

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



Sledování exprese endoglinu a eNOS
u normocholesterolemických myších

The study of endoglin and eNOS expression
in normocholesterolemic mice

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Vypracovala:

Veronika Fuxová

Hradec Králové 2011

„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 titulu nebo stejného titulu.“

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD za odborné vedení, cenné rady a za příjemnou spolupráci při sestavování mé diplomové práce. Děkuji také mé rodině a přátelům za podporu a povzbuzení.“

Abstrakt:

Veronika Fuxová

Sledování exprese endoglinu a eNOS u normocholesterolemických myší

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce (Zadání):

Cílem práce bylo popsat expresi endoglinu a eNOS v aortě u 2 kmenů myší s rozdílnou predispozicí k ateroskleróze.

Metody:

Použili jsme normocholesterolemické samice myší ze dvou odlišných kmenů, z kmene C3H/HEJ a z kmene CB57BL/6J, který je náchylnější k ateroskleróze. Obě skupiny myší byly krmeny stejnou stravou po dobu 12 týdnů. Poté jsme provedli biochemickou analýzu vzorků krve a dále imunohistochemickou analýzu odebraných segmentů tkáně z aorty. Na detekci endoglinu jsme použili metodu Avidin-Biotin (ABC) s detekcí pomocí DAB a na detekci eNOS metodu En Vision opět s detekcí pomocí DAB.

Výsledky:

Biochemická analýza prokázala zvýšení hladin celkového cholesterolu, VLDL, TG i HDL u kmene C3H/HEJ. Pomocí imunohistochemické analýzy se prokázala detekce endoglinu a eNOS na cévním endotelu aorty. Výsledky ukazují, že exprese endoglinu i eNOS je významnější u skupiny CB57BL/J6 ve srovnání se skupinou C3H/HEJ.

Závěr:

Expese protektivních proteinů endoglinu a eNOS byla vyšší u kmene CB57BL/J6, který má větší dispozici k ateroskleróze, ve srovnání s méně náchylným kmenem C3H/HEJ.

Abstrakt:

Veronika Fuxová

The study of endoglin and eNOS expression in normocholesterolemic mice

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background (Task):

The aim of this diploma was describe the expression of endoglin and eNOS in the aorta in two strain of mice with different predisposition to atherosclerosis.

Methods:

We used female normocholesterolemic mice from strain C3H/HEJ and from strain CB57BL/6J, which is more susceptible to atherosclerosis. Both groups of mice were fed with chow diet for 12 weeks. Then we performed biochemical analysis of blood specimen and imunohistochemical analysis of segments of tissue from the aorta. To detect expression of endoglin was used Avidin-Biotin Method (ABC) with DAB visualization, to detect expression of eNOS was used En Vision Method again with DAB visualization.

Results:

Biochemical analysis showed increase levels of total cholesterol, VLDL, TG and HDL in the strain C3H/HEJ. The imunohistochemical analyse demonstrated expression of endogline and eNOS in endothel of aorta. The results showed that expression of endogline and eNOS is more significant in strain CB57BL/J6 than in strain C3H/HEJ.

Conclusion:

The expression of endoglin and eNOS was higher in strain CB57BL/6J, which is more susceptible to atherosclerosis compared with strain C3H/HEJ.

Obsah:

1	ÚVOD	7
2	MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	8
2.1	TYPY CÉV	8
2.2	HISTOLOGICKÁ STAVBA KREVNÍCH CÉV	8
2.2.1	<i>Obecná stavba krevních cév</i>	8
2.2.2	<i>Specifická stavba krevních cév</i>	9
3	ATEROSKLERÓZA	14
3.1	EPIDEMIOLOGIE	15
3.2	RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY	15
3.2.1	<i>Neovlivnitelné rizikové faktory</i>	15
3.2.2	<i>Ovlivnitelné rizikové faktory</i>	16
3.3	PATOGENEZE ATEROSKLERÓZY	18
3.3.1	<i>Lipoproteiny a jejich význam v patogenezi aterosklerózy</i>	18
3.3.2	<i>Dysfunkce endotelu</i>	21
3.3.3	<i>Monocyty a makrofágy v patogenezi aterosklerózy</i>	22
3.3.4	<i>Buňky hladké svaloviny v patogenezi aterosklerózy</i>	23
3.3.5	<i>Morfologie aterosklerotických změn</i>	24
3.4	KLINICKÁ MANIFESTACE ATEROSKLERÓZY	27
4	MYŠÍ MODELY	28
4.1	OBECNÝ ÚVOD K MODELŮM ATEROSKLERÓZY.....	28
4.2	MYŠÍ MODELY	28
5	ENDOGLIN	30
6	ENDOTELIÁLNÍ NO – SYNTÁZA (ENOS)	33
6.1	IZOFORMY NO – SYNTÁZY	33
6.2	TVORBA OXIDU DUSNATÉHO A JEHO FUNKCE V ORGANISMU	33
6.3	STRUKTURA A FUNKCE NO – SYNTÁZY	35
6.4	REGULACE ENOS	36
7	CÍL PRÁCE (ZADÁNÍ)	38
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
8.1	ZVÍŘATA.....	39
8.2	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	39
8.3	IMUNOHISTOCHEMIE.....	40
8.3.1	<i>Imunohistochemická detekce exprese endoglinu</i>	40
8.3.2	<i>Imunohistochemická detekce exprese eNOS</i>	42
8.4	STATICKÁ ANALÝZA.....	43
9	VÝSLEDKY	44
9.1	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	44
9.2	IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA.....	45
10	DISKUZE	50
11	ZÁVĚR	53
12	PŘEHLED ZKRATEK	54
13	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	56

1 ÚVOD

Kardiovaskulární choroby (KVO) jsou řazeny mezi civilizační choroby. Postihují především obyvatele průmyslově rozvinutých zemí, ve kterých jsou také hlavní příčinou úmrtnosti. Celkově jsou kardiovaskulární onemocnění zodpovědná za 30% všech úmrtí. Na nejvyšším místě pomyslné stupnice mortality KVO je ischemická choroba srdeční (ICHS) (1). Vzniká na podkladě nepoměru metabolických nároků myokardu a možnostmi prokrvení koronárními tepnami, které zásobují myokard kyslíkem a živinami. Tento nepoměr je většinou dán zúžením lumen koronárních cév aterosklerotickými pláty. Dochází k vývoji ischemie nebo ve vážnějším případě k nekróze srdečního svalu, která provází infarkt myokardu (2).

