

87. kongres Evropské společnosti pro aterosklerózu

### **Genetický přístup a ovlivnění imunity jako budoucnost léčby aterosklerózy?**

**Na konci května uspořádala Evropská společnost pro aterosklerózu (EAS) svůj v pořadí už 87. kongres, tentokrát v Maastrichtu. Volba nizozemského univerzitního města nebyla náhodná. Výzkumné týmy z univerzit v Maastrichtu, Utrechtu, Amsterdamu nebo Leidenu měly na kongresu možnost ukázat, proč je nizozemský výzkum na poli aterosklerózy mezi evropskou špičkou.**

Do Nizozemska, konkrétně na univerzitu v Amsterdamu, tak putovala například jedna z cen pro mladé výzkumníky (Young Investigator Award). Obdržel ji Tom Seikens za základní výzkum na poli imunitních checkpointů, jejichž ovlivnění by v budoucnu mohlo hrát významnou roli v protizánětlivé terapii aterosklerózy. Druhá cena v oblasti klinického výzkumu putovala na Imperial College London za doktorem Antonio J. Vallejo-Vazem, který se zabývá především epidemiologickými studiemi a analýzou klinických studií. Efektivní podpora doktorandských studentů v Nizozemsku se pak také odrazila na jejich hojném zastoupení v sekci Science at Glance (podrobněji dále). Právě podpora mladých vědců je i jedním z cílů EAS. Kromě ceny pro mladé výzkumníky EAS poskytuje ještě Young Investigator Fellowships. Dalším z klíčových témat Společnosti, která při zahájení kongresu zdůraznila prezidentka EAS, profesorka Lale Tokgözoğlu, je identifikace a léčba pacientů s familiární hyperscholesterolemií (FH). Právě Nizozemsko už v roce 1994 zahájilo celonárodní screeningový program identifikace pacientů s FH a díky němu dnes eviduje vysoký počet pacientů. EAS pod hlavičkou The EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC) sdružuje registry 68 zemí. Jak uvedla prof. Tokgözoğlu, v centrálním registru je aktuálně téměř 60 tisíc pacientů s FH. Česká republika se do vyhledávání zapojila už v roce 1998 s projektem MedPed, jehož databáze čítá více než 7900 pacientů.

### **Projekt v sedmi minutách**

Kongresu EAS v Maastrichtu se účastnilo téměř 2000 lékařů a vědeckých pracovníků ze 75 zemí, přičemž počet českých zástupců dosáhl skoro 80. V rámci programu bylo možné zúčastnit se několika sekcí. Už zmíněná Science at Glance umožňuje zejména mladým vědcům během sedmi minut popsat svůj výzkumný projekt a zároveň si vyzkoušet profesionální prezentaci vlastních výsledků. V tomto roce byly v sekci hojně zastoupené projekty zabývající se charakteristikou nových knock-out modelů a molekul ve výzkumu aterosklerózy.

Mnoho pozornosti bylo věnováno také novým výzkumným metodám jako například multispektrálnímu imunofluorescenčnímu zobrazování, které umožňuje sledovat i 16 markerů najednou na histologickém řezu. Týmy z univerzit v Utrechtu, Leidenu a Amsterdamu se podílí na studii, která zpracovává karotické plaky pomocí single cell RNA sekvenování. Single cell RNA sekvenování umožňuje otestovat

expresi molekul v jednotlivých buňkách izolovaných z aterosklerotického plaku a přesně tak odlišit různé buněčné populace. Makrofágy jsou klíčovým buněčným typem v rozvoji aterosklerózy. Jak ukazují další prezentované výsledky v rámci sekce, v poslední době se dostává více pozornosti i dalším buněčným typům v aterosklerotických placích. Například hyperlipidemie vede u myši k zesílení aktivace Th1 a Th17 lymfocytů a vyšší produkci prozánětlivých cytokinů. Funkce neutrofilů je zřejmě ovlivněna jak LDL, tak podáváním PCSK9 pacientům po akutním infarktu myokardu. Podávání HDL u myši pak může působit na hladké svalové buňky v cévní stěně a omezit tak v rané fázi vznik mikrokalcifikací. Terapie zaměřená na zpomalení vzniku mikrokalcifikací by mohla pomoci zejména pacientům s chronickým onemocněním ledvin, které vede k akceleraci aterosklerózy. Jednou z příčin by mohla být i snížená schopnost HDL zprostředkovat reverzní transport cholesterolu u těchto pacientů.

