

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

**Imunohistochemická detekce makrofágů v aterosklerotických
plátech arteria brachiocephalica**

Immunohistochemical detection of macrophages in
atherosclerotic lesions brachiocephalic artery

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce:
Hradec Králové, 2013

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD
Sabina Škodová

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

Datum:

Podpis:

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu a trpělivost.“

Abstrakt

Sabina Škodová

Imunohistochemická detekce makrofágů v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica.

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotní laborant

Cíl práce: Cílem této bakalářské práce bylo nastavit imunohistochemické metody pro detekci makrofágů v arteria brachiocephalica apoE/LDLR receptor deficientních myší. Práce se dále zaměřuje na kvantifikaci exprese těchto makrofágů u skupiny myší, které byla podávána standardní dieta a u myší, kterým byla podávána dieta s nízkým obsahem sacharidů a vysokým obsahem proteinů

Metody: Ke studii byly použity samice apoE/LDLR deficientní myši rozdělené do dvou skupin (v každé skupině bylo 6 myší). Jedné skupině byla podávána standardní dieta (kontrolní skupina) a druhé skupině byla podávána dieta s nízkým obsahem sacharidů a vysokým obsahem proteinů (LCHP). Tato dieta byla myším podávána 8 týdnů. Následně byla na řezech arteria brachiocephalica provedena imunohistochemická analýza, využívající ke zviditelnění makrofágů metodiku Immpress s detekčním činidlem diaminobenzidin (DAB). Poté byla provedena biochemická a stereologická analýza.

Výsledky: Biochemická analýza prokázala zvýšení hladin celkového cholesterolu u myší krmených LCHP dietou. Imunohistochemická analýza prokázala přítomnost makrofágů v tunika intima i v tunika media cévy. Stereologická analýza prokázala, že LCHP dieta zvětšuje v arteria brachiocephalica plochu, kde se makrofágy hromadí.

Závěr: U myší krmených LCHP dietou došlo ke zvýšení hladiny celkového cholesterolu v krvi v porovnání s hladinami cholesterolu u myší, které byly krmené standardní dietou. Zároveň stereologická analýza prokázala u těchto myší vyšší přítomnost makrofágů v aterosklerotickém plátu. Tyto výsledky potvrzují proaterogenní a prozánětlivý potenciál LCHP diety.

Abstract

Sabina Škodová

Immunohistochemical detection of macrophages in atherosclerotic lesions brachiocephalic artery.

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical Laboratory Technician

Background: The aim of this bachelor thesis was to set imunohistochemic methods for detection of the macrophages in brachiocephalic artery apoE/LDLR receptor deficient mice. This thesis also deals with quantification of expression macrophages in group of mice which were fed with chow diet and in group of mice which were fed with low carbohydrate high protein diet.

Methods: For this study were used apoE/LDLR deficient female mice which were separated into two groups (in each group were 6 mice). The first group was fed with chow diet (control group) and the second one was fed with low carbohydrate high protein diet (LCHP). This diet was administered to the mice for 8 weeks. After that the immunohistochemical analysis was performed on the cuts of brachiocephalic artery which uses Immpress method with diaminobenzidin (DAB) for better visibility of macrophages. Afterwards was performed biochemical and stereological analysis.

Results: Biochemical analysis showed increased levels of total cholesterol in mice with LCHP diet. Immunohistochemical analysis showed presence of macrophages in vessel intima and also in vessel media. Stereological analysis showed that the LCHP diet increases area where macrophages cumulate in brachiocephalic artery.

Conclusion: In the mice with LCHP diet was observed increasing of total cholesterol in blood compared with the mice on chow diet. Stereological analysis showed higher presence of macrophages in atherosclerotic plaque at these mice. These results confirm proatherogenic and proinflammatory potential of LCHP diet.

Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Cévy	9
2.1	Obecná struktura cév.....	9
2.1.1	Endotel	11
2.2	Specifická struktura cév	11
2.2.1	Artérie	12
3.	Ateroskleróza	14
3.1	Arterioskleróza.....	14
3.2	Rizikové faktory aterosklerózy	14
3.2.1	Neovlivnitelné rizikové faktory	15
3.2.2	Ovlivnitelné rizikové faktory	16
3.2.3	Nové rizikové faktory	19
3.3	Patogeneze aterosklerózy	20
3.3.1	Endoteliální dysfunkce.....	21
3.3.2	Úloha lipoproteinů v aterogenezi	22
3.3.3	Typy aterosklerotických lézí	24
3.3.4	Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát	26
3.4	Komplikace aterosklerózy.....	28
4.	Makrofágy	29
4.1	Vznik makrofágů a jejich subtypy	29
4.2	Matrixové metaloproteinázy	31
4.3	Scavengerové receptory	31
4.4	Další působení makrofágů v aterosklerotickém plátu	31
5.	Myší modely aterosklerózy	32
5.1	Obecně k modelům aterosklerózy	32
5.2	Myší modely	32
6.	Cíl práce, zadání práce	34

7.	Experimentální část.....	35
7.1	Biochemická analýza	35
7.2	Imunohistochemie	36
7.3	Metodika ImmPress	36
7.3.1	Protilátky	36
7.3.2	Pracovní postup	36
7.4	Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza.....	37
7.4.1	Statistická analýza	38
8.	Výsledky	39
8.1	Biochemická analýza	39
8.2	Imunohistochemická analýza	39
8.3	Stereologická analýza exprese makrofágů v arteria brachiocephalica.....	42
9.	Diskuze.....	43
10.	Závěr	45
11.	Seznam zkratk	46
12.	Seznam použité literatury.....	48

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou v České republice na prvním místě v příčinách úmrtí – v roce 2008 díky KVO zemřelo 52 000 lidí, což představovalo 50 % všech úmrtí v naší republice [Hradec a Býma, 2009]. Společným jmenovatelem KVO je mimo jiné ateroskleróza.

Ateroskleróza je ve vyspělých zemích rozšířeným chronickým civilizačním onemocněním. Ateroskleróza bývá v jejích prvopočátcích asymptomatická. Je to onemocnění, které ve svých začátcích nebolí a projeví se často až při komplikacích, které s tímto onemocněním souvisí, například, dojde-li k obstrukci větší části artérie nebo k uvolnění či ruptuře aterosklerotického plátu.

Přestože k jejímu rozvoji přispívá řada faktorů, které jsou ovlivnitelné nebo neovlivnitelné, a tyto jsou medicíně běžně známe, existuje ještě celá řada faktorů, které potencují vznik aterosklerózy, ale nebyly dosud popsány či nějakým způsobem prokázány.

Dosud medicína nepřišla na způsob, jak zabránit procesu aterosklerózy. Nejběžnější součásti léčby se staly léky, které snižují hladinu triacylglycerolů (TAG) a LDL cholesterolu, jehož zvýšené hladiny bývají nejčastější příčinou aterosklerózy, v kombinaci s antikoagulačními léky. Léky ke snížení cholesterolu by neměly negativně ovlivňovat hladiny HDL cholesterolu. K tomu se přidává úprava životního stylu, aby došlo k potlačení rozvoje aterosklerózy díky tomu, že pacient z jídelníčku vyřadí zdroje živočišných tuků, tedy hlavně sníží množství přijímaných nasycených mastných kyselin a zvýší příjem nenasycených mastných kyselin a svou fyzickou aktivitu [Vollmer, 1999].

Protože ateroskleróza se stala v dnešní době velkým rizikem, hlavně z důvodu špatných stravovacích návyků a životního stylu se stále rostoucí stresovou zátěží, je nutné co nejdetailněji porozumět příčinám jejího vzniku, které dosud nejsou plně objasněny a pochopení mechanismů zahrnujících makrofágy, které jsou rozhodující pro prognózu, diagnózu a léčbu aterosklerózy.

2. Cévy

Oběhový systém se skládá ze dvou podsystémů, a to krevních a lymfatických cév [Junqueira a spol., 1997].

Systém lymfatických cév je tvořen slepě začínajícími lymfatickými kapilárami, které následně vytváří větší cévy. Tyto cévy končí v systému krevních cév a vedou do velkých vén, které se nachází v blízkosti srdce [Konrádová, 2000]. Funkcí lymfatických cév je odvádění přebytečné tekutiny z tkáňových prostor a její návrat zpět do krve [Junqueira a spol., 1997].

Druhý podsystém tvoří srdce, kapiláry, artérie a vény. Srdce zde má funkci čerpadla. K zásobování jednotlivých orgánů dochází díky tomu, že levá část srdce čerpá krev do tělního oběhu. Pravá polovina srdce čerpá krev do plicního oběhu, a tím dochází k výměně oxidu uhličitého (CO_2) za kyslík (O_2). Komoru srdeční opouští krev tepnou, která se následně větví a vznikají cévy, jejichž průsvit se stále zužuje až na úroveň arteriol. V místě, kde na ně navazují kapiláry, dochází k výměně plynů. Z opačného konce kapilárního řečiště vybíhají venuly, které zajišťují návrat krve do srdce, postupně se spojují a vytvářejí silnější vény [Lüllmann, 2012].

Základní funkcí kardiovaskulárního systému je distribuce kyslíku a živin v organismu a přenos hormonů k cílovým orgánům. Dále zajišťuje přenos metabolitů k exkrečním orgánům [Konrádová, 2000].

2.1 Obecná struktura cév

Stavba všech cév je založena na stejném základu [Konrádová, 2000]. Stěna cévy se skládá z několika vrstev, takzvaných tunik [Junqueira a spol., 1997].

- **Tunika intima**

Je tvořena vrstvou endotelu, který vystýlá vnitřní povrch cév. Endotel je tvořen jednovrstevným dlaždicovým epitelem. Endotelové buňky jsou uloženy na bazální lamině. Pod endotelem se dále nachází subendotelová vrstva řídkého vaziva.

- **Tunica media**

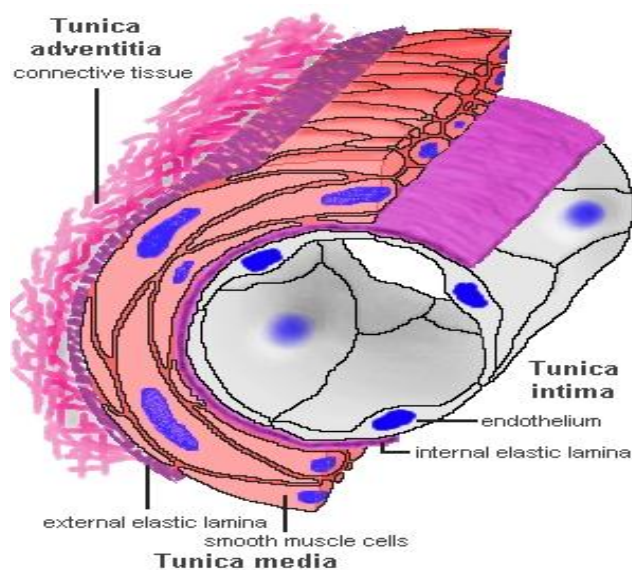
Skládá se především ze šroubovitě vinutých koncentrických vrstev buněk hladkého svalstva. Mezi hladkými svalovými buňkami se nachází různé množství proteoglykanů a elastických a kolagenních vláken. Zdrojem tohoto extracelulárního materiálu jsou hladkosvalové buňky. Tunika media je především tvořena kolagen III. Tunika intima je od tunika media oddělena pomocí membrana elastica interna. Tato membrana tvořená elastinem je opatřena průchody, které umožňují dostatečnou výživu buněk uložených v hloubi stěny artérie. Membrana elastica externa pak odděluje tuniku media od zevní tunika adventitia v tepnách většího kalibru. V kapilárách je tunika media zastoupena speciálními buňkami, které se nazývají pericyty [Junqueira a spol., 1997].

- **Tunica adventitia**

Je tvořena kolagenními a elastickými vlákny, které jsou podélně orientované. V této vrstvě je přítomen kolagen I. typu. Tunika adventitia postupně přechází do vaziva orgánu, kterým céva vede [Junqueira a spol., 1997]. Velké cévy obsahují v této vrstvě také vasa vasorum (cévy cév). Ty slouží k tomu, aby zásobovaly živinami a kyslíkem především ty buňky cévní stěny, které se nachází dále od lumen cévy, a proto nemůže docházet k jejich výživě difúzí [Paulsen, 2004].

Obrázek 1: Popis cévní stěny: Převzato a upraveno z:

<<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/vascular/Images/VesWall.jpg>>



2.1.1 Endotel

Endotel tvoří jednovrstevnou plochou výstelku krevních i lymfatických cév a srdečních dutin [Klika–Vacek, 1974]. Je tvořen plochými polygonálními buňkami, které jsou orientovány ve směru proudění krve a leží na bazální membráně [Lüllmann, 2012]. Endotelové buňky jsou charakteristické plochým jádrem, které se nachází v centrální oblasti buňky. V jeho okolí se nachází malý Golgiho aparát, mitochondrie, malé cisterny zrnitého endoplazmatického retikula a ribozomy [Konrádová, 2000].