Ateroskleróza může poškozovat i jiné cévy, průběh je ale vždy stejný. Ve stěně tepny vznikne aterosklerotický plát, který zužuje tepnu a může hemodynamicky ovlivňovat průtok krve. Nebezpečí ale vzniká teprve při erozi nebo prasknutí plátu. Odhalená tkáň je vysoce trombogenní a na místě ruptury rychle vzniká krevní sraženina, která může cévu ucpat. Může se také od cévní stěny odtrhnout a krevním oběhem se dostává do menších periferních cév, které ucpává. V případě tepen dolních končetin se vyvíjí onemocnění ICHDK (ischemická choroba dolních končetin), v případě mozkových tepen může dojít ke vzniku cévní mozkové příhody (2).

Ovlivnit průběh onemocnění lze na základě farmakologické či nefarmakologické léčby rizikových faktorů. Ovlivnit můžeme hypercholesterolemii, kouření, arteriální hypertenzi, diabetes mellitus, obezitu, a s tím související fyzickou inaktivitu. Některé faktory však ovlivnit nejdou, jedná se o věk, pohlaví a genetickou dispozici.

V současné době se vylepšuje situace a pokles úmrtí na KVO klesá. Tento stav je vysvětlován především stále se zlepšující zdravotnickou péčí, zlepšující se farmaceutickou péčí a zaváděním nových léků, dobrou prevencí a informovaností veřejnosti (1).

2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

2.1 Typy cév

Rozlišujeme cévy krevního a lymfatického vaskulárního systému (3).

Krevní vaskulární systém tvoří srdce a krevní cévy, které dělíme na artérie, vény a kapiláry. Artérie jsou eferentní cévy, které dopravují krev s živinami a kyslíkem do tkání. Vény naopak odvádějí krev s oxidem uhličitým a dalšími produkty metabolismu směrem k srdci. Kapiláry spojují arteriální a venózní oddíl oběhového systému, vytváří rozvětvenou síť v tkáních a jejich prostřednictvím dochází k výměně látek mezi krví a tkáněmi.

Lymfatický vaskulární systém je tvořen systémem lymfatických cév. Ty vznikají jako slepě začínající lymfatické kapiláry, které se spojují do cév větších, ústící do velkých vén krevního systému. Jejich funkce spočívá v navrácení tkáňového moku a cirkulaci lymfocytů a jiných imunitních faktorů (3,4).

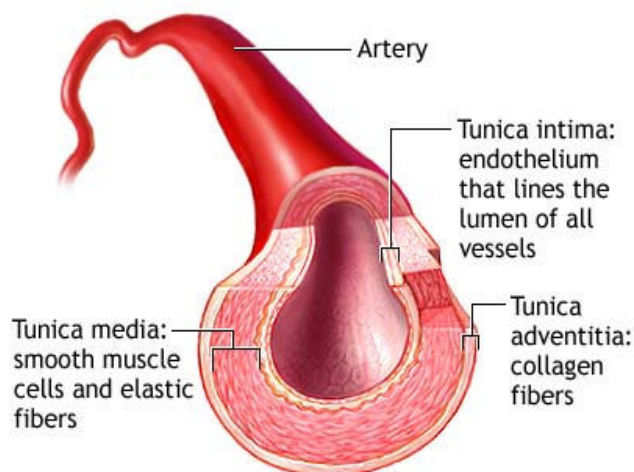
V této části se podrobněji podíváme na krevní vaskulární systém.

2.2 Histologická stavba krevních cév

2.2.1 Obecná stavba krevních cév

Stavba všech krevních cév je v podstatě stejná a skládá se ze 3 vrstev (4).

Nejvnitřnější tunica intima, uprostřed tunica media a vnější vrstva se nazývá tunica adventitia.



ADAM.

Obrázek 1: stavba cévní stěny

<http://www.healthline.com/adamimage?contentId=1-000159&id=19194> (20.4.2011) (5)

■ **Tunica intima** je nejnvnitřnější vrstva, která ohraničuje lumen cévy, je tvořena vrstvou endotelových buněk. Jedná se o ploché buňky, obvykle protažené ve směru toku krve. Obsahují velký počet mikrofilament, což patrně souvisí s předpokládanou kontraktilitou endotelové vrstvy. Buňky leží na bazální membráně, také označovaná jako lamina basalis. Jsou spolu propojeny prostřednictvím zonula occludens umožňující transport látek. Pod endotelem se nachází subendotelová vrstva tvořená řídkým kolagenním vazivem, může obsahovat i buňky hladké svaloviny. Oba elementy se vyznačují podélným uspořádáním (4).

■ **Tunica media** je střední vrstva ležící vně od intimy, od níž je oddělena vrstvou lamina elastica interna. Jak název napovídá je tvořena elastickými vlákny, mezi nimi jsou otvory (fenestrae), které umožňují difúzi živin do hlubších partií stěny cév. Hlavní složkou medie jsou buňky hladké svaloviny skládající se do koncentrických vrstev (3,6).

■ **Tunica adventitia** je vnější vrstva cév, od medie bývá oddělena vrstvou lamina elastica externa. Adventicie je tvořena především podélně orientovanými kolagenními vlákny, mohou se zde vyskytovat i buňky hladké svaloviny. Postupně přechází do vaziva orgánu, kterým céva prochází (3).

Výživa stěn drobných cév je zajišťována difúzí látek z krve protékající cévou. Cévy s průměrem větší než 1 mm mají vyvinutý systém vlastních cév, které nazýváme vasa vasorum. Větví se v adventicii a zevních oblastech medie (3). Tyto vrstvy jsou totiž příliš silné na to, aby se uživily difúzí z lumen (4).