### **Imunoterapie aterosklerózy**

Kongresová dopoledne a odpoledne byla věnována workshopům. Podobně jako sekce Science at a Glance, se workshop Cellular crosstalk and plaque stability věnoval buněčným populacím a molekulám hrajícím roli v rozvoji aterosklerózy. Workshop Lipoproteins and Immunity byl zaměřen na vliv lipoproteinů na buněčné populace ve vývoji aterosklerózy. Elena Galkina shrnula práci svého týmu zaměřenou na výzkum B lymfocytů. B lymfocyty jsou podobně jako makrofágy schopné vychytávat modifikované LDL částice. Dochází k tomu pravděpodobně prostřednictvím scavengerového receptoru CD36. To v důsledku ztěžuje jejich aktivaci a produkci protilátek. Proliferaci už zmíněných prozánětlivých Th1 lymfocytů pak (alespoň u myši) mohou indukovat žírné buňky, jak ukazuje výzkum týmu Ilze Botové. Žírné buňky, spojované jinak především s alergickými reakcemi, se tak mohou podílet na destabilizaci plátu. Naopak imunomodulační T lymfocyty mohou hrát pozitivní roli ve stabilizaci plátu. V současnosti se dokonce uvažuje o použití *in vitro* indukovaných regulačních T lymfocytů v terapii aterosklerózy.

Další možností terapie aterosklerózy by v budoucnu mohlo být ovlivnění imunitních checkpointů, o kterých hovořila profesorka Esther Lutgensová, a z jejíž laboratoře pochází i už zmíněná oceněná práce doktora Seikense. Imunitní checkpointy regulují činnost imunitního systému. Jedná se o signály, které koinhibují nebo kostimulují imunitní odpověď. V současnosti je horkým tématem využití inhibitorů imunitních checkpointů v léčbě zhoubných nádorů (např. inhibitory cílené na CTLA-4 a PD-1, které podporují odpověď T lymfocytů na buňky nádoru). Tým profesorky Lutgensové se zabývá možným využitím těchto inhibitorů v léčbě aterosklerózy. Blokují interakci T lymfocytů s monocyty a makrofágy, která vede k jejich aktivaci. Zacílení inhibitoru na monocyty a makrofágy je dosaženo jeho navázáním na HDL.

Workshop Cellular metabolism in atherosclerosis and diabetes se pak zaměřil na konkrétní buněčné mechanismy a metabolické dráhy, které mohou být důležité

v patologii aterosklerózy. Například výzkum profesora Martina Bennetta naznačuje, že zvýšená produkce reaktivních kyslíkových radikálů není pro rozvoj aterosklerotických plaků nezbytná. Pro stabilitu plaku a zpomalení stárnutí cévní stěny (tzv. arterial stiffening) je důležitá dobrá funkce mitochondrií i jejich dostatečné množství. Na funkci mitochondrií se zaměřil i tým Patricka A. J. Schrauwena, i když z trochu nezvyklého pohledu. Sledovali vliv cirkadiálních rytmů na mitochondriální metabolismus a změny rytmu u prediabetických pacientů.

Na závěr nelze opominout dvě nejprestižnější přednášky kongresu – Anitschkow Lecture a Keynote Lecture. V letošním roce obdržela Anitschkow Prize za přínos ve výzkumu aterosklerózy Helen Hobbsová, která se přímo podílela na objasnění role PCSK9 v homeostáze cholesterolu. V současnosti se věnuje výzkumu jaterní steatózy a hledání rizikových genetických variant. Jak zmínil Paul Ridker ve své Keynote Lecture, právě genetický přístup a s ním související koncept personalizované medicíny by mohl být budoucností v léčbě aterosklerózy. Výsledky studie CANTOS a jiných pak naznačují, že velký význam má i ovlivnění imunitního systému, přičemž některé mechanismy jsou společné pro aterosklerózu i nádory.