Jejich povrch je potažen vrstvou glykokalyx. Díky této vrstvě získá endotel nesmáčivý charakter a silný negativní náboj, který je nezbytný pro jeho permeabilitu. V artériích tvoří endotelové buňky fokální kontakty s extracelulární hmotou. Na tyto kontakty se připojují svazky aktinových filament, které jsou umístěny paralelně s proudem krve a díky tomu mohou endotelové buňky lépe odolávat smykovému napětí, které je zde velmi silné [Lüllmann, 2012].

Endotel je zodpovědný za některé životně důležité funkce organismu. Umožňuje výměnu kyslíku, některých makromolekulárních látek a tekutin mezi tkáněmi a krví. Slouží k udržení rovnováhy mezi vazokonstrikcí a vazodilatací, ovlivňuje metabolismus lipoproteinů a významně se podílí na srážecích procesech krve. Endotelové buňky syntetizují řadu látek, jako například oxid dusnatý (NO) a prostacyklin [Pecka, 2004]. Prostacyklin brání shlukování trombocytů, a jeho produkci endotelové buňky předcházejí vzniku krevních sraženin [Paulsen, 2004].

Na povrchu endotelu se také nachází celé řada receptorů pro cytokiny, neurotransmitery, chemotaktické faktory a leukoadhezivní molekuly [Pecka, 2004].

2.2 Specifická struktura cév

Části cévního systému se za fyziologických podmínek vzájemně liší tloušťkou jednotlivých vrstev své stěny. To je způsobeno rozdílným tlakem, který na jednotlivé cévy působí. Silnější tunika media, která je bohatší na elastická vlákna a hladkosvalové buňky, je přítomná v místech s vyšším středním tlakem.

Proto se stěna artérií vyznačuje silnou vrstvou tunika media a jednotnou úpravou stěny. Tunika media vén je oproti artériím výrazně užší, a mají stěnu regionálně odlišně uspořádanou [Lüllmann, 2012].

2.2.1 Artérie

Podle průměru dělíme artérie na arterioly, elastické artérie a muskulární artérie [Konrádová, 2000].

- **Arterioly**

Jejich průměr se pohybuje okolo 100 μm i méně. Mají poměrně tlustou stěnu a úzké lumen.

Tunika intima je tenká, bez endotelového pojiva. Membrana elastica interna je tvořena sítí elastických vláken.

Tunika media tvoří nejtlustší a nejvýraznější vrstvu cévy. Je hlavně vrstvou svalovou. Je tvořena jednou až pěti vrstvami hladkosvalových buněk a elastickými fibrilami.

Tunika adventitia je tvořena fibroelastickou vrstvou, která je tenčí než je tunika media. Dále je tvořena vrstvou řídkého kolagenního vaziva s elastickými a kolagenními vlákny [Klika – Vacek, 1974].

- **Artérie svalového typu**

Mezi artérie svalového typu se řadí většina artérií střední velikosti, tenké artérie i bezejmenné nejtenčí artérie [Lüllmann, 2012].

Tunika intima je složena z endotelu, dále z tenké vrstvy subendotelového vaziva, kde se nachází jemná elastická a kolagenní vlákna a fibroblasty. Membrana elastica interna má charakteristické fenestrace.

Tunika media je tlustou svalovou vrstvou, složenou ze čtyřiceti vrstev hladkosvalových buněk. Svalovina je zde cirkulárně uspořádaná.

Tunika adventitia je stejně tlustá jako tunika media. Skládá se z řídkého kolagenního vaziva, které je uspořádáno longitudinálně. Na rozhraní mezi tunika media a tunika adventitia je membrana elastica externa, kterou tvoří vrstva elastických vláken [Klika – Vacek, 1974].

- **Artérie elastického typu**

Ve své stěně obsahují velké množství elastinu. Tyto cévy mají poměrně tenkou stěnu se širokým průsvitem.

Endotelové buňky v tunika intima jsou převážně polygonální. Subendotelová vrstva je silnější a obsahuje elastická vlákna, která probíhají longitudinálně a přechází do elastických membrán tunika media.

Tunika media je nejsilnější vrstvou artérií velkého kalibru. Nachází se zde čtyřicet až šedesát elastických blanek, které jsou dírkované.

Mezi těmito blankami, které jsou uspořádány koncentricky, jsou fibroblasty, kolagenní fibrily, základní amorfní hmota a hladkosvalové buňky. Tyto buňky jsou oploštěné a rozvětvené s nepravidelnými okraji. Jsou uspořádány cirkulárně.

Tunika adventitia je velmi tenká vrstva bez známek složité vnitřní organizace. Zevní elastická blanka zde vytváří membranu elasticu externu. Kolagenní vlákna jsou uspořádána longitudinálně. Tunika adventitia zabraňuje tomu, aby se tunika media a tunika intima nadměrně roztahovala při srdeční systole [Klika – Vacek, 1974].

3. Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění, které se nejprve projevuje v tunika intima cév a postihuje převážně artérie. Toto onemocnění je vlastně kombinací charakteristických morfologických změn. Je pro ni charakteristický nález ohniskových ložisek tuků, sacharidů, krve a krevních destiček, fibrózní tkáň a vápenatých ložisek doprovázené změnami v tunika media artérií středního (svalového typu) a velkého kalibru (elastického typu) [Ihling, 1998].

Projevy aterosklerózy se mohou ukázat v podobě lipoidních proužků již u dětí. Ložiska v cévní stěně, která jsou tužší a větší se nazývají fibrózní pláty. Progrese těchto plátů do jejich finální podoby, lézí, způsobuje vznik klinických projevů aterosklerózy [Klener a spol., 2001].

3.1 Arterioskleróza

Často dochází k záměně pojmů ateroskleróza a arterioskleróza. **Ateroskleróza** je onemocnění, které postihuje artérie středního a velkého kalibru (svalového i elastického typu). U **arteriosklerózy** bývají postiženy artérie malého kalibru a arterioly [Mačák-Mačáková, 2004].

Arterioskleróza je dlouhodobý proces, který bývá u postižených zvýšeně zastoupen v určitých částech krevního řečiště, jako v mozkových artériích, v artériích dolních končetin a v epikardiálních artériích myokardu. Postižení arteriosklerózou se nemusí projevit klinickými příznaky. Někdy se může projevit jako chronické obtíže. V jiném případě zase například akutní příhodou, která je způsobena narušením specifické části krevního řečiště [Nečas a spol., 2004].

3.2 Rizikové faktory aterosklerózy

Rozlišujeme rizikové faktory ovlivnitelné a neovlivnitelné. Při výskytu více faktorů se riziko vzniku aterosklerózy nesčítá, ale násobí se. Z toho plyne, že při přítomnosti dvou faktorů je riziko čtyřikrát vyšší, ale u kombinace tří faktorů je riziko již sedmkrát vyšší [Šteiner, 2010].

Obrázek 2: Přehled ovlivnitelných a neovlivnitelných rizikových faktorů aterosklerózy: Převzato a upraveno z:

<<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/rizikove-faktory-kardiovaskularnich-onemocneni-300855>>

Neovlivnitelné	Ovlivnitelné
• věk (muži >55, ženy >65) • rodinná anamnéza předčasné aterosklerózy (u prvorodných příbuzných: muži >45, ženy >55) • přítomnost onemocnění aterosklerotické etiologie • genetické faktory • mužské pohlaví	• arteriální hypertenze • dyslipidemie – celkový cholesterol – LDL cholesterol – triglyceridy – HDL cholesterol • diabetes mellitus 2. typu • nadváha/obezita • kouření • nízká fyzická aktivita • metabolický syndrom • hsCRP • chronické onemocnění ledvin • homocysteinemie

3.2.1 Neovlivnitelné rizikové faktory

- **Pohlaví**

Muži onemocní aterosklerózou dříve a častěji než ženy. Důvodem je ženský pohlavní hormon estrogen. Ten ženy přirozeně chrání před aterosklerózou, ovšem pouze do období klimakteria, potom jeho koncentrace klesá, a tím se snižuje i jeho ochranný efekt. S klesajícími hodnotami estrogenu, stoupá riziko KVO u žen dvakrát až třikrát.

- **Věk**

Věk částečně souvisí s prvním jmenovaným faktorem. Muže postihuje ateroskleróza nebo komplikace s ní spojené, například infarkt myokardu již kolem 40. až 50. roku života. U žen vzrůstá incidence KVO až od 55 let. Infarkt utrpí spíše ženy ve věku kolem 60 až 70 let. Protože se KVO u žen objevuje až v pozdějším věku než u mužů, je doprovázeno větším počtem komplikací.

- **Genetická dispozice**

Ohrožení nastává v případě, pokud se u prvorodných příbuzných (rodiče, prarodiče, sourozenci) vyskytlo KVO ve věku mezi 40 až 55 lety věku [Vollmer, 1999].

3.2.2 Ovlivnitelné rizikové faktory

- **Metabolický syndrom**

Jedná se o soubor příznaků, které se u pacienta mohou vyskytovat v celém spektru, někdy jsou zastoupeny pouze některé příznaky. Lidé postižení metabolickým syndromem jsou ohroženi rizikem předčasné aterosklerózy. Metabolický syndrom tvoří následující příznaky:

- ✓ Obezita centrálního typu
- ✓ Arteriální hypertenze
- ✓ Inzulínová rezistence
- ✓ Nadprodukce VLDL (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou)
- ✓ Vysoká hladina LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou)
- ✓ Snížená koncentrace HDL cholesterolu

Tyto příznaky vedou často k poškození endotelu a k rozvoji aterosklerózy [Racek a spol., 2006].

- **Kouření**

Dvě složky tabákového kouře jsou důležité pro rozvoj aterosklerózy, a to oxid uhelnatý (CO) a nikotin. Interakce těchto dvou složek vede ke zvýšené produkci katecholaminů. Jejich působením dochází k těmto pochodům:

- ✓ Zvyšuje se adhezivita destiček
- ✓ Myokard se stává citlivější k stimulaci katecholaminy
- ✓ Zrychluje se srdeční frekvence a krevní tlak

Dále se snižuje fibrinolýza změnou koncentrací koagulačních faktorů (zvyšuje se množství fibrinogenu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu a snižuje se hladina tkáňového aktivátoru plazminogenu). Dále se u kuřáků také snižuje hladina HDL cholesterolu [Šimon a spol., 2001].

- **Nadváha**

Nadváha nebo obezita se definuje pomocí BMI (body mass index), který se stanovuje jako poměr mezi hmotností v kilogramech a druhé mocniny výšky v metrech. Pro aterosklerózu je obezita rizikem hlavně proto, že často vzniká jako důsledek příliš tučné a na cholesterol bohaté stravy [Vollmer, 1999].

Obrázek 3: Klasifikace obezity podle BMI a rizika vzniku onemocnění souvisejících s obezitou: Převzato a upraveno z:

< <http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/nadvaha-a-obezita-450965>>

Klasifikace	BMI	Riziko vzniku onemocnění souvisejících s obezitou
podváha	menší než 18,5	malé (ale riziko jiných zdravotních problémů)
normální hmotnost	18,5–24,9	průměrné
nadváha	25,0–29,9	mírně zvýšené
obezita I. stupně	30,0–34,9	středně zvýšené
obezita II. stupně	35,0–39,9	dosti zvýšené
obezita III. stupně	více než 40	velmi zvýšené

- **Hypertenze**

Systolická a diastolická hypertenze je významným rizikovým faktorem. Riziko vzniku KVO je o 60 % vyšší než u normotoniců.

- **Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus často vede až ke vzniku hypercholesterolémie. Lidé trpící diabetem mají dvakrát až třikrát vyšší riziko infarktu myokardu než lidé bez diabetu [Šteiner, 2010].

- **Dyslipidémie**

Hyperlipidémie znamená stav, který se projevuje zvýšením koncentrace tuků. V průmyslově vyspělých zemích tvoří za obezitou druhou nejčastější metabolickou chorobu. U pacientů trpících předčasnou aterosklerózou je dyslipidémie potvrzena až u 70 %. Rozlišujeme dyslipidémie primární a sekundární. Dyslipidemií primární jsou geneticky podmíněná samostatná onemocnění. Sekundární dyslipidémie, které tvoří asi jen 30 - 40% všech

dyslipidemií, jsou důsledkem některých chorob, vedlejších účinků léků nebo hormonálních onemocnění [Žák a spol., 2011].