2.2.2 Specifická stavba krevních cév

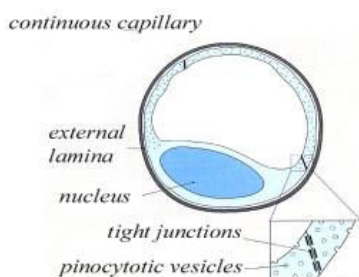
■ Kapiláry

Představují základní cévní jednotku s příčným průřezem 7 μm i méně (6). Jejich délka se obvykle pohybuje mezi 0,25 – 1 mm, ve výjimečných případech může dosahovat i délky 50 mm (4).

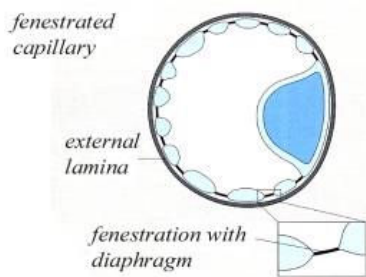
Mohou být uspořádány ve formě ploché sítě nebo houbovité struktury. Obecně platí, že intenzita metabolismu daného orgánu podmiňuje hustotu kapilární sítě (6).

Kapiláry jsou tvořeny jednou vrstvou endotelových buněk nasedající většinou na bazální membránu. Podél kapilár nacházíme také pericyty, jedná se o mezenchymové buňky s dlouhými výběžky, které obklopují stěnu kapilár a nahrazují vrstvu tunica media, která u kapilár chybí. Pericyty jsou zajímavé tím, že mají schopnost se transformovat v jiné buňky. Vrstva tunica adventitia u kapilár rovněž chybí a je nahrazena jen tenkou vrstvou kolagenních vláken (4).

Podle struktury endotelových buněk a charakteru bazální laminy se kapiláry rozdělují do 4 skupin (3).



souvislé neboli somatické – jsou charakterizované endotelovými buňkami ležící na bazální membráně, nenacházíme ani fenestrace ani póry. Setkáváme se s nimi ve svalech, vazivech, exokrinních žlázách a nervové tkáni. Transport zajišťují pinocytární váčky.



fenestované neboli viscerální – jsou tvořené endotelovými buňkami, mezi kterými se nachází otvory (fenestrace) o velikosti 60-80 nm uzavřené přepážkou (diafragmou). Tento typ kapilár nacházíme v orgánech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi tkáněmi a krví, jedná se o střeva nebo žlázy s vnitřní sekrecí (3).

obrázek 2 – 3 souvislá a fenestovaná kapilára

<http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection2/Cardiovascular03.htm> (20.4.2011) (7)

kapiláry s póry – jako póry si představíme otvory podobné fenestracím s tím rozdílem, že nejsou přepaženy diafragmou. Jsou charakteristické pro ledvinový glomerulus (3).

sinusoidní kapiláry – jsou typické nepravidelným až 30 µm širokým průsvitem (6), typické jsou četné fenestrace bez diafragmat, bazální lamina není souvislá a mezi endoteliemi se mohou vyskytovat makrofágy. Jejich struktura usnadňuje výměnu látek mezi krví a tkáněmi. Vykytují se především v játrech a hematopoetických systémech jako je kostní dřev a slezina (4).

Kapiláry plní trojí důležitou funkci, v první řadě jde o výměnu látek mezi tkáněmi a krví a to pomocí pórů, fenestrací, pinocytárních váčků nebo volnou difúzí. Dále se jedná o funkci metabolickou. Endotelové buňky například odbourávají lipoproteiny, či aktivují nebo inhibují řadu látek viz. serotonin, bradykinin, prostaglandiny atd (8). Třetí funkcí je úloha při hemostáze, endotelová vrstva zabraňuje koagulaci (4).

■ **Artérie**

Artérie dělíme na arterioly, svalové artérie a elastické artérie (4).

Arterioly mají v průměru méně než 0,5 mm. Obsahují všechny tři výše zmíněné vrstvy. Endotelová vrstva je zajímavá tím, že obsahuje tyčinkovitá Weibel- Paladeho granula obsahující Willebrandův faktor nezbytný pro koagulaci krve. Subendotelová vrstva je velmi tenká a lamina elastica interna většinou chybí. Tunica media je tvořená 1-5 vrstvami cirkulárně uspořádanými buňkami hladké svaloviny a na ní navazuje rovnou tunica adventitia (3).

Artérie svalového typu jsou artérie malého a středního kalibru, od arteriol se liší zřetelně vyvinutou vrstvou lamina elastica interna a mohutnou vrstvou medie, která je tvořena až 40 koncentricky uspořádanými vrstvami buněk hladké svaloviny, obsahuje také elastická vlákna v závislosti na kalibru arterie, tunica adventitia je typicky tenká, tvořená kolagenními a elastickými vlákny. Tohoto typu je většina arterií v lidském těle (3).

Artérie elastického typu jsou artérie velkého kalibru, patří mezi ně aorta, její velké větve a truncus pulmonalis (3). Vyznačují se silně vyvinutou subendotelovou vrstvou s podélně orientovanými vazivovými vlákny, které hrají důležitou roli při deformaci endotelu během rytmických kontrakcí a dilatací tepen (4).

Na ní navazuje lamina elastica interna, která se ale většinou nedá odlišit od ostatních elastických blan nacházející se v medii. Medie je tedy složena z koncentricky uspořádaných perforovaných elastických membrán označovaných také jako membranae fenestrae. Zvětšují se s postupným ukládáním elastinu, s věkem se také zvyšuje jejich počet. Vysokým obsahem elastinu je podmíněno žlutavé zbarvení arterií. Mezi elastickými lamelami se nachází také buňky hladké svaloviny a retikulární vlákna. Tunica adventitia je poměrně slabá a obsahuje elastická a kolagenní vlákna (4).

Funkce arterií velkého kalibru spočívá v odvádění krve směrem od srdce, tlumí velké tlakové rozdíly vznikající srdeční činností. Během systoly jsou elastické lamely rozpínány a snižují tak tlakovou výchylku, při diastole zase elastická bandáž udrží arteriální tlak na potřebné výši. Svalové artérie slouží především jako distribuční cévy rozvádějící krev s živinami k daným orgánům. Jejich svalová vrstva navíc umožňuje regulovat krevní zásobení orgánů pomocí kontrakce a relaxace (4,8).