Mgr. Hana Kubátová, Centrum experimentální medicíny, Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, IKEM Praha

### **Postřehy dalších účastnic kongresu EAS, které obdržely cestovní grant České společnosti pro aterosklerózu:**

V oblasti základního výzkumu získal Young investigator awards Tom Seijkens z výzkumné skupiny Esther Lutgens z UMC Amsterdam, a to za publikaci “Targeting CD40 induced TRAF6 signalling in macrophages reduces atherosclerosis” publikované v Journal of the American College of Cardiology (JACC). Podařilo se jim identifikovat a charakterizovat skupinu malých molekulárních inhibitorů tzv. imunologických checkpointů. Konkrétně dokázali inhibovat CD40-TRAF6 interakce, což vedlo k redukcí již existujících aterosklerotických plátů prostřednictvím inhibice extravazace leukocytů z krevního oběhu do arteriální stěny stimulované chemokiny a zároveň došlo k významnému poklesu produkce prozánětlivých cytokinů makrofágy. Na rozdíl od blokace CD40/CD40 interakce tyto molekuly nevedou k dlouhodobým systémovým imunologickým komplikacím, které jsou neslučitelné s klinickou aplikovatelností. Za klinický výzkum byl oceněn Antonio J. Vallejo-Vaz z Imperial Centre for Cardiovascular Disease Prevention Imperial College London za publikaci “Triglyceride-Rich Lipoprotein Cholesterol and Risk of Cardiovascular Events Among Patients Receiving Statin Therapy in the TNT Trial” publikované v Circulation. V této studii potvrdili důležitost zvýšených hladin cholesterolu v lipoproteinech bohatých na triglyceridy (chylomikrony, VLDL, IDL, TRL-C) jako rizikového markeru kardiovaskulárních chorob, ale i potencionálního cíle terapeutických intervencí. Dlouhodobé podávání atorvastatinu (80 mg/den) snížilo koncentrace TRL-C, ale i četnost akutních komplikací kardiovaskulárních chorob.

Anitschkowova přednáška Helen Hobbsové byla velice inspirující. Její výzkum se zaměřuje na genetické determinanty plazmatických lipidů, které vedou k rozvoji jak kardiovaskulárních chorob, tak i významně přispívají k steatóze jater a rozvoji NAFLD. Již na začátku kariery se jí podařilo objevit mutaci v LDLRAP1, která je inaktivní v případě autosomálně recesivní hypercholesterolemie a mutace v ABCG5 a ABCG8, které jsou kruciální v případě sitosterolemie. Nicméně její nejzásadnější objev byla mutace PCSK9, která vedla ke snížení koncentrace LDL-C a protekci proti kardiovaskulárním chorobám. Následně se podílela na vývoji inhibitorů PCSK9. Ve své druhé přednášce se Hobbsová věnovala polymorfismům v enzymech a transportérech zajišťujících metabolismus lipidů a lipoproteinů ve vztahu k steatóze jater. V tomto příspěvku vyzdvihla významnou mutaci PNPLA3(148M), která ve spojení se zvýšenou konzumací sacharózy vedla k zásadnímu snížení lipolýzy v játrech, a tím i snížení rozvoje steatózy. Obdobný důsledek byl nalezen v případě špatné mutace v genu pro TM6SF2.