Specificky se hypercholesterolémie projevuje i jako samostatný faktor. Vysoké hodnoty cholesterolu přítomného v séru jsou způsobeny nesprávnou stravou nebo mohou být podmíněny i geneticky. Nejčastěji se jedná o familiární hypercholesterolémii. I některá jiná onemocnění mohou být doprovázena hypercholesterolemií. Mezi tato onemocnění patří například nemoci ledvin s nefrotickým syndromem nebo diabetes mellitus [Šteiner, 2010].

Riziko KVO vzrůstá s rostoucími koncentracemi celkového cholesterolu, a to již od hodnoty 3,9 mmol/l. U hodnot celkového cholesterolu do 5 mmol/l roste riziko KVO pomalu, prudčeji roste kolem hodnot 5,0 - 6,5 mmol/l a nejvyšší riziko představují hodnoty celkového cholesterolu, které se pohybují kolem 6,5 mmol/l.

Dalším rizikovým faktorem je zvýšená hodnota LDL částic (lipoproteiny s nízkou hustotou) a částečně i IDL částic (lipoproteiny o intermediální hustotě). Svůj podíl na vzniku aterosklerózy má kromě vyšších koncentrací těchto lipoproteinů i jejich oxidativní modifikace kyslíkatými radikály v subendoteliálním prostoru cévy. Částice LDL a IDL obsahují ve své molekule apoprotein B a potencují vznik aterosklerózy.

Vztah HDL (lipoproteiny o vysoké hustotě) ke KVO je opačný od výše popsaných částic. HDL působí protektivně. Protektivní účinek HDL spočívá v jeho schopnosti odvádět přebytečný cholesterol z periferních tkání do jater. HDL dále chrání LDL proti oxidaci, podporuje vazodilataci zprostředkovanou endotelem a pomáhá odstraňovat produkty oxidace lipidů, které jsou toxické. Pokud dojde ke snížení hladiny HDL cholesterolu o 0,1 mmol/l zvyšuje se riziko KVO až o 10% [Šimon a spol., 2001].

Hodnoty celkového cholesterolu by se u osob ve středním věku měly pohybovat v rozmezí 3,5 až 5,2 mmol/l. Koncentrace HDL cholesterolu by se měla pohybovat nad hodnotou 1 mmol/l [Racek a spol., 2006].

3.2.3 Nové rizikové faktory

Aterosklerózou mohou být postiženi i lidé, u kterých podle klasických rizikových faktorů vzniká nízká pravděpodobnost propuknutí tohoto onemocnění. V této době je pozornost směřována právě k identifikaci nových faktorů, které by dopomohly ke zvýšení odhalení rizik KVO.

- **Homocystein**

Je to aminokyselina, která se do těla nedostává potravou. Jedná se o významný meziprodukt, který vzniká v metabolickém cyklu při přenosu methylových a sulfo skupin za účasti aminokyselin methioninu a cysteinu. Dnes jsou zvýšené hladiny homocysteinu považovány za nezávislý rizikový faktor KVO. Homocystein zvyšuje sílu vazby lipoproteinu a na fibrin, v krevních destičkách potencuje tvorbu tromboxanu A_2 , aktivuje srážecí faktor V, a tím působí protromboticky. Dále působí jako inhibitor proliferace endotelových buněk, tvorby NO. Má kladný účinek na proliferaci hladkosvalových buněk cévní stěny a zvyšuje oxidativní přeměnu LDL částic také tím, že inhibuje antioxidační enzymy. Mimo jiné působí jako aktivátor enzymu poly-ADPriboza polymeráza, který podporuje endotelovou dysfunkci [Žák, 2011].

- **Fibrinogen**

Je protein syntetizovaný v játrech, který se nachází v krevní plazmě. Při srážecích procesech se působením trombinu mění na vláknitý fibrin. Studie WOSCOPS (West Of Scotland Coronary Prevention Study) na základě zjištěných údajů označila fibrinogen jako faktor určený k předpovědi kardiovaskulární mortality. Podle jeho hodnot zjištěných v několika dalších studiích bylo možno předpovědět riziko budoucího infarktu myokardu. Dále byla zjištěna souvislost vyšších hladin fibrinogenu s výskytem koronární příhody. Fibrinogen iniciuje vznik trombu, který nasedá na aterosklerotický plát. Ten následně způsobí uzavření cévy a následně způsobuje rozvoj akutního koronárního syndromu. K vytvoření trombu dochází snadněji při vyšších hladinách fibrinogenu v plazmě. Z tohoto důvodu jsou vysoké hladiny fibrinogenu spojovány s rizikem vzniku trombotických příhod [Žák a spol., 2011].

- **C - reaktivní protein (CRP)**

Dosud bylo s velkým zájmem zaznamenáno, jak Ridker a spol. v roce 1997 v Physicians Health Study popsal, že unikátní měření hodnot CRP v séru, stanoveného vysoce citlivou metodou (hsCRP), může předpovědět u mužů, do této doby zdravých, budoucí riziko KVO. Hodnoty CRP pod 1mg/dl se považují za nízké riziko, hodnoty 1-3 mg/dl za mírné riziko a hodnoty nad 3 mg/dl za vysoké riziko. Studie, které následovaly, označily CRP nejen jako rizikový faktor pro ICHS (ischemická choroba srdeční), ale také pro např. mrtvici nebo uzávěrové choroby periferních artérií.

Nabízí se otázka, zda zvýšené hodnoty CRP jsou jen průvodním jevem zánětlivých cévních onemocnění, nebo jestli samo CRP hraje kauzální roli při vzniku aterosklerózy a KVO.

CRP je syntetizováno v játrech pod kontrolou různých cytokinů. Je možné ho prokázat i v plátech časných stádií aterosklerózy spolu s aterosklerotickými lipidy. Byly popsány různé vlastnosti CRP, které mohou vést k udržení zánětlivé reakce, a to takové, že se CRP váže na poškozené buňky a aktivuje komplement v myokardu postiženém infarktem a na aterogenní lipidové částice a indukuje in vitro agregaci částic LDL a VLDL, CRP dále indukuje tvorbu tkáňového faktoru a podporuje tím tvorbu trombu [Galle, 2004].

Další zvýšená pozornost, v souvislosti se vznikem KVO je věnována adiponektinu, což je peptidový hormon produkovaný adipocyty. Jeho přesný vztah ke KVO je nutné prokázat přesněji podrobnějšími analýzami. Další faktor tvoří myeloperoxidáza. Jedná se o enzym, který se podílí na oxidaci LDL částic, které se nachází v aterosklerotických plátech [Žák a spol., 2011].

3.3 Patogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza je výsledkem komplexní souhry mezi krevními složkami, změněnými podmínkami průtoku krve, čímž dochází k poškození cévní stěny, a abnormalitami stěny cév zahrnující různé patologické operace. Dochází k rozvoji chronických zánětlivých projevů [Bräsen-Niendorf, 1997].

3.3.1 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce je charakteristická převahou vazokonstrikce, snížením trombolýzy, čímž se zvyšuje riziko vzniku trombů, a zvýšenou permeabilitou endotelu pro lipoproteiny. Může být zapříčiněna mechanicky, například hypertenzí, která naruší cévní výstelku, a metabolicky, například zvýšenými koncentracemi TAG a cholesterolu. Dále se na porušení funkce endotelu uplatňuje také homocystein a angiotenzin II.

Endotelovou dysfunkci můžeme často najít i u kuřáků, u osob majících diabetes mellitus nebo metabolický syndrom.

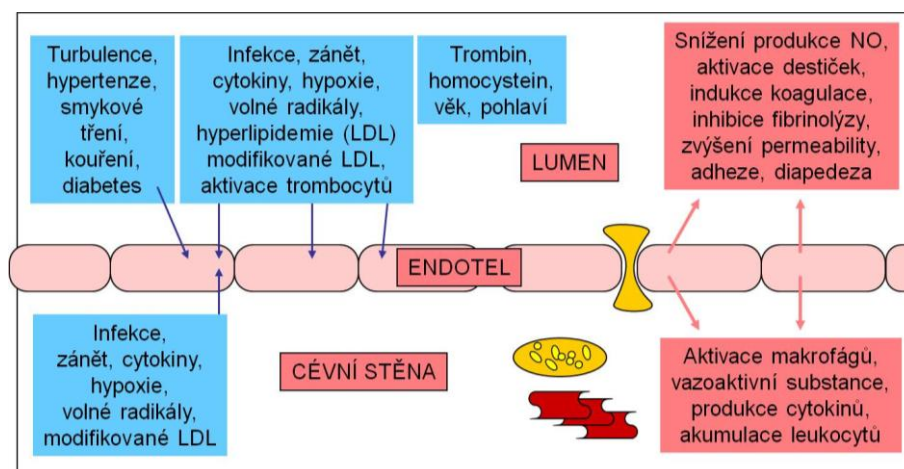
U endotelové dysfunkce dochází ke snížené produkci oxidu dusnatého (NO). Tím endotel ztrácí schopnost vazodilatace, antiagregační, antiproliferativní a antiadhezní účinek a naopak převládají děje opačného charakteru. Volné radikály, například superoxid, který tvoří makrofágy na popud angiotenzinu II, snižují koncentraci NO a jsou odpovědné i za stimulaci dějů, které vedou k aterogenezi [Racek, 2006].

Endoteliální dysfunkce je také spojená s expresí proteinů, které umožňují vazbu monocytů, T-lymfocytů a trombocytů na povrch endotelu. Mezi tyto molekuly patří VCAM – 1 (adhezní molekula 1 cévních buněk), ICAM- 1 (Intercelulární adhezní molekula 1) a P a E selektiny, které indukují expresi dalších adhezivních molekul, jako například L selektinu.

Adhezní molekuly stabilizují vazbu mezi monocyty a endoteliálními buňkami, a tím umožňují migraci monocytů přes cévní stěnu, což je důležitý proces ve vývoji aterosklerotické léze [Rösen, 2002]. Tyto monocyty/makrofágy pohlcují cholesterol, který do stěny cévy pronikl a transformují se na pěnové buňky [Bräsen- Niendorf, 1997].

Průnik lipoproteinových částic do místa vzniku léze umožňuje zvýšená permeabilita endotelu. Dochází k jejich oxidaci, která je způsobena reaktivními formami kyslíku a dusíku, které nepodlehly mechanismu antioxidantace [Bräsen- Niendorf, 1997].

Obrázek 4: Endoteliální dysfunkce: Modře jsou označeny faktory způsobující aktivaci endotelu a růžově jsou označeny projevy endotelové dysfunkce.
Převzato a upraveno z: < <http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/?p=1456>>



3.3.2 Úloha lipoproteinů v aterogenezi

TAG a cholesterol jsou přenášeny částicemi s nejmenší hustotou - chylomikrony. Tyto částice, které obsahují nejvyšší podíl lipidů, vznikají ve sliznici tenkého střeva a dostávají se do krevního oběhu. Pro jejich syntézu je nezbytný apolipoprotein apoB-48, dále obsahují i apolipoproteiny skupiny A a v plazmě získávají apolipoprotein E (apoE) a C. Lipoproteinová lipáza, která se nachází na membráně endotelií kapilár, štěpí TAG chylomikronů. Uvolněné mastné kyseliny mohou být, mimo jiné vychytávány játry a použity k resyntéze TAG nebo metabolizovány [Racek, 2006].

Pro vznik a rozvoj aterosklerózy jsou nejzásadnější LDL částice. Tyto částice v organismu vznikají přeměnou částic VLDL (lipoproteiny o velmi nízké hustotě), které syntetizují a vylučují játra. VLDL obsahují apolipoprotein B₁₀₀ (apoB), TAG a cholesterol. V cirkulaci jsou z jejich jádra díky interakci s endotelovou lipázou odstraněny TAG, čímž dochází ke snížení jejich hustoty. Tím vznikají IDL částice, které stejně jako VLDL obsahují apoB a apoE. IDL mohou v cirkulaci podstoupit další přestavbu za vzniku LDL částic [Halle a spol., 1998].

Na povrchu LDL částic se nachází apoB, volný cholesterol a fosfolipidy. Jejich hydrofilní jádro vytváří esterifikovaný cholesterol a TAG [Racek, 2010].

Při potřebě jsou LDL částice z krevního oběhu vychytávány buňkami vazbou na jejich specifické receptory. Uvnitř buňky potom dochází k uvolnění cholesterolu [Bhakdi, 2002]. Buňka na tento děj zareaguje snížením syntézy vlastního cholesterolu.