■ Vény

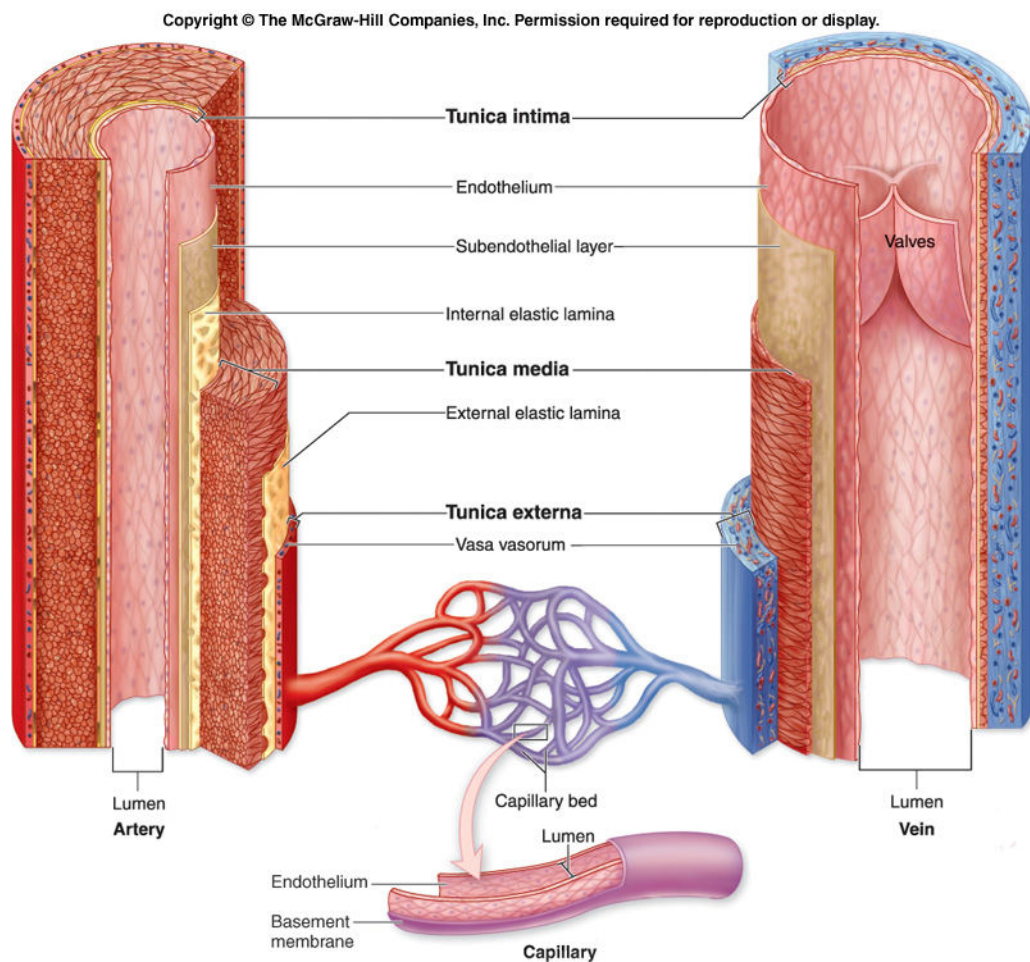
Vény se dělí podle průsvitu na venuly, malé, střední a velké vény.

Je zde několik strukturní a také funkčních odlišností od arterií. Vény mají vždy silnější vrstvu adventicie na rozdíl od arterií, u kterých dominuje medie. Dále při stejném průměru vény i artérie má vena celkově stěnu slabší a větší lumen než artérie. Díky tomu mají vény podstatně větší kapacitu krve než artérie, viz obrázek 4 (4).

Venuly mají průměr 0,2 – 1 mm, jedná se o slabostěnné cévy složené z endotelu, tenké medie a adventicie, která je tvořena podélně uspořádanými kolagenními vlákny.

Malé a střední vény jsou charakterizované průměrem 1-9 mm, stavbou se podobají venulám, jejich endotel se ale vyznačuje přítomností chlopní. Chlopně jsou poloměsíčitě záhyby intimy, které vyčnívají do lumen vény. Obsahují elastické vazivo, kryté po obou stranách endotelem. Umožňují jednosměrný tok krve (4,6).

Velké vény mají dobře vyvinutou intimu, vrstva medie je mnohem tenčí s několika vrstvami hladkých svalových buněk. Nejsilnější je opět vrstva adventicie. Vény ležící pod úrovní srdce mají v této vrstvě i podélně svazky hladké svaloviny, které slouží k zesílení stěny, zabránění roztažení vény a spolu s chlopněmi a kontrakcemi okolních příčně pruhovaných kosterních svalů umožňují čerpat krev proti působení gravitace zpět do srdce. U dutých a plicních žil, které ústí či vycházejí ze srdce se v této oblasti nachází v adventicii i srdeční svalovina (3,4).



Obrázek 4 – rozdíl ve stavbě artérie a vény

http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Cardiovascular%20System.htm (20.4.2011) (9)

V poslední době se změnil názor na funkci hladké svaloviny cévní stěny, zajišťuje nejen kontrakci a dilataci, ale syntetizuje řadu produktů, jako je kolagen, elastin, či mukopolysacharidy. Při reakci na poškození cévní stěny mají buňky hladké svaloviny schopnost migrace z medie do intimy, kde proliferuje a fagocytuje, tím se mj.účastní v patogenezi aterosklerózy (8).

3 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je pomalu postupující onemocnění tepen, které je příčinou více než poloviny úmrtí v západních průmyslových státech (10). Jedná se o proces, při kterém se do stěny tepen ukládají krevní lipidy a vyvíjí se aterosklerotické pláty, které jednak zužují lumen cévy a omezují průtok krve a jednak mohou prasknout, přičemž v místě ruptury se vytvoří krevní sraženiny, která mohou tepnu zcela uzavřít (1).