Arnold Von Eckardstein uvedl, že hladiny ApoB mohou být značně zavádějící, protože molekuly mohou obsahovat vysoce variabilní množství cholesterolu. Zdá se tedy, že lepším ukazatelem aterosklerózy by mohla být koncentrace non-HDL-C. Ač je to již známá informace, určitě hodnotím kladně, že Raul Santos věnoval svůj příspěvek zdůraznění, že HDL nemá pouze protektivní úlohu v rozvoji kardiovaskulárních chorob. Je-li jeho koncentrace významně zvýšená (dvojnásobná a vícenásobná), zhoršuje nejen riziko a progresi aterosklerózy, ale zvyšuje i riziko nádorů. Borge G. Nordestgaard následně vyzdvihl důležitost monitorování remnantních částic jako zásadního markeru nejen pro srdeční příhody, jako je tomu v případě LDL, ale i mozkových příhod.

Pro mě bližšími tématy jsou imunitní aspekty aterosklerózy. Paul Ridker ve své souhrnné přednášce porovnával rizika dlouhodobého nízkého zánětu s koncentracemi tradičně sledovaného LDL. Canakinumab a monoklonální protilátky inhibující IL-1 $\beta$  snižují riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob a zároveň mohou dokonce i snižovat incidenci vzniku malignit. U kuřáků dokonce studie prokázala nižší četnost zhoubných nádorů, než u kontrolní skupiny. Pravděpodobně blokace IL-1 $\beta$  v tumoru brání lokální imunosupresi, ke které při karcinogenezi dochází. Je tedy potřeba zorzlišovat, zda se jedná o léčbu anti-inflamační, nebo imunosupresi.

Velmi mne zaujaly příspěvky kolegů z Leidenské univerzity, zejména ze skupiny Johana Kuipera. Poutavé výsledky prezentovala Janine Van Duijn. Prokázali, že zvýšená exprese CD39 na CD8+ buňkách snižuje produkci prozánětlivých cytokinů (IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ ) jak u myši, tak i u lidí. Velmi zajímavé je téma možnosti použití vakcinace pro prevenci aterosklerózy, nicméně tato problematika ještě bude potřebovat hlubší výzkum.

Mgr. Soňa Čejková, IKEM Praha

Prof. Helen Hobbs zdůraznila, že jak ateroskleróza, tak NAFLD jsou spojené s patofyziologickým ukládáním lipidů – ateroskleróza s ukládáním cholesterolu v cévních stěnách a NAFLD s akumulací triacylglycerolu (TG) v játrech. Pro studium genetických variant, které by mohly být zodpovědné za vyšší koncentraci cholesterolu, a tedy za riziko rozvoje aterosklerózy, byla využita hypotéza vzácných variant. Ta říká, že vzácné genetické varianty s velkým efektem se budou vyskytovat u osob, které nemají běžný fenotyp (tj. nachází se v extrémech Gaussovy křivky). Bylo tedy potřeba v populaci identifikovat jedince se vzácným fenotypem - velmi nízkým a velmi vysokým KV rizikem, u nichž pak byly hledány zodpovědné genetické varianty. Tento postup se podařilo realizovat v Dallas Heart Study 2002, které se zúčastnilo 3557 osob z různých etnik. Výzkum pak byl ještě dále rozšířen spoluprací po celém světě. Studium vzácných genetických variant s velkým efektem (v obecné populaci) byla objevena klíčová úloha genů jako PCSK9, NPC1L1, ANGPTL4, ANGPTL3 a ANGPTL8, což vedlo také k novým terapeutickým přístupům s velkým dopadem na zdraví populace. Stejný postup byl využit ke studiu i druhého onemocnění spojeného s patologickým ukládáním lipidů – NAFLD. Tento termín zastřešuje celou škálu potíží – od samotného zvýšeného obsahu tuku v játrech (steatóze) přes steatohepatitidu, která může vést až k cirhóze a ta ve vzácných případech k hepatocelulárnímu karcinomu. Ukládání tuku v játrech je ovlivněno životosprávou (obezita, inzulinová resistance). Přesto se liší procento osob se steatózou v různých etnických skupinách. Tento fakt vyprovokoval zájem o studium genetických predispozic k rozvoji jaterní steatózy. Během posledních 11 let spolupracovníci prof. Hobbsové identifikovali varianty dvou genů zodpovědných za zvýšenou akumulaci tuku v játrech – PNPLA3 (Romeo S, *Nat Genet*, 2008) a TM6SF2 (Kozlitina J, *Nat Genet*, 2014); a variantu genu HSD17B13 spojenou s nižším rizikem progresu steatózy do steatohepatitidy (Abul-Husn NS, *NEJM*, 2018 a Kozlina J, *NEJM*, 2019).