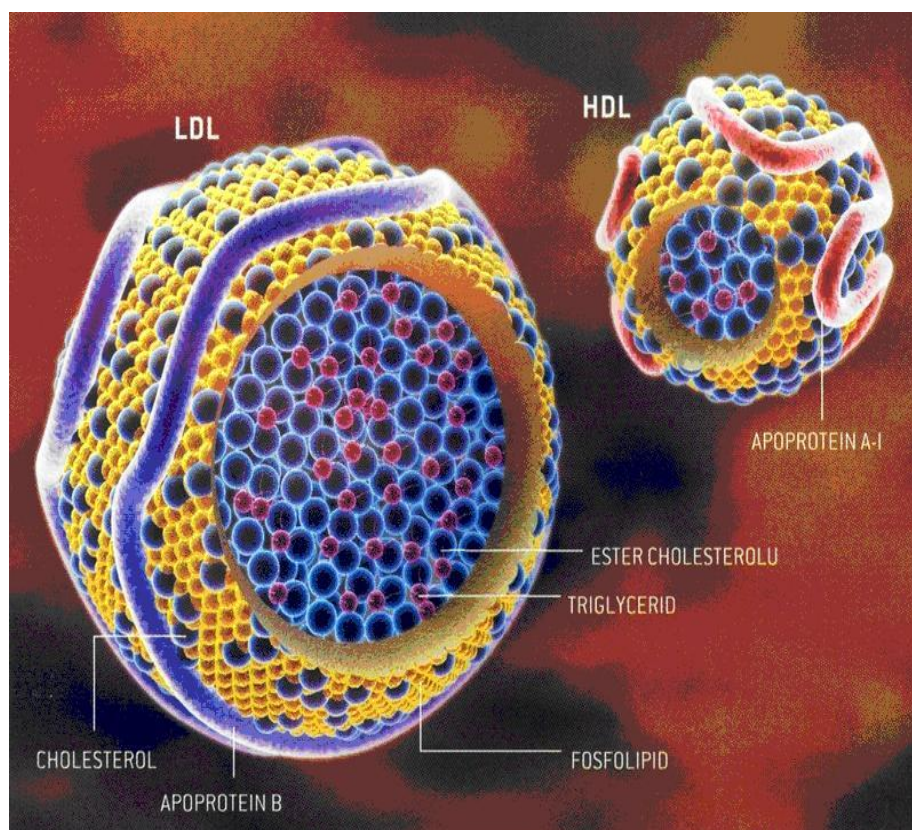
Při změně struktury LDL, hlavně jejich části apoB, která je důležitá pro vazbu LDL částice na receptor je tento fyziologický děj narušen. Ke změně LDL částice nejvíce dochází oxidací reaktivními formami dusíku a kyslíku. Na oxidaci LDL se uplatňují hlavně peroxid vodíku, ze kterého vzniká působením přechodných kovů hydroxylový radikál, který dále modifikuje LDL částice, a kyselina chlorná, která účinkem myeloperoxidázy vzniká také z peroxidu vodíku.

K oxidaci LDL dochází v cévní stěně, kde LDL nejsou chráněny antioxidanty. V plazmě je naopak přítomno velké množství antioxidantů, které tomuto ději zabráňují. Receptory pro LDL nerozpoznávají oxidovanou formu LDL. Proto se oxidované LDL váže na scavengerové receptory makrofágů přítomných v cévní stěně za vzniku pěnových buněk. Oxidované LDL svými biologickými účinky podporují aterosenní proces [Racek, 2010].

Zvýšená hladina HDL cholesterolu se u aterosklerózy naopak projevuje protektivními účinky. Zvýšení hladiny HDL cholesterolu pouze o 0,26 mmol/l snižuje riziko infarktu myokardu o 30%. HDL cholesterol má antiaterogenními a vazoprotektivními účinky. Působí protizánětlivě, zlepšuje funkci endotelu, zvláště díky jeho schopnosti zvýšit syntézu NO, kterou zajišťují endotelové buňky, a inhibuje oxidaci LDL částic [Paulweber, 2004]. Této inhibice je HDL schopen pomocí paraoxonázy-1 (PON1), kterou obsahuje ve své molekule.

HDL částice dále hraje důležitou roli v reverzním transportu cholesterolu. Reverzní transport cholesterolu znamená přenos cholesterolu z periferních tkání zpět do jater. Tento proces je zprostředkován apolipoproteinem A- I (apoA-I), který je součástí HDL [Spieker, 2003].

Obrázek 5: Popis LDL a HDL částice: Převzato a upraveno z:
<<http://www.biology.estranky.cz/clanky/patologie/patologie-aterosklerozy.html>>



3.3.3 Typy aterosklerotických lézí

Aterosklerotický proces byl rozdělen podle klasifikace American Heart Association do pěti fází. Každá fáze se vyznačuje charakteristickou morfologií aterosklerotického plátu. Z morfologie plátů je patrné, že ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění tunika intima cév. Během aterosklerotického procesu plát postupně roste. Klinické komplikace vznikají při ruptuře plátu následované trombózou.

- **Fáze I**

Nachází se nejčastěji u jedinců mladších 30 let. Vychází se z toho, že léze, které se nachází v této fázi, jsou na jedné straně kompletně reverzibilní, na straně druhé ale mohou také tvořit časná stádia progresivních plátů. Ve fázi I nacházíme léze typu 1 až 3.

- ✓ **Léze typu 1** jsou typické nahromaděním makrofágů v tunika intima, tím dochází k jejímu ztlustění. Nachází se zde izolované pěnové buňky, které vznikají z makrofágů.

- ✓ **Léze typu 2** je také tvořena makrofágy, které se nacházejí v tunika intima. Zde je, na rozdíl od léze typu 1, zvýšený počet makrofágů transformovaných v pěnové buňky (makrofágy obsahující intracelulárně nahromaděné lipidy). Dále se zde nachází další buňky zánětu, T-lymfocyty.
- ✓ **Léze typu 3** je typická výskytem menších extracelulárních ložisek lipidů.

- **Fáze II:**

Léze ve fázi II se vyznačují vyšším obsahem lipidů, tím dochází k růstu plátu. Pláty jsou proto nestabilní a náchylné k rupturám. Patří sem léze typu 4 a 5a.

- ✓ **Léze typu 4** je charakteristická jádrem bohatým na lipidy, které vzniká díky stékání ložisek lipidů.
- ✓ **Léze typu 5a** se vyznačuje ložisky lipidů, která jsou ohraničena tenkou fibrózní čepičkou.

Fáze II může přejít do akutní fáze III nebo IV nebo přímo (bez akutních komplikací) do fáze V.

- **Fáze III a IV:**

Jsou charakteristické lézemi typu 6.

- ✓ **Léze typu 6** je léze typu 4 nebo 5a s povrchovým defektem, který případně může vést ke krvácení uvnitř plátu nebo až k jeho ruptuře a nasednutí trombu. Toto je spojeno s objevením klinických symptomů, jako je například akutní koronární syndrom.

- **Fáze V:**

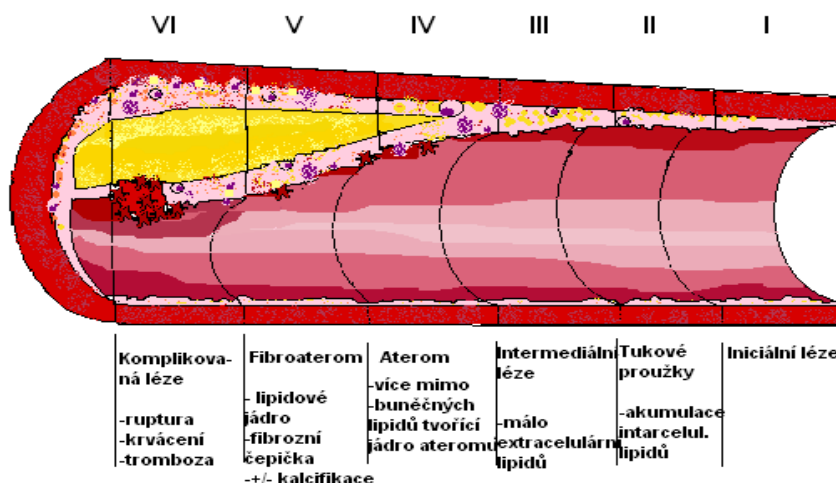
Vyznačuje se fibrózními lézemi typu 5b a 5c.

- ✓ **Léze typu 5b** se vyznačuje vyšším stupněm stenózy (zúžení) cévy, vyšším zastoupením hladkosvalových buněk a fibrózní tkáně.
- ✓ **Léze typu 5c** se podobá typu 5b, liší se pouze vyšším obsahem kolagenních vláken.

Ve fázi V lze najít také fibrotické nebo okluzivní léze typu 7 a 8, které neobsahují žádná tuková ložiska.

- ✓ **Léze typu 7** je chudá na buňky a charakteristická její kalcifikací.
- ✓ **Léze typu 8** je charakteristická přítomností velkého množství kolagenních vláken bez kalcifikace nebo ložisek tuku [Ihling, 1998].

Obrázek 6: Typy aterosklerotických lézí: Převzato a upraveno z:
< <http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/wp-content/uploads/2011/12/5.bmp>>



3.3.4 Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát

Aterosklerotický plát se skládá ze dvou komponent, a to z měkké komponenty bohaté na lipidy, která tvoří jádro plátu, a z tvrdší tkáně bohaté na kolagen. Pojivové tkáně slouží ke stabilizaci komponent, zatímco jádro bohaté na lipidy má spíše

destabilizující účinek. Stabilita plátu závisí na jejich vzájemném poměru [Bräsen-Niendorf, 1997].

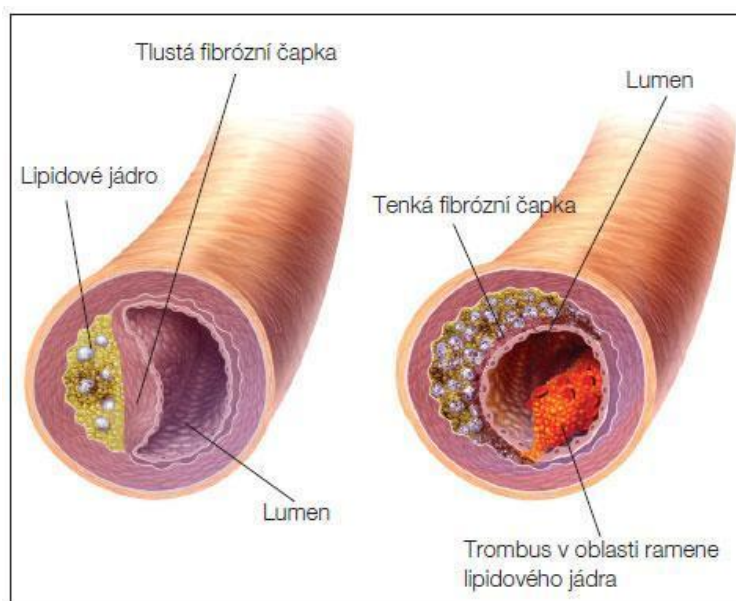
- **Stabilní pláty**

Mají tlustou a neporušenou fibrózní čepičku, složenou převážně z hladkosvalových buněk, kolagenu a elastinu, která kryje lipidové jádro. Hladkosvalové buňky v čepičce chrání plát před rupturou. Uvnitř stabilního plátu se nachází krystaly cholesterolu a pěnové buňky [Vollmer, 1999].

- **Nestabilní pláty**

Nebo také pláty náchylné k rupturám, jsou charakteristické jádrem bohatým na lipidy, které tvoří více než 40 % objemu plátu [Müller a spol., 1999]. Je zde přítomen zánětlivý infiltrát z makrofágů a lymfocytů a výrazná aktivita metaloproteináz - enzymy, které makrofágy produkují. Tyto enzymy destabilizují plát [Šteiner, 2010]. Tyto nestabilní pláty se dále vyznačují nízkou hustotou hladkosvalových buněk, malým množstvím kolagenních vláken, vysokou expresí tkáňového faktoru a úzkou fibrózní čepičkou. Pokud se fibrózní čepička roztrhne, dochází k akutnímu trombogennímu dění, které může mít za následek náhlé vypuknutí například nestabilní angíny pectoris nebo infarktu myokardu [Müller a spol., 1999].

Obrázek 7: Popis aterosklerotického plátu: Vlevo je znázorněn stabilní plát a vpravo nestabilní plát. Převzato a upraveno z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fosfolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141>



3.4 Komplikace aterosklerózy

Ateroskleróza se projevuje svými komplikacemi. Tyto komplikace jsou způsobeny stenózou nebo uzávěrem tepny s následující ischemií tkáně. Důsledky a hlavně rozsah ischemie závisí na tom, jak dlouhou dobu byla tkáň ischemii vystavena a na její odolnosti k nedostatku kyslíku [Fialová a spol., 2010].