Často se v praxi stává, že je zaměňován pojem ateroskleróza a arterioskleróza. Ateroskleróza je onemocnění velkých a středních tepen, můžeme jmenovat například věnčitě tepny, aortu, krkavice, artérie dolních končetin, či ilické tepny. Arterioskleróza je pojem širší, který zahrnuje výše uvedenou aterosklerózu, dále arteriolosklerózu, která postihuje malé artérie a arterioly a Mönckebergovu mediokalcinózu (11). Ta se projevuje kalcifikací medie, lumen cévy i průtok krve je zde normální, ale kalcifikace medie je provázena ztrátou arteriální elasticity a její zvýšenou rigiditou. Jedná se především o tepny končetin (12,13).

Ateroskleróza je onemocnění charakterizované ložiskovou tvorbou vazivových plátů intimy, uvnitř těchto plátů se nachází kašovitá hmota bohatá na tukové látky. Z této skutečnosti vychází název aterosklerózy, konkrétně z řeckého slova *athero* překládáno jako kaše. Skleróza pochází z řeckého slova *sklerós* neboli tvrdý, což souvisí s kalcifikací plátů a následným ztvrdnutím cévy (11).

3.1 Epidemiologie

Ve vyspělých zemích Evropy a Severní Ameriky patří ateroskleróza mezi nejčastější příčiny smrti. Umírá na ní téměř 50% lidí, přičemž ve 20-25% se jedná o aterosklerózu věnčitých tepen srdce. Naopak v rozvojových zemích Afriky, Střední a Jižní Ameriky a Asie je toto onemocnění mnohem vzácnější, či není vůbec. Tyto geografické rozdíly jsou především dány zevními faktory, hlavně způsobem života. Ateroskleróza je daná v epidemiologických studiích obvykle četností infarktu myokardu. Incidence začala prudce stoupat ve 20.století, některé zdroje tvrdí, že se ateroskleróza stala nejhorší epidemií 20.století. V současné době je patrný pozvolný pokles onemocnění, zřejmě jako důsledek osvěty a boje proti rizikovým faktorům v rámci prevence kardiovaskulárních onemocnění (1,13).

3.2 Rizikové faktory aterosklerózy

K rozvoji aterosklerózy napomáhají rizikové faktory. Rozlišujeme rizikové faktory neovlivnitelné (endogenní) a ovlivnitelné (1).

3.2.1 Neovlivnitelné rizikové faktory

■ **věk** časné aterosklerotické změny začínají již v dětství, ale klinicky se projevují až v dospělosti (13). U mužů se klinické projevy aterosklerózy objevují dříve než u žen, zvýšené riziko mají již muži starší 45 let, u žen je riziková hranice stanovena 55. rokem života, tento desetiletý rozdíl je připisován protektivnímu vlivu ženských pohlavních hormonů.

■ **pohlaví** jak uvádím výše, ženy mají menší riziko rozvoje aterosklerózy díky ochrannému vlivu ženských pohlavních hormonů. Situace se mění po menopauze, kdy sekrece pohlavních hormonů ustává a četnost kardiovaskulárních nemocí se začíná zvyšovat (1,13).

■ **rodinná dispozice** výskyt kardiovaskulárních onemocnění u příbuzných prvního stupně, u mužů do 55 let věku, u žen do 65 let věku (1).

3.2.2 Ovlivnitelné rizikové faktory

■ **hyperlipidemie** jedná se především o hypercholesterolemii, čím vyšší je hladina cholesterolu v séru, tím vyšší je riziko aterosklerózy. Příčinou hypercholesterolemie je nejčastěji špatná životospráva související s nadměrnou spotřebou živočišných tuků, vajec či jednoduchých cukrů.

Vzácněji se může jednat o vlivy genetické, například u familiární hypercholesterolemie. Hypercholesterolemie bývá spojena s vysokými hladinami aterogenních lipoproteinů s nízkou denzitou tedy LDL a naopak s nízkými hladinami protektivních HDL lipoproteinů s vysokou denzitou (13).

Riziková hladina celkového cholesterolu se pohybuje kolem 6,2 mmol/l, správně by měla být nižší než 5 mmol/l, hladina LDL cholesterolu nižší než 3 mmol/l, naopak hladina HDL cholesterolu by měla být vyšší než 1 mmol/l (1).

Zvláštním rizikovým faktorem jsou především LDL lipoproteiny, jejichž bílkovinná složka apo(a) se podobá plazminogenu, váže se na fibrin a účinkuje tak antifibrinolyticky, tedy trombogenně (10).

■ **kouření** - zvyšuje riziko úmrtí následkem koronární aterosklerózy až 2,4x u silných kuřáků až 3,5x (10). Naopak po nekouření po dobu jednoho roku klesá mortalita na ischemickou chorobu o 50%, po 10-15 letech se vyrovnává s nekuřáky (13). Škodlivý účinek má nejen nikotin se sympatomimetickými účinky, které se v oběhovém systému projeví zvýšením krevního tlaku a srdeční frekvence, ale škodlivé účinky má i CO a ostatní látky obsažené v cigaretovém kouři, například vytěsněním kyslíku oxidem uhelnatým na hemoglobinu, zvýšenou přilnavostí trombocytů, či zvýšenou propustností endotelu a jeho poškozováním (10). Kouření zvyšuje hladinu plazmatického fibrinogenu a zánětlivého indikátoru C- reaktivního proteinu (CRP) (14).

■ **arteriální hypertenze** - u hypertoniků, pacientů s tlakem vyšším než 160/95, je riziko klinické manifestace aterosklerózy 5x vyšší než u normotoniků (13).

■ **diabetes mellitus** - nebezpečí infarktu myokardu je u diabetiků 2-3x vyšší (12) „Aterogenní účinek se uplatňuje více mechanismy, například glykací LDL částic, které se tak stávají více aterogenní nebo diabetickou dyslipidemií“ (15).

■ **obezita** (BMI více jak 29) především abdominálního typu působí svým negativním vlivem na krevní tlak, na lipidy i na glukózový metabolismus. Podíl nadváhy se na zvýšeném riziku ischemické choroby srdeční odhaduje až na 45% (16).

■ **fyzická inaktivita** - pohyb zvyšuje hladinu HDL a snižuje inzulínovou rezistenci (13). V současné době se doporučuje alespoň 30 minut, 3-4x týdně, nejlépe denně (15).

■ **stresový způsob života** má nepříznivý vliv především na krevní tlak

■ **hyperurikémie** je součástí metabolického syndromu, její výskyt bývá také spojován s obezitou a triacylglycerolemií, její role v patogenezi aterosklerózy však není jasná (17).

■ **hyperhomocysteinemie** - homocystein je aminokyselina vznikající při metabolismu methioninu, zvýšené hladiny homocysteinu působí akceleraci aterosklerózy řadou mechanismů jako je například přímé poškození cévního endotelu, stimulace oxidačního stresu či proliferace buněk hladké svaloviny v cévách. I když nejsou přímé důkazy o poklesu mortality na kardiovaskulární onemocnění při snížení hladiny homocysteinu, je hyperhomocysteinemie řazena mezi rizikové faktory aterosklerózy (18).

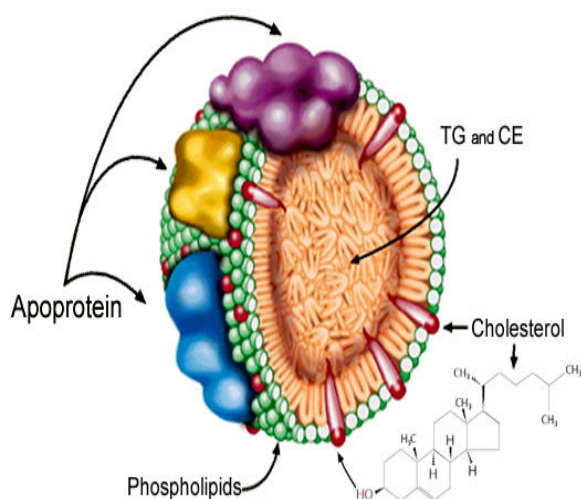
Rizikovým faktorem může být i infekce, při pátrání po etiologii zánětlivého aterosklerotického procesu byly v plátech prokázány některé mikroorganismy jako cytomegalovirus, *Helicobacter pylori* a především *Chlamydia pneumoniae*. Zatím ale nejde s jistotou říci, zda se jedná o skutečné etiologické agens aterosklerózy, nebo o sekundární kolonizaci plátu těmito infekčními agens (13).

3.3 Patogeneze aterosklerózy

Dříve se patogeneze aterosklerózy vysvětlovala jako degenerativní onemocnění tepen v důsledku víceméně pasivního ukládání lipidů do cévní stěny. V současné době se ví, že kromě poruch lipidového metabolismu se na patogenezi podílí významně i zánět, který ovlivňuje chování endotelu, ale i buněk hladké svaloviny vrstvy intimy a medie (13).

3.3.1 Lipoproteiny a jejich význam v patogenezi aterosklerózy

Lipidy jsou nezbytnými strukturálními součástmi organismů a nejvýznamnějším zdrojem energie (1). V krvi jsou lipidy transportovány ve formě kulovitých molekulárních komplexů vytvářející ve fyziologickém prostředí krve jakési mikroemulze, označujeme je jako lipoproteiny (LP) (10). Lipoproteiny jsou tedy pro organismus nezbytné, ale jejich nadbytek je jedním z faktorů přispívající k rozvoji aterosklerózy (1).

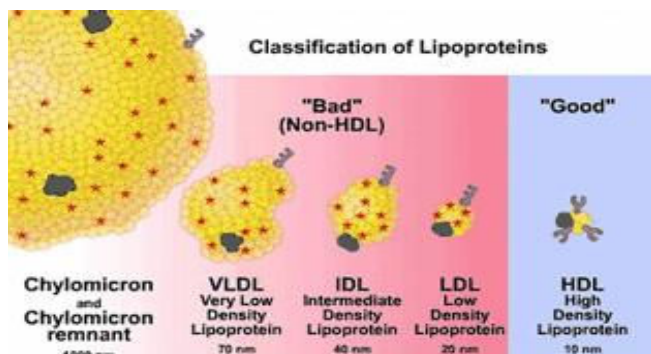


Obal lipoproteinů je tvořen amfifilními fosfolipidy a cholesterolem, a dále apolipoproteinem, což je bílkovinná složka lipoproteinu. Ta kromě strukturální funkce působí jako kofaktor některých enzymů, které se účastní metabolismu tuků a nebo jako ligand buněčných receptorů, na které se lipoproteiny váží. V jádře LP jsou pak transportovány hydrofóbní lipidy jako triacylglyceroly (TG) a estery cholesterolu (10).

Obrázek 5 – struktura lipoproteinu

<http://www.peprotech.com/content/focusarticles.htm?id=75> (21.4.2011) (19)

Jednotlivé lipoproteinové částice mají odlišné složení lipidové i bílkovinné složky, odlišnou velikost i funkci. Rozdělují se podle flotace při ultracentrifugaci na lipoproteiny vysoce denzitní (HDL), intermediárně denzitní (IDL), nízko denzitní (LDL) a velmi nízko denzitní (VLDL) a dále na chylomikrony a chylomikronové remnanty (1).



Obrázek 6 – typy lipoproteinů

<http://ladulab.anat.uic.edu/research0.html> (24.4.2011) (20)

Chylomikrony jsou syntetizovány v enterocytech a slouží k transportu lipidů přijatých potravou ze střeva k periferním tkáním. U cílových tkání aktivují svým apolipoproteinem (apoCII) endotelovou lipoproteinovou lipázu (LPL), která způsobuje odštěpení volných mastných kyselin z TG obsažených v chylomikronech.

Z chylomikronů se poté stávají **chylomikronové zbytky**, které se váží na příslušné jaterní receptory a následně jsou pohlceny endocytózou. Játra pak z těchto importovaných i nově nasyntetizovaných TG a cholesterolu vytvoří VLDL částice, které uvolňují do krve (1,10).