Na svou nedělní přednášku navázala v pondělí ráno v plenární sekci prof. Hobbsová přednáškou o PNPLA3. Nesynonymní varianta (I148M) patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) je nejsilnějším genetickým rizikovým faktorem pro NAFLD. PNPLA3 se spolu s comparative gene identification 58 (CGI-58) váže na lipidové kapénky v hepatocytech in vitro a vykazuje TG hydrolázovou aktivitu, kterou významně snižuje substituce I148M. Samotné snížení TG hydrolázové aktivity PNPLA3 ale není příčinnou steatózy, protože *Pnpla3<sup>-/-</sup>* myši nemají zvýšený obsah tuku v játrech. Naopak, varianta I148M také chrání protein PNPLA3 proti ubiquitinaci, a tak snižuje degradaci proteinu proteazomovým systémem i autofagií. Protein PNPLA3 (148M) má tendenci se hromadit na lipidových kapénkách v hepatocytech, což snižuje schopnost mobilizace TG z kapének. Jak přesně spolu souvisí PNPLA3, autofagie a metabolismus TG, ještě nebylo vysvětleno. Jedna z možných hypotéz navrhuje, že PNPLA3 (148M) kompetuje s lipázou ATGL (adipose triglyceride lipase) o její koaktivátor CGI-58, a tak snižuje její lipolytickou aktivitu. Jisté je, že právě hromadění PNPLA3 na povrchu tukových

kapének (spíše než snížení hydrolázové aktivity PNPLA3) přímo souvisí se steatózou. A snížení množství proteinu PNPLA3 blokadí PNPLA3 mRNA (RNAi nebo oligonukleotidy) nebo podporou jeho degradace (asociace PNPLA3 s E3 ligázou PROTAC systémem) snižuje steatózu. To by mohlo mít i terapeutické využití u osob exprimujících PNPLA3 (148M).

Z dalšího programu kongresu bych zmínila už jen některé prezentace týkající se tuku v játrech. Dr. Jay Horton se ve své přednášce „Nonalcoholic fatty liver disease and vascular complication“ věnoval terapeutickému přístupu, který snižuje obsah tuku v játrech, ale zároveň zvyšuje plazmatické TG. Inhibicí acetyl- CoA karboxylázy (ACC) se omezí syntéza mastných kyselin (FA) a vznik malonyl-CoA, který brání oxidaci FA. Tato část dráhy tedy snižuje obsah tuku v játrech. Zároveň se ale sníží množství polynenasycených FA, to vede ke zvýšení SREBP-1c, GPAT1 a zvýšené sekreci VLDL z jater, tedy ke zvýšení plazmatických TG (Kim CW, Cell Metab. 2017). Zvýšení plazmatických TG po blokaci ACC by se dalo předcházet inhibicí GPAT1 nebo fenofibráty.

V sekci Science at a Glance ukázal Kay Roumans, že u obézních jedinců koreluje podíl nasycených mastných kyselin (SFA) v játrech s de novo lipogenezí a že vyšší podíl SFA se pojí s nižší jaterní inzulínovou senzitivitou. A Elena Fauste upozornila, že příjem fruktózy u březích potkanů ovlivňuje metabolismu jejich samičích potomků.

Já jsem se zaměřila hlavně na přednášky a prezentace, které se věnovaly vlivům na obsah tuku v játrech- tématu, kterým se zabývám. Sama jsem využila možnost na kongresu prezentovat výsledky naší nedávno publikované práce o rozdílech v bezprostředním vlivu glukózy a fruktózy na obsah tuku v játrech.

Tereza Dusilová