Postižení koronárních tepen aterosklerózou se projevuje jako ischemická choroba srdeční (ICHS). ICHS pod sebe zahrnuje několik patologických jednotek se společným jevem - ischemií myokardu, která je způsobena nepoměrem mezi poptávkou myokardu po okysličené krvi a její dodávkou koronárními tepnami.

Stabilní aterosklerotické pláty působí fixní stenózu a jejich projevem je stabilní angína pectoris a stabilní ICHS. Stenóza více než 75 % lumen cévy vede k ischemii při námaze, ischemii v klidu působí stenózy více než 90 % lumen cévy [Šteiner, 2010].

Infarkt myokardu (IM) je ischemická nekróza srdečního svalu. K nekróze dochází kvůli akutnímu uzávěru koronární tepny. Uzávěr je nejčastěji tvořen intrakoronárním trombem, který vzniká na prasklém aterosklerotickém plátu [Hradec a Býma, 2009].

Na základě uzávěru krční nebo mozkové tepny, která zásobuje krví příslušnou část mozkové tkáně, dochází k rozvoji ischemické cévní mozkové příhody. K uzávěru dochází kvůli přítomnosti aterosklerotického plátu. Mezi klinické projevy patří poruchy řeči, cití, porozumění mluvenému slovu, poruchy rovnováhy, různé poruchy hybnosti končetin a další příznaky, které jsou závislé na lokalizaci mozkové léze [Hutyra a spol., 2011].

Ateroskleróza periferních tepen může být příčinou rozvoje například ischemické choroby dolních končetin, která se projevuje krutými bolestmi končetiny a změnou citění v končetině. Dále je končetina studená a bílá a distálně od uzávěru dochází k chybění pulzu [Šteif a spol., 2007].

4. Makrofágy

Makrofágy jsou přítomné na všech endoteliálních a epiteliálních površích těla [Maiuri a spol., 2013]. Jde o první buňky zánětu, které spoluvytvářejí aterosklerotický plát a jsou také hlavní složkou aterosklerotického plátu. Zánětlivé cytokiny, které makrofágy produkují, stimulují vznik endoteliálních adhezivních molekul, proteáz a jiných mediátorů, které mohou vstupovat do systémové cirkulace. Produkci cytokinů mohou makrofágy přispívat také k aktivaci lymfocytů [Gui a spol., 2012].

4.1 Vznik makrofágů a jejich subtypy

Makrofágy vznikají z monocytů, jejichž původ je v kostní dřeni, kde monocyty vznikají z progenitorové buňky. Během patogeneze aterosklerózy krevní monocyty přechází z krve do tunika intima cévy. Tento proces je aktivován hromaděním lipoproteinů v subendotelu, které na svém povrchu mají apoB. Na popud chemokinů monocyty migrují, přičemž jejich transport je potencován buněčnými adhezními molekulami, které jsou produkovány endotelem. K těmto adhezním molekulám patří například VCAM- 1 a ICAM- 1, které vedou ke zpomalení a utvoření pevnější vazby monocytů k endotelu. Nakonec je adheze následována vstupem monocytu do subendoteliálního prostoru pomocí diapedézy [Gui a spol., 2012].

Po přestupu monocytů z cirkulace do subendoteliálního prostoru následuje jejich diferenciaci do zralých tkáňových makrofágů. Tento proces zajišťují především růstové faktory M-CSF (makrofágový růstový faktor) a GM-CSF (granulocyt-makrofágový růstový faktor). Přeměna monocytů zajištěná růstovým faktorem M-CSF vede více ke vzniku protizánětlivých fenotypů makrofágů, zatímco GM-CSF dává vzniknout prozánětlivé populaci makrofágů [Hoeksema a spol., 2012].

Vznikají tak dva makrofágové subtypy - M1 makrofágy a M2 makrofágy. Oba tyto subtypy jsou přítomny v aterosklerotické lézi, ale mají opačnou roli v průběhu zánětu. M1 makrofágy podporují rozvoj zánětu a k jejich aktivaci dochází vlivem působení interferonu- γ (INF- γ) [Gui a spol., 2012]. INF- γ je cytokin, který produkují pomocné T- lymfocyty [Nečas a spol., 2005].

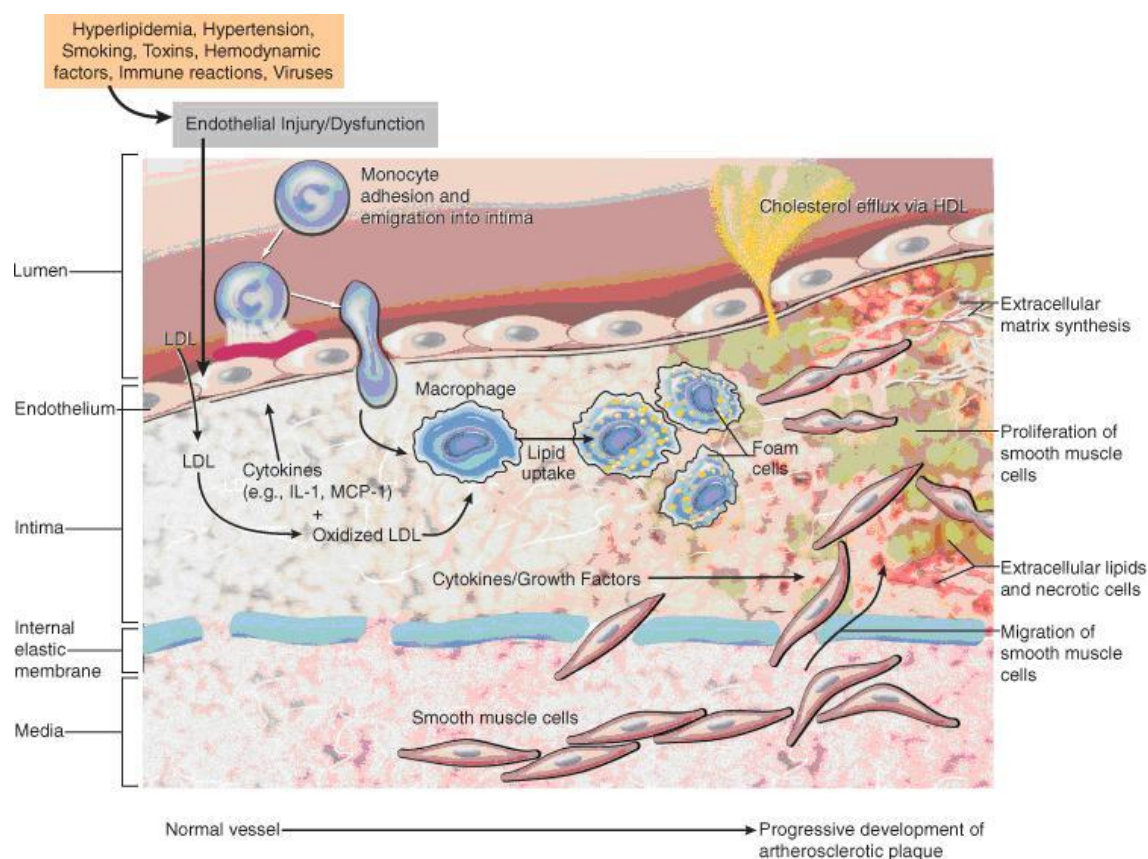
Subtyp M1 je charakteristický vysokou expresí interleukinu 12 (IL-12) a nízkou expresí interleukinu 10 (IL-10) [Hoeksema a spol., 2012]. Dále produkuje vysoké hladiny interleukinu 2 (IL-2), interleukinu 23 (IL-23), interleukinu 6 (IL-6), IL-1 a

tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α). K aktivaci subtypu M2 makrofágů, které podporují reparaci tkáně, dochází v přítomnosti interleukinu 4 (IL-4), interleukinu 13 (IL-13, interleukinu 1 (IL-1) nebo vitaminu D3. Subtyp M2 produkuje vysoké hladiny IL-10 a exprimuje Scavengerové receptory (SR) [Gui a spol., 2012].

Obrázek 8: Diferenciace monocytů v makrofágy a vznik pěnové buňky:

Převzato a upraveno z:

<<http://www.biology.estranky.cz/img/picture/16/aterosklerosa5.JPG>>



© Elsevier 2005

4.2 Matrixové metaloproteinázy

Makrofágy mimo jiné produkují i enzymy, které se podílejí na destabilizaci plátu a přispívají k jeho ruptuře. Tyto enzymy se podle specifity dělí do skupin na kolagenázy (MMP-1, MMP-13), elastázy (MMP-12), gelatinázy (MMP-9) atd. Makrofágy produkují metaloproteinázy v různém stupni svého vývoje, tedy i ve formě pěnových buněk [Vojáček, 2004].

Díky produkci metaloproteináz odbourávají makrofágy extracelulární matrix a to vede k oslabení fibrózní čepičky. Kromě makrofágů dokáží enzymy metaloproteinázy produkovat v aterosklerotickém plátu i aktivované T- lymfocyty, potom, co dojde k jejich stimulaci cytokiny [Auer a spol., 2000].

4.3 Scavengerové receptory

Scavengerové receptory (SR) jsou receptory, které nejsou regulovány hladinou cholesterolu. Díky tomu v prostředí, kde je velké množství LDL dochází k tomu, že makrofág absorbuje zvýšené množství LDL. Díky rychlé akumulaci lipidů se makrofág rychle zvětšuje. Tento proces brání vycestování makrofágu ze stěny cévy a ten je zadržován v mezibuněčném prostoru. Postupně dochází k jeho přeměně v rezidenční makrofág až na pěnovou buňku [Vojáček, 2004].

Je známo několik tříd SR. SR třídy A, exprimované na povrchu makrofágu, přednostně váží oxidované LDL (oxLDL), rozpoznáním jeho modifikované apoB části [Gui a spol., 2012].

4.4 Další působení makrofágů v aterosklerotickém plátu

Makrofágy se podílejí na morfologii plátu, rozrušují fibrózní čepičku tím, že snižují syntézu kolagenu díky sekreci metaloproteináz. Makrofágy dále tvoří nekrotické jádro, což může vést ke zvýšené prozánětlivé odpovědi a tvorbě dalších apoptických signálů, které zprostředkovávají například leukocyty přítomné v plátu. Je těžké detekovat apoptózu makrofágů v časných stádiích aterosklerózy, protože apoptické buňky jsou fagocytovány přilehlými makrofágy. V pokročilém stádiu aterosklerotické léze vzniká nekrotické jádro, které je tvořeno hlavně těmi makrofágy, které podlehly apoptóze a nebyly efektivně odstraněny fagocytózou. Nestabilní plát je náchylný k ruptuře a indukci trombózy [Gui a spol., 2012].

5. Myší modely aterosklerózy

5.1 Obecně k modelům aterosklerózy

Pro studii patogeneze aterosklerózy a možností její léčby bylo jako modely použito mnoho druhů zvířat. První důkazy o experimentech, které se týkaly aterosklerózy, pochází z roku 1908, kdy došlo k zaznamenání ztlustění tunika intima aorty králíka, který byl krmen dietou bohatou na živočišné proteiny.

Nejvíce používané zvířecí modely byly dosud omezeny na relativně velká zvířata, jako jsou primáti, prasata a králíci. Králíci jsou jako modely pro výzkum aterosklerózy užiteční i přesto, že u nich spontánně k rozvoji aterosklerózy nedochází. Jsou vysoce citliví k cholesterolu a léze, které se u nich tvoří velmi rychle, obsahují velké množství tuku a jsou bohaté na makrofágy. Jako velmi dobrý model aterosklerózy se ukázala také prasata, u kterých se vyvíjí aterosklerotická léze, která se svými vlastnostmi velmi podobá té lidské. Problémem u prasečích modelů jsou finanční náklady a obtíže při jejich chovu. I když se tyto druhy zvířecích modelů postupně přestaly používat, poskytly neocenitelné informace v porozumění aterogenním procesům [Jawien a spol., 2004].

5.2 Myší modely

Myší modely aterosklerózy se poprvé objevily v průběhu roku 1960. Myši splňují mnoho kritérií proto, aby se mohly stát ideálními modelovými zvířaty pro studium aterosklerózy (krátká generační doba, jejich jednoduchá dostupnost a nenáročnost), ale je nutné vzít v úvahu značné rozdíly mezi myší a člověkem [Jawien a spol., 2004].

Nejzásadnějším rozdílem pro studium aterosklerózy je to, že lipidový profil myší je od toho lidského velmi odlišný. Lidé mají vysoké hodnoty LDL cholesterolu a velmi citlivě reagují na zvýšení jeho hladiny, což způsobuje přijímaná potrava. Oproti tomu je u myší velká část cholesterolu vázána v krvi na HDL, a hodnoty LDL cholesterolu jsou u nich velmi nízké [Aigner-Wolf, 2005].

V kombinaci s nízkotučnou stravou, kterou myši přijímají, jsou za přirozených podmínek vysoce resistantní k ateroskleróze, to znamená, že za normálních podmínek u nich k rozvoji aterosklerózy vůbec nedochází. Jedinou výjimkou je myší kmen C57BL/6.

Při krmení těchto myší cholesterolovou dietou, která obsahuje kyselinu cholovou a velké množství tuku, vznikají léze, které jsou velmi malé, a svou histologickou povahou se značně liší od lidských aterosklerotických lézí. Tyto léze jsou charakteristické tím, že ve svém vývoji nepřekročily stádium tukového proužkování a jsou v nich téměř výhradně zastoupeny pěnové buňky s velmi malým množstvím hladkosvalových buněk [Jawien a spol., 2004]. Další nevýhodou bylo, že tato dieta byla nefyziologická, díky svému složení, a sama o sobě způsobovala u myší zánětlivé pochody [Lialo a spol., 1993].

I přesto, že tyto modely byly hojně využívány pro studium aterosklerózy, patologie vzniku a rozvoje lézí u těchto modelů není ideální jako model lidské aterosklerózy.

Jednou z hlavních výhod práce s myšími modely je možnost knock-outovat nebo nahradit jejich endogenní geny. Díky vzniku knock-outovaných myších modelů se podařilo vytvořit zvířata s vysokými dispozicemi k ateroskleróze. Zde se osvědčily hlavně apolipoprotein E ($\text{apoE}^{-/-}$) a LDL receptor deficientní ($\text{Ldlr}^{-/-}$) myši.

Pro náš výzkum je důležitý nedávno vyvinutý myší model, který je charakteristický vysokou hyperlipidémií a predispozicemi k rozvoji aterosklerózy. Jde o dvojitě knock-outované $\text{apoE}^{-/-}$ a $\text{Ldlr}^{-/-}$ deficientní myši [Jawien a spol., 2004]. Bylo prokázáno, že u těchto myší je progres aterosklerózy výraznější, než u myší s deficitem apoE [Witting a spol., 1999]. Tyto dvojitě knock-outované myši jsou tedy vhodným modelem pro studium aterosklerózy bez nutnosti krmit zvířata proaterosklerotickou dietou [Jawien a spol., 2004].

6. Cíl práce, zadání práce

Cílem této bakalářské práce bylo nastavit imunohistochemické metody pro detekci makrofágů v arteria brachiocephalica apoE/LDLR receptor deficientních myší. Kromě toho jsme se také zaměřili na kvantifikaci exprese těchto makrofágů u skupiny, které byla podávána standardní dieta a u myší, kterým byla podávána dieta s nízkým obsahem cukrů a vysokým obsahem proteinů.

7. Experimentální část

Zvířata a chov

Ke studii byly použity samice ApoE/LDLR deficientní myši staré 16-18 týdnů, u kterých lze již v tomto stádiu detekovat aterosklerotické pláty. Zvířata byla zamčena v klecích v prostředí s kontrolovanou teplotou (22-25°C) s 12 hodinovými cykly světla a tmy. Měla volný přístup k vodě a potravě.

Diety a krmení

Do věku 16-18 týdnů, byly myši krmeny komerční, bezcholesterolovou, granulovanou stravou (Sniff M-Z Spezialdiäten GmbH; Soest, Německo). Ve věku 16-18 týdnů byly myši zváženy a rozděleny do dvou skupin (n=6 v každé skupině). Kontrolní skupina myši byla krmena standardní dietou. U LCHP skupiny byly myši krmeny dietou chudou na sacharidy a bohatou na proteiny po dalších 8 týdnů (viz tab. 1). Po usmrcení myši byly odebrány krevní vzorky z levé komory srdeční a centrifugovány pro získání séra. Vzorky byly zmrazeny na -80°C a uskladněny pro další analýzu.

Tabulka 1: Složení experimentálních diet (%), vycházející z Reeves et al. 1993.

	AIN	LCHP
Kukuřičný škrob	53	5
Casein	20	52
Sacharóza	10	12
Sojový olej	7	-
Máslo	-	21
Celulózový prášek	5	5
Minerální směs	4	4
Vitamínová směs	1	1
Cholin	0.25	0.25

Experimentální diety byly následující: Kontrolní skupina - AIN-93G

LCHP (nízké sacharidy, vysoké proteiny)

7.1 Biochemická analýza

Vzorky pro biochemickou analýzu byly získány z vypěstovaných myši před eutanázií odebráním krevních vzorků z levé srdeční komory. Takto odebrané krve byly následně odstředěny a jejich sérum pro další analýzu bylo zmrazeno (minus 80°C).

Vzorky byly zpracovány na pracovišti v Krakově a výsledky nám byly pro tuto práci poskytnuty.

7.2 Imunohistochemie

Pro imunohistochemické stanovení makrofágů byly použity řezy arteria brachiocefalica myší.

Makrofágy byly stanoveny metodou ImmPress s detekčním činidlem diaminobenzidin (DAB), který v případě pozitivní reakce poskytuje hnědé zbarvení v místě, kde došlo ke specifické reakci antigenu s protilátkou.

7.3 Metodika ImmPress

ImmPress (Polymerized reporter enzyme staining system) metoda, kterou jsme použili, je založena na principu nepřímé imunohistochemie. Zde se využívá neznačená primární protilátka, která se specificky naváže na antigen, který chceme detekovat. Poté se přidá sekundární protilátka, která je značena v tomto případě enzymem (peroxidázou), a specificky se naváže na primární protilátku. Následuje přidání enzymatického substrátu, díky kterému dojde k barevnému zvýraznění reakce [www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=1628].

7.3.1 Protilátky

Jako primární protilátka byla použita protilátka rat anti- mouse makrofágy ředěná s bovinním sérovým albuminem v poměru 1:100 (Pharmlingen, USA).

Jako sekundární protilátka byla použita protilátka ImmPress goat anti- rat Ig ředěná s myším sérem (Vector laboratories, USA).

7.3.2 Pracovní postup

Sklička s tkáňovými řezy se nejprve nechala 20 minut při laboratorní teplotě. Následně byla vložena do acetonu, který se uchovává při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a ponechána v něm 30 minut. Poté se sklička nechala 20 minut schnout při laboratorní teplotě.

Při prvním kroku analýzy byla sklička ponořena do kyvety s roztokem PBS (fosfátový pufr, který se používá k oplachování) na 5 minut.

Následoval blokační krok analýzy, kdy se nanoslo 25 µl ready - to - use normal goat serum na každý řez. Toto sérum se užívá k zablokování nespecifické reakce, aby nedocházelo k navázání protilátky k jiným než požadovaným antigenům. Sérum bylo ponecháno na řezech 30 minut.

Následně bylo aplikováno 25 µl primární protilátky na každý řez a proběhla inkubace při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Poté se skla oplachovala 2x5 minut v roztoku PBS a inkubovala 15 minut v 3 % peroxidu vodíku, aby došlo k zablokování enzymu peroxidázy, který se přirozeně vyskytuje ve tkáni. Po dalším oplachu v roztoku PBS 2x5 minut se na řezy nanosla sekundární protilátka v množství 25 µl. Po 30 minutové inkubaci se řezy opět opláchly v roztoku PBS 2x5 minut. Poté bylo na každý řez aplikováno 25 µl činidla DAB, které se používá pro zvýraznění reakce).

Po proběhlé inkubaci s činidlem DAB, která trvala 5 vteřin, následoval krátký oplach řezů v PBS a jejich přenesení do kyvety s destilovanou vodou. Poté se řezy ponořily na 5 vteřin do ředěného hematoxylinu a pak byly 1 minutu oplachovány pod tekoucí vodou, aby došlo ke zmodrání jader buněk.

Následovalo odvodnění řezů v odvodňovací řadě. Nejprve byla sklíčka krátce opláchnuta v acetonu. Poté byla ponořena do aceton - xylenu (10:1) na 3 minuty, do aceton-xylenu (1:10), také na 3 minuty a nakonec do xylenu na 3x2 minuty. Nakonec byly řezy ukotveny v eukittu.

7.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza

Kvantifikace plochy exprese makrofágů byla provedena prostřednictvím stereologických metod. Po nakrájení série o 100 řezech síly 7 µm se z referenčního objemu řezy systematicky náhodně vybraly. Pro každé barvení se první řez vybral náhodně, potom byl vybrán každý dvanáctý řez. Tím pádem osm barvených řezů se použilo ke stereologickému hodnocení. Použila se metody bodové testovací mřížky, ta se volila tak, aby bylo napočítáno přes 100 průsečíků mezi body sítě a barvením na makrofágy na jednu z cév. Odhadovaná barvená plocha se vypočítala dle vzorce:

$$estA = a * P,$$

kde a je plocha odpovídající 1 testovacímu bodu, P znamená počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení [Nachtigal, 2004].

7.4.1 Statistická analýza

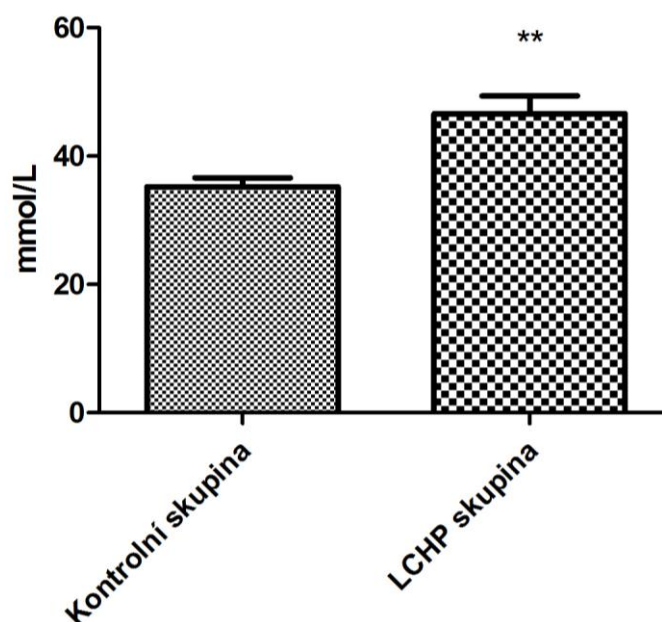
Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SEM (střední chyba průměru) pro šest myší v každé skupině. Statistická významnost rozdílů ve skupinách se hodnotila t-testem za použití softwaru GraphPad Prism 5.0. *P* hodnoty 0,05 nebo menší byly považovány za statisticky významné

8. Výsledky

8.1 Biochemická analýza

Biochemická analýza sledovala hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší. Z výsledků vyplývá, že hodnoty celkového cholesterolu se u obou skupin významně liší (viz graf 1).

Graf 1: Hodnoty celkového cholesterolu u dvou skupin myší.

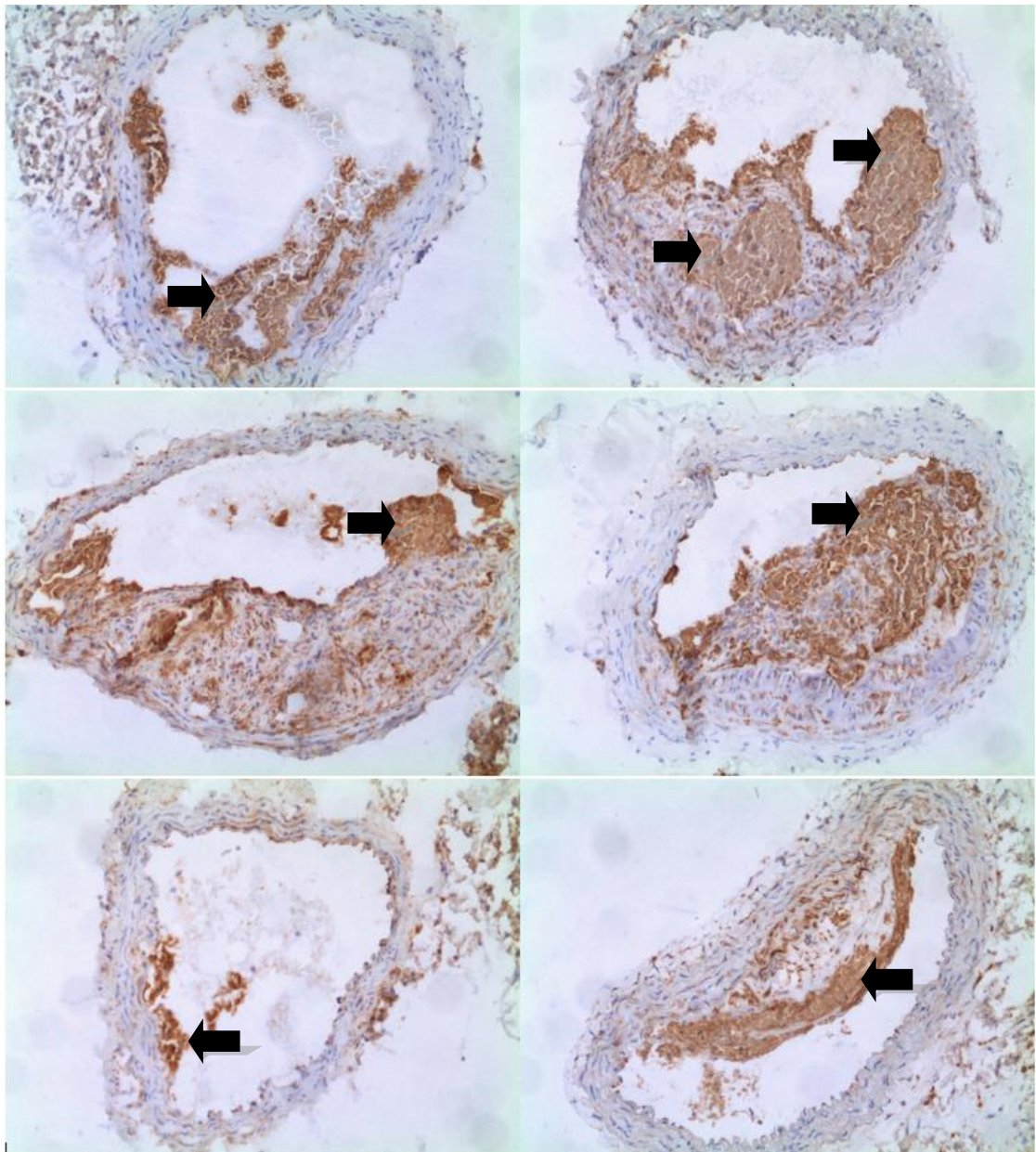


Podávání LHCP diety vedlo ke statisticky významnému zvýšení hladiny celkového cholesterolu, v porovnání s kontrolní skupinou myší (**P=0,0044)

8.2 Imunohistochemická analýza

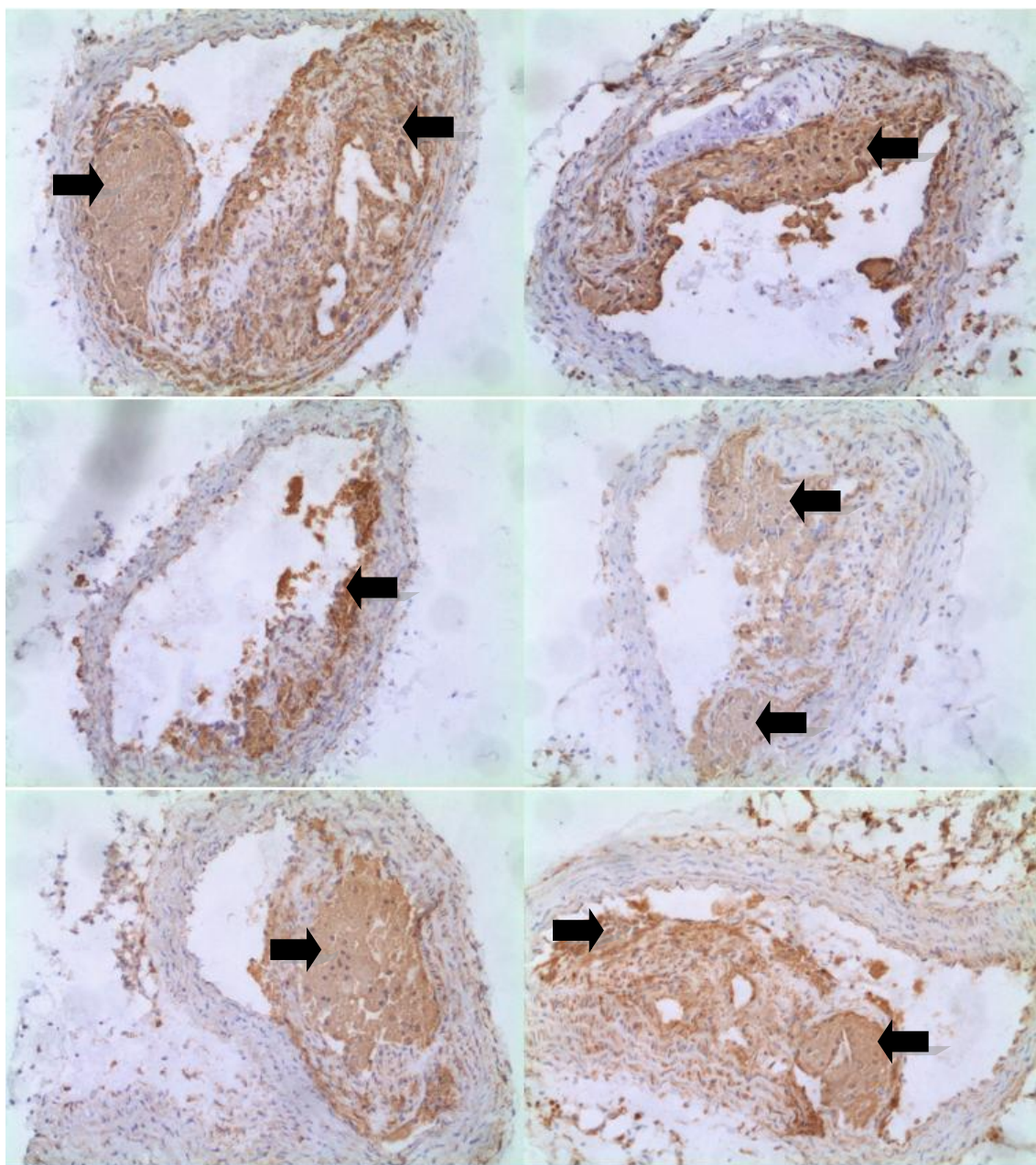
Imunohistochemická detekce makrofágů byla provedena na 96 sklíčkách s řezy z obou skupin myší. Imunohistochemická analýza potvrdila přítomnost makrofágů ve všech sledovaných cévách. Jejich lokalizace v plátu nebyla nijak specifická. Obecně byly menší pláty plné makrofágů a u větších byly jakoby ostrůvky makrofágů. Makrofágy byly také detekovány v intima media u některých cév (obr. 9). Obecně lze říci, že množství makrofágů se zdálo být větší u myší ze skupiny, kterým byla dávana LCHP dieta (obr 10). Všech 96 řezů bylo použito pro stereologickou analýzu.

Obrázek 9: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení makrofágů u kontrolní skupiny zvířat. Makrofágy jsou zobrazeny jako hnědá barva uvnitř aterosklerotických plátů (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.



Obrázek 10: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení makrofágů u LCHP skupiny zvířat.

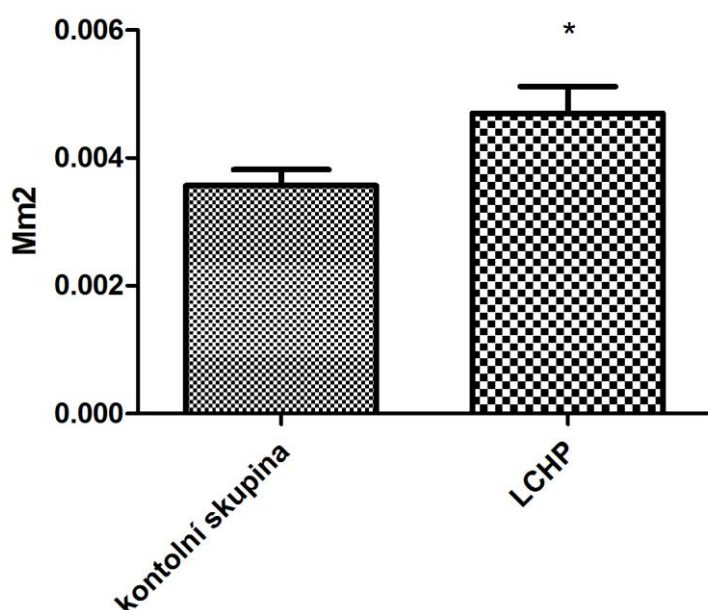
Makrofágy jsou zobrazeny jako hnědá barva uvnitř aterosklerotických plátů (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.



8.3 Stereologická analýza exprese makrofágů v arteria brachiocephalica

Stereologická analýza prokázala statisticky významné zvýšení exprese neboli přítomnosti makrofágů u myší, kterým byla podávána LCHP dieta, ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,0047 \pm 0,0004163 \text{ mm}^2$ vs. $0,003567 \pm 0,0002486 \text{ mm}^2$, $p=0,0415$ viz Graf 2).

Graf 2: Stereologická analýza exprese makrofágů v arteria brachiocephalica



Analýza prokázala statisticky zvýšení exprese makrofágů u LCHP skupiny s porovnání s kontrolní skupinou (* $p=0,0415$).

9. Diskuze

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění charakteristické hromaděním zánětlivých buněk v intimě cév, výsledkem je vznik aterosklerotického plátu a následný vznik ischemické choroby srdeční [Berliner a spol., 1995].

V této bakalářské práci byly využity pro studii apoE-LDLR receptor deficitní myši, kterým byla podávána dieta s nízkým obsahem sacharidů a vysokým obsahem proteinů (LCHP). U těchto myší jsme stanovovali množství makrofágů v aterosklerotickém plátu arteria brachiocephalica.

ApoE/LDLR deficitní myši reprezentují zvířecí model charakteristický spontánním vývojem aterosklerózy v různých částech cévního řečiště. Receptor pro lipoproteiny s nízkou hustotou (LDLR) je spojen s odstraňováním LDL a remnantních lipoproteinů obsahujících apoE a tím reguluje produkci lipoproteinů v játrech [Jawien a spol., 2005]. ApoE mají na svém povrchu všechny lipoproteinové částice, kromě LDL částic, a slouží jako vysoce afinitní ligand pro apoB receptory a remnantní receptory. Tím je umožněn specifický záchyt apoE obsahujících lipoproteinů játry. Kromě toho se apoE podílí na podpoře vylučování částic o velmi nízké hustotě (VLDL) z jater. Oba tyto proteiny jsou tedy nedílnou součástí efektivní tvorby a odstranění lipoproteinů [Olszanecki a spol., 2005].

Zvýšení hladiny cholesterolu u pokusných myší vede ke zvýšené akumulaci makrofágů v kořenu aorty, což je hlavní a referenční místo pro studium aterosklerózy u myší [Zadelaar a spol., 2007]. Bylo prokázáno, že arteria brachiocephalica představuje cévu, která je vhodná pro studium pokročilé aterosklerózy. Aterogenní dieta může vést u tohoto typu cévy až k ruptuře aterosklerotického plátu [Bond a spol., 2011].

V nedávné době Chlopicki a spol. studoval vliv rozdílných diet na vývoj aterosklerózy. Porovnával různé diety, včetně diety western typ (nejvíce používaná dieta při studiích aterosklerózy) a diety s nízkým obsahem sacharidů a vysokým obsahem proteinů (LCHP). Ze studie vyplynulo, že LCHP dieta urychluje vznik cévního zánětu. Navíc vývoj a postup aterosklerózy byl v porovnání s „western type” dietou rychlejší [Kostogrys a spol., 2012].

V této práci prokázala biochemická analýza zvýšení hladin celkového cholesterolu u myší krmených LCHP dietou v porovnání s kontrolní skupinou myší,

které byly krmeny standardní dietou. Imunohistochemická analýza prokázala, že makrofágy se nachází v aterosklerotickém plátu, tedy v tunika intima, ale také v tunika media.

Makrofágy jsou prvními buňkami zánětu, které vstupují do aterosklerotické léze, a jsou hlavní složkou aterosklerotického plátu [Takeya a spol., 2005] [Li a spol., 2005]. Zánětlivé cytokiny, které jsou produkovány makrofágy, stimulují tvorbu endoteliálních adhezních molekul, proteáz a jiných mediátorů, které mohou vstupovat do systémového oběhu v rozpustné formě. Vysoká aktivita a akumulace makrofágů je hlavním znakem nestabilního aterosklerotického plátu [Linton a spol., 2003].

Stereologická analýza v naší studii prokázala, že LCHP dieta zvětšuje množství makrofágů v arteria brachiocephalica, což naznačuje, že tato dieta přispívá ke vzniku zánětu v aterosklerotickém plátu.