VLDL slouží k transportu lipidů z jater k periferním tkáním, kde svým apoCII aktivují lipoproteinovou lipázu, která odštěpuje mastné kyseliny z TG. ApoCII se ztrácí a je exponován ApoE a částice se mění na IDL, které se přibližně z 50% vrací do jater, kde se váží prostřednictvím ApoE na LDL-receptory. V játrech přijmou „náklad“ a vrací se opět jako VLDL. Z druhé poloviny IDL vznikají LDL částice charakteristické apolipoproteinem ApoB, ty transportují cholesterol jednak do jater a jednak do periferních tkání vazbou na LDL-receptory (10).

LDL částice zajišťují přísun cholesterolu všem extrahepatálním buňkám, které nejsou schopny tvořit cholesterol v množství dostatečném pro buněčný metabolismus. Na druhou stranu tyto částice stojí na počátku rozvoje aterosklerotických změn (14). Při jejich nadbytku dochází k jejich modifikaci, nejsou rozpoznávány LDL receptory a jsou přednostně vychytávány scavengerovými receptory makrofágů, ze kterých pak vznikají pěnové buňky tvořící aterosklerotický plát. Vidíme tedy, že aterogenní účinek není vázán na normální LDL částice, ale jen na částice modifikované (21). Nepříznivě působí modifikované LDL částice i na integritu endotelu cévy a podílí se na rozvoji zánětlivé reakce (14).

Je třeba říci, že LDL nepředstavují homogenní skupinu lipoproteinů. Rozdělují se na několik subfrakcí a to podle poměru apoB/lipidy, který ovlivňuje jejich velikost a hustotu. Největší aterogenní potenciál mají malé husté částice (subfrakce III a IV) označované také jako sdLDL (small dense LDL). Je to dáno tím, že jsou nejmenší a dobře pronikají endotelem a jsou také nejvíce náchylné k oxidaci (21, 22).

Opačně působí **HDL** částice, které se účastní na reverzním transportu cholesterolu z periferních tkání do jater. Cholesterol je přenášen na molekulu apoA pomocí přenašeče ABCA1 za vzniku HDL, cholesterol je následně esterifikován enzymem LCAT (lecitin-cholesterol-acyl-transferáza). Druhou možností přenosu intracelulárního cholesterolu na HDL je pomocí scavengerového receptoru SR-BI. Estery cholesterolu mohou být také přenášeny z HDL na jiné LP pomocí CETP (cholesterol ester transfer protein), stejně tak ale může HDL ostatním lipoproteinovým částicím cholesterol odebírat (22).

Část HDL je přímo vychytána játry jejich vazbou na HDL-receptory (1). Antiaterogenní působení HDL zvýrazňují ještě jeho antioxidační vlastnosti, kterými snižuje množství volných radikálů. Toto působení umožňují enzymy paraoxonáza (PON 1) a acetylhydroláza PAF (platelet activating factor) (22).

3.3.2 Dysfunkce endotelu

Chronické nebo opakované poškození endotelu a jeho dysfunkce je spouštěcím mechanismem aterosklerózy (13).

Pod poškozováním endotelu si můžeme představit například opakované poškozování intimy mechanickými vlivy, či vlivy hemodynamickými související s vysokým krevním tlakem nebo turbulencí krve v místech ohybů a větvení tepen. Často jde také o látky kolující v krevní plazmě, endotel je poškozován při hypercholesterolemii, kdy dochází ke zvýšenému ukládání LDL částic do intimy, může se jednat i o vazomotorické aminy, endotoxiny, imunokomplexy nebo o chemické součásti cigaretového kouře (13).

Jako odezva na toto poškození se endotelové buňky aktivují a začínají produkovat řadu faktorů ovlivňující jejich vlastnosti. Na jejich povrchu se exprimují adhezivní molekuly, které na sebe navazují krevní monocyty a další buňky imunitního systému. Jedná se o adhezivní molekuly VCAM -1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM -1 (intercellular cell adhesion molecule 1), či selektiny E a P. Dále produkují PDGF (platelet derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) a TGF (transforming growth factor), které způsobují proliferaci vazivové tkáně intimy. A dále jsou syntetizovány buňky vedoucí k rozvoji zánětu a chemotaxi monocytů, například IL 1 (interleukin 1), TNF α (tumor necrosis factor α) a MCP – 1 (monocyte chemotactic protein 1), či faktory podporující aktivaci makrofágů (14).

Poškozený endotel je charakterizovaný také zvýšenou permeabilitou, která usnadňuje průchod lipidů a monocytů a dalších látek. Za fyziologických podmínek částice LDL prostupují intimou cévní stěny. Zde se váží na LDL-receptory, poté jsou přeneseny do intracelulárního prostoru, kde se uvolní z částice cholesterol. Nejsou-li zachyceny tímto receptorem, váží se na scavengerové receptory monocytů – makrofágové linie nebo prostupují dále do adventicie a vasa vasorum, odkud se dostávají opět do krevního oběhu (14, 23).

Při dysfunkci endotelu je situace jiná, permeabilita cévní stěny je zvýšená a LDL částice přestupují do stěny cévy v mnohem větší míře a vlivem okolních

faktorů je většina z nich modifikována. Jedná se o modifikaci oxidací nebo glykací (14).

Glykace probíhá nejčastěji vazbou glukózy na bílkovinnou část lipoproteinu apoB (21). Jedná se o neenzymatickou glykaci za vzniku AGE (advanced glycation end produkt), neboli produktů pokročilé glykace. Dochází k ní při hyperglykemii, proto je tato modifikace častá u diabetiků a pacientů s porušenou glukózovou tolerancí (28).

Oxidace postihuje lipoproteiny častěji a probíhá hlavně v cévní stěně v subendotelovém prostoru. Dříve se předpokládalo, že k oxidaci LDL částic dochází v plazmě, ale tam tomu brání vysoká koncentrace antioxidantů. Oxidace je vyvolána reaktivními formami kyslíku, které vznikají působením enzymů nebo ionty přechodných kovů, či volnými radikály vznikající při kouření (21).

Oxidované molekuly působí aterogenně díky tomu, že jsou přednostně vázány makrofágy, ale také díky mnoha jiným faktorům mezi něž patří produkce adhezivních molekul a chemotaktických faktorů, jsou imunogenní a navozují tvorbu protilátek, indukují proliferaci hladkých svalů cévní stěny, vyvolávají poškození endotelových buněk, podporují vstup monocytů do intimy a jejich diferenciaci na makrofágy (21, 22). Způsobují pokles tvorby NO (snížením expresi genu pro eNOS), což vede opět ke zvýšené adhezi trombocytů a monocytů na endotel a k inhibici jeho vazodilatačního působení na hladkou svalovinu cév (10).

3.3.3 Monocyty a makrofágy v patogenezi aterosklerózy

Pod vlivem faktorů produkujících buňky endotelu i modifikované lipidy dochází ke kumulaci a zvýšené adhezi monocytů a trombocytů k cévní stěně (13). Monocyty přechází do intimy cévní stěny, kde dochází působením M-CSF a některých cytokinů (TNF α , INF α) k jejich diferenciaci a přeměně v makrofágy. V této fázi je především důležitá exprimace specifických scavengerových receptorů na povrch makrofágů. Jako nejvýznamnější scavengerové receptory jmenujme receptory třídy A (SR A I/II) a třídy B (CD 36, SR B1/CLA1) (22).

Tyto receptory mají podobnou strukturu jako LDL – receptory, odlišují se však tím, že jejich počet není regulován hladinou cholesterolu jako u LDL receptorů. Platí tedy přímá úměra, čím větší množství LDL částic, tím vyšší počet scavengerových receptorů. Makrofágy mají tak větší vazebnou kapacitu a přednostně vychytávají LDL částice. Po vazbě dochází k fagocytóze částice a její uskladnění v makrofágu (14, 23).

Za fyziologických podmínek, kdyby makrofág fagocytoval normální LDL částice, by se po určité době zpětnou vazbou ukončila fagocytóza a makrofág by se vrátil zpět do cirkulace. Modifikované LDL částice ale nemají schopnost zpětnou vazbou zablokovat fagocytózu a dochází k přeplnění makrofágu lipidy a k jeho přeměně na pěnovou buňku, která zůstává v subendoteliálním prostoru (24).

Makrofág nemá ale jen funkci fagocytující buňky, jedná se o aktivní buňku produkující řadu biologicky aktivních látek (22).

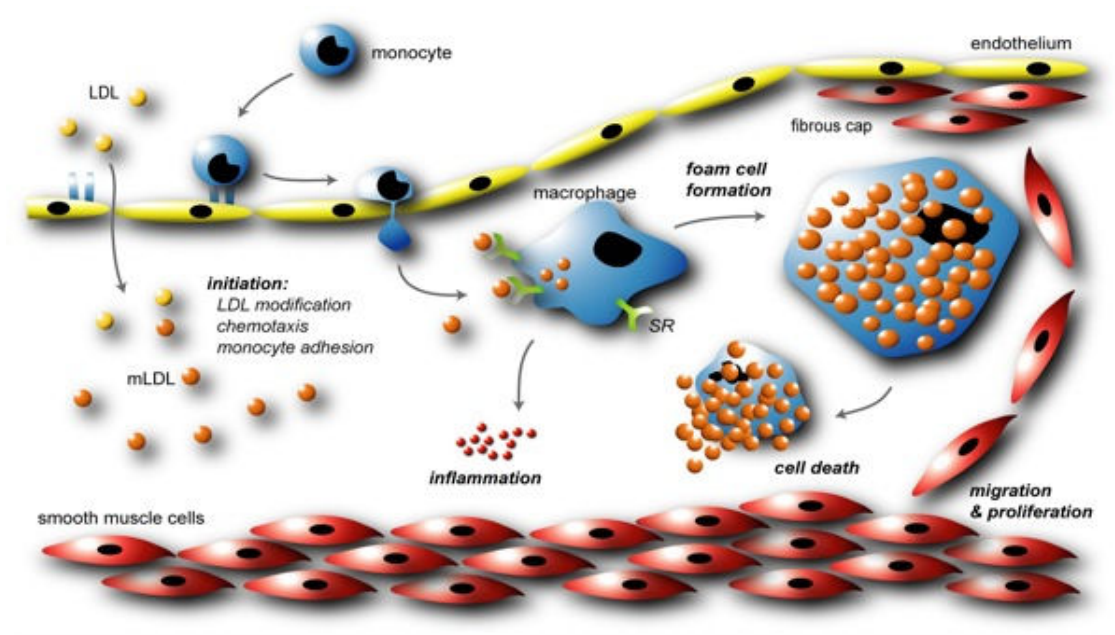
Jedná se o chemokiny stimulující další migraci monocytů a T-lymfocytů do intimy, zánětlivé cytokiny (IL-6, TNF α), mitogeny podporující proliferaci buněk hladkého svalstva, reaktivní formy kyslíku, prohlubující oxidaci LDL částic a poškozování endotelu a řadu enzymů (22). Jedná se o matrixové metaloproteinázy (MMP), které se významně podílejí na destabilizaci a následné ruptuře ateromového plátu (14).

3.3.4 Buňky hladké svaloviny v patogenezi aterosklerózy

Chemotaktické faktory monocytů a trombocytů vyvolávají migraci buněk hladké svaloviny z medie do intimy. Zde pak dochází k jejich proliferaci na základě růstových faktorů, které jsou produkovány makrofágy, aktivovanými buňkami endotelu, či trombocyty. Nejvýznamněji působí PDGF (platelet – derived growth factor) nebo FGF a TGF (14,25).

Buňky hladké svaloviny v intimně produkují kolagen, elastin a proteoglykany, které jsou později jednou z hlavních součástí sklerotického plátu (13).

Obrázek 7 – Proces aterogeneze



<http://macrophages.eu/Research/research.html> (23.4.2011) (26)

3.3.5 Morfologie aterosklerotických změn

■ tukové proužky

