podpořena programem Erasmus, ale chtěla bych poděkovat za fellowship udělený ČSAT, který mi nesmírně pomohl v při absolvování celé stáže.

Literatura dostupná na www.atheroreview.eu

---

3. dubrovnická lipidová škola: Příčiny sekundární dyslipidemie pod lupou

11.–14. 10. 2018, Dubrovník, Chorvatsko

Ľubica Cibičková
III. interní klinika – nefrologická, revmatologická a endokrinologická LF UP a FN Olomouc

✉ **MUDr. Ľubica Cibičková, Ph.D.** | cibickova@seznam.cz | www.fnol.cz

Doručeno do redakce/Doručené do redakcie/Received 12. 12. 2018

Ve dnech 11.–14. října 2018 jsem měla díky podpoře České společnosti pro aterosklerózu možnost zúčastnit se 3. lipidové školy v Dubrovníku, která se konala pod záštitou European Atherosclerosis Society a Chorvatské společnosti pro aterosklerózu. Program se věnoval široké problematice dyslipidemií od etiopatogeneze aterosklerózy, vztahu dyslipidemie až po jednotlivá civilizační onemocnění, přes familiární hypercholesterolemii až po možnosti terapie dyslipidemie dietou, statiny nebo inhibitory PCSK9. A poselství tohoto ročníku lze shrnout do konstatování: „**Na příčiny sekundárních dyslipidemií, kterých je celá řada, je potřeba vždy pamatovat, aby bylo možné léčit onemocnění kauzálně.**“

Pozor na hypotyreózu...

V přednášce o sekundárních dyslipidemiích endokrinoložka dr. Sandi Tešanovic z Dubrovníku prezentovala kazuistiku 39leté pacientky, která byla odeslána s dosud nevýznamnou osobní anamnézou k došetření hypercholesterolemie. Fyzikální nález byl bez pozoruhodností. Pacientka si stěžovala na nepravidelný menstruační cyklus únavu a ztrátu schopnosti koncentrace. Laboratorními odběry byla kromě hypercholesterolemie nově zjištěna také autoimunitní hypotyreóza (TSH 8,7 mIU/l) s pozitivitou protilátek proti tyreoglobulinu a tyreoperoxidáze. Po zahájení substituce levotyroxinem v dávce 50 µg/den došlo k normalizaci lipidogramu. Kazuistika podtrhuje důležitost vyloučení hypotyreózy jako možné příčiny sekundární dyslipidemie před zahájením samotné terapie hypercholesterolemie.

...a chronická onemocnění ledvin a jater

Z chronických onemocnění ledvin bývá dyslipidemie typicky přítomna při nefrotickém syndromu. U těchto pacientů dochází při normální clearance kreatininu ke zvýšení koncentrací LDL-cholesterolu v důsledku zvýšené tvorby VLDL-částic a také přímo zvýšené produkce LDL-cholesterolu játry. To je dáno tím, že snížený onkotický tlak stimuluje transkripci genů pro apolipoprotein B. Proto závažnost hyperlipidemie inverzně koreluje s poklesem onkotického tlaku, a tedy sérového albuminu. TAG nebývají většinou zvýšeny a HDL-cholesterol může být v normě anebo snížený. Pokud dojde k vyléčení nefrotického syndromu, upraví se také dyslipidemie. U chronické renální insuficience (Chronic Kidney Disaese – CKD) jsou obvyklé poruchy lipidového metabolizmu ve všech stadiích a lipidový profil je závislý na úrovni glomerulární filtrace a závažnosti proteinurie. Při peritoneální dialýze dochází k absorpci glukózy z dialyzačního roztoku peritoneem, což vede k vzestupu TAG a apolipoproteinu B, a proto je LDL-cholesterol také zvýšen.

Z onemocnění jater vedoucích k sekundární dyslipidemii byly jmenovány cholestáza, hepatocelulární poškození a cholelitiáza.