Zde prezentované výsledky jsou v souladu s předchozí studií, která prokázala, že LCHP dieta, v porovnání se samotnou aterogenní dietou, vyvolává zánět a tvorbu pokročilé léze. LCHP dieta tedy, ve srovnání se samotnou aterogenní dietou, zvyšuje hromadění makrofágů v aortě [Kostogrys a spol., 2012].

Výsledky této bakalářské práce potvrzují, že LCHP dieta zvyšuje hromadění makrofágů v cévním řečišti u těch arterií, které jsou u myší nejvíce náchylné k rozvoji aterosklerózy. To naznačuje, že tato experimentální dieta je velmi aterogenní a prozánětlivá, i přesto, že obsahuje malou koncentraci sacharidů a vysokou koncentraci proteinů.

10. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit metody pro detekci makrofágů v arteria brachiocephalica myší krmených standardní dietou nebo dietou LCHP.

U myší krmených LCHP dietou došlo ke zvýšení hladiny celkového cholesterolu v krvi v porovnání s hladinami cholesterolu u myší, které byly krmené standardní dietou.

Aterosklerotické pláty s makrofágovou infiltrací byly nalezeny u všech myší, které byly zařazeny do studie.

Stereologická analýza dále prokázala u myší krmených LCHP dietou významné zvětšení plochy, ve které se makrofágy nacházely, v porovnání se skupinou myší, krmených standardní dietou.

Výsledky prezentované v této bakalářské práci potvrzují proaterogenní a prozánětlivý potenciál LCHP diety, což je příznivé pro další studie, které budou zaměřené na studium mechanismů, kterými se tato dieta podílí na progresi aterosklerózy.

11. Seznam zkratek

Apo apolipoprotein

BMI body mass index

CO oxid uhelnatý

CO₂ oxid uhličitý

CRP C- reaktivní protein

DAB diaminobenzidin

GM-CSF granulocyt-makrofágový růstový faktor

HDL lipoproteiny o vysoké hustotě

IDL lipoproteiny o intermediální hustotě

ICAM- 1 intercelulární adhezní molekula 1

ICHS ischemická choroba srdeční

IL interleukin

IM infarkt myokardu

INF- γ interferon gamma

KVO kardiovaskulární onemocnění

LDL lipoproteiny o nízké hustotě

M-CSF makrofágový růstový faktor

Mmol/l milimoly na litr

MMP makrofágové metaloproteinázy

NO oxid dusnatý

O₂ kyslík

oxLDL oxidované lipoproteiny o nízké hustotě

SR scavangerový receptor

TAG triacylglyceroly

VCAM-1 adhezní molekula 1 cévních buněk

VLDL lipoproteiny o velmi nízké hustotě

12. Seznam použité literatury

HRADEC, J., BÝMA, S.: *Ischemická choroba srdeční*. 1. Vydání. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČSL JEP, 2009. 16 s. ISBN 978-80-86998-36-7

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO J., KELLEY, R.: *Základy histologie*. 1. Vydání. Praha: H & H, 1997. s. 204, 206, 213, 214. ISBN 80-85787-37-7

KLIKA, E., VACEK, Z.: *Histologie*. 1. Vydání. Praha: Avicenum, 1974. s. 59, 179, 182- 184.

KONRÁDOVÁ, V., UHLÍK, J., VAJNER, L.: *Funkční histologie*. 2. Vydání. Praha: H & H, 2000. s. 115. ISBN 80-86022-80-3

PAUSEN, D.: *Histologie a buněčná biologie*. 1. Vydání. Praha: H & H, 2004. s. 158. ISBN 80-7319-024-9

PECKA, M.: *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patologie hemostázy*. 1. Vydání. Český Těšín: FINIDR, 2004. s. 22-23. ISBN 80-86682-03-X

LÜLLMANN, R.: *Histologie*. 1. Vydání. Praha: Grada, 2012. s. 211-213. ISBN 978-80-247-3729-4

Obrázek 1: <<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/vascular/Images/VesWall.jpg>>

IHLING, CH.: Pathomorphologie der koronaren Atherosklerose., *Herz* 1998, roč. 23, č. 2, s. 70

KLENER, P., BRODANOVÁ, M., DANZIG, V., JIRÁSEK, V., MAREČEK, Z., VOTAVA, V., ŽABKA, J.: *Vnitřní lékařství II*. 1. Vydání. Praha: Informatorium, 2001. s. 67-68. ISBN 80-86073-76-9

MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J.: *Patologie*. 1. Vydání. Praha: Grada, 2004. s. 171-172. ISBN 80-247-0785-3

NEČAS, E., ŠULC, K., VOKURKA, M.: *Patologická fyziologie orgánových systémů I*. 1. Vydání. Praha: Karolinum, 2004. s. 162. ISBN 80-246-0615-1

ŠTEINER, I.: *Kardiopatologie pro patology i kardiology*. 1. Vydání. Praha: Galén, 2010. s. 24, 26. ISBN 978-80-7262-672-4

VOLLMER, H.: *Arterioskleróza*. 1. Vydání. Praha: Pragma, 1999. s. 39-41, 69. ISBN 80-7205-923-8

RACEK, J. a spol.: *Klinická biochemie*. 2. Vydání. Praha: Galén, 2006. s. 174, 180, 183. ISBN 80-7262-324-9

ŠIMON, J. a spol.: *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. Vydání. Praha: Grada, 2001. s. 51, 89- 97. ISBN 80-247-0085-9

Obrázek 2: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/rizikove-faktory-kardiovaskularnich-onemocneni-300855>>

Obrázek 3: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/nadvaha-a-obezita-450965>>

ŽÁK, A. a spol.: *Ateroskleróza Nové pohledy*. 1. Vydání. Praha: Grada, 2011. s. 21-26, 95-96, ISBN 978-80-247-3052-3

GALLE, Jan. Atherosklerose und Arteriitis. *Herz*. 2004-2-1, roč. 29, č. 1, s. 4-11. ISSN 0340-9937. DOI: 10.1007/s00059-004-2520-5. Dostupné z: <<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>>

BRÄSEN, J., NIENDORF, A.: Atherosklerose Formale Patogenese, Klassifikation und funktionelle Bedeutung. *Der Pathologe*. 1997, roč. 18, č. 3 s. 218-219, 221. DOI: 10.1007/s002920050209. Dostupné z: <<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>>

RÖSEN, P.: Endoteliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *Journal für Kardiologie*. 2002, s. 560

Obrázek 4: <<http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki2/?p=1456>>

HALLE, M., A. BERG, M. W. BAUMSTARK a J. KEUL. LDL-Subfraktionen und koronare Herzerkrankung. *Zeitschrift für Kardiologie*. 1998, roč. 87, č. 5, s. 317-330. ISSN 0300-5860. DOI: 10.1007/s003920050187. Dostupné z: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s003920050187>>

RACEK, J. *Oxidované LDL a ateroskleróza*. Labor Actuell. 2010, č. 3, s. 12.

BHAKDI, S. *Immunopathogenesis of atherosclerosis: the Mainz hypothesis. DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 2002, roč. 127, č. 8, s. 390-394. ISSN 0012-0472. DOI: 10.1055/s-2002-20217. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2002-20217>

PAULWEBER, B. *Schutzfaktor HDL cholesterin und kardiovaskuläres Risiko. Journal für Kardiologie.* 2004, roč. 11, č. 7, s. 333-334.

SPIEKER, L., RUSCHITZKA, F., LÜSCHER, T., NOLL, G. *HDL- cholesterin bei Atherosklerose- zu wenig des Guten. Schweiz Med Forum.* 2003, č. 39, s. 920, 923.

Obrázek 5: <<http://www.biology.estranky.cz/clanky/patologie/patologie-aterosklerozy.html>>

Obrázek 6: < <http://pfyziolffup.upol.cz/castwiki2/wp-content/uploads/2011/12/5.bmp>>

MÜLLER-WIELAND, D., FAUST, M., KOTZKA, J., KRONE, W.: Mechanismen der Plaquestabilisierung. *Herz.* 1999, roč. 24, č. 1, s. 26-27. ISSN 0340-9937. DOI: 10.1007/BF03043815. Dostupné z: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF03043815>>

FIALOVÁ, D a spol.: *Klinická farmacie I.* 1. Vydání. Praha: Grada, 2010. s. 110-111. ISBN 978-80-247-3169-8

HUTYRA, M., ŠAŇÁK, D., BÁRTKOVÁ, A., TÁBORSKÝ, M.: *Kardioembolizační ischemické cévní mozkové příhody.* 1. Vydání. Praha: Grada, 2011. 168 s. ISBN 978-80-247-3816-1

ŠTEJFA, M. a spol.: *Kardiologie.* 3. Vydání. Praha: Grada, 2007. s. 677. ISBN 978-80-247-1385-4

NEČAS, E. a spol.: *Obecná patologická fyziologie.* 1. Vydání. Praha: Karolinum, 2005. s. 174. ISBN 80-246-0051-X

VOJÁČEK, J, MALÝ, M. a spol.: *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi.* 1. Vydání. Praha: Grada, 2004. s. 40. ISBN 80-247-0501-X

AUER, J., BERENT, R., EBER, B., KIRCHGATTER, A., MAUER, E., MAYR, H., PORODKO, M., WEBER, T.: *Koronare Atherosklerose und Plaqueinstabilität:*

pathophysiologische Konzepte und deren klinische Bedeutung. *Journal für Kardiologie*. 2000, roč. 7, č. 10, s. 394-401

MAIURI, M., GRASSIA G., PLATT A., CARNUCCIO R., IALENTI A., MAFFIA, P. Macrophage Autophagy in Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2013. Roč. 2013 DOI: 10.1155/2013/584715. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/584715/>

GUI, T., SHIMOKADO, A., SUN Y., AKASAKA, T., MURAGAKI Y., MAFFIA, P. Diverse Roles of Macrophages in Atherosclerosis: From Inflammatory Biology to Biomarker Discovery. *Mediators of Inflammation*. 2012, roč. 2012, s. 1-14. ISSN 0962-9351. DOI: 10.1155/2012/693083. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2012/693083/>

HOEKSEMA, A., STÖGER J., WINTHER M.: Molecular Pathways Regulating Macrophage Polarization: Implications for Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 2012, roč. 14, č. 3, s. 254-263. ISSN 1523-3804. DOI: 10.1007/s11883-012-0240-5. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11883-012-0240-5>

WITTING, PK., PETTERSSON, K., OSTLUND, AM., WESTERLUND, C., ERIKSSON, AW, STOCKER, R.: Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxydation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb j*. 1999, 13: s. 667-675

JAWIEN, J., NASTALEK, P., KORBUT, R.: Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology*. 2004, 55, 3, s. 503-517

AIGNER, B., WOLF, E.: Genetische Prädisposition für erhöhte Blutcholesterinwerte im Mausmodelle. *Biol. unserer Zeit*, 2005, roč. 35, č. 1 s. 14-15

ImmPRESS Anti-Rat Ig, Mouse adsorbed (peroxidase) Polymer Detection Kit [online]. [cit. 2013-03-19]. Dostupné z <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=1730>

Obrázek 7: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fosfolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141>>

Obrázek 8: <<http://www.biology.estranky.cz/img/picture/16/ateroskleroza5.JPG>>

NACHTIGAL, P. a spol. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 2004; 200, 219

BERLINER, J., NAVAB, M., FOGELMAN, A., FRANK, J., DEMRE, L., EDWARDS, P., a spol. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-96.

JAWIEN, J., GAJDA, M., MATEUSZUK, L., OLSZANECKI, R., JAKUBOWSKI, A., SZLACHCIC, A. a spol. Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2005;56:483-9.

OLSZANECKI, R., JAWIEN, J., GAJDA, M., MATEUSZUK, L., GEBSKA, A., KORABIOWSKA, M. a spol. Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2005;56:627-35.

ZADELAAR, S., KLEEMANN, R., VERSCHUREN, L., DE VRIES-VAN DER WEIL, J., VAN DER HOORN, J., PRINCEN, H. a spol. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1706-21.

BOND, A., JACKSON, C. The fat-fed apolipoprotein E knockout mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011;2011:379069.

KOSTOGRYS, R., FRANCZYK-ZAROW, M., MASLAK, E., GAJDA, M., MATEUSZUK, L., JACKSON, C. a spol. Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR(-/-)). *Atherosclerosis* 2012;223:327-31.

TAKEYA, M. Monocytes and macrophages--multifaced cell population involved in inflammation, atherosclerosis, and obesity 2005;63 Suppl 4:117-22

LI, G., SANDERS, J., PHAN, E., LEY, K., SAREMBOCK, I. Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express p-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein e-deficient mice. *Am J Pathol* 2005;167:1511-8.

LINTON, M., FAZIO, S., Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27 Suppl 3:S35-40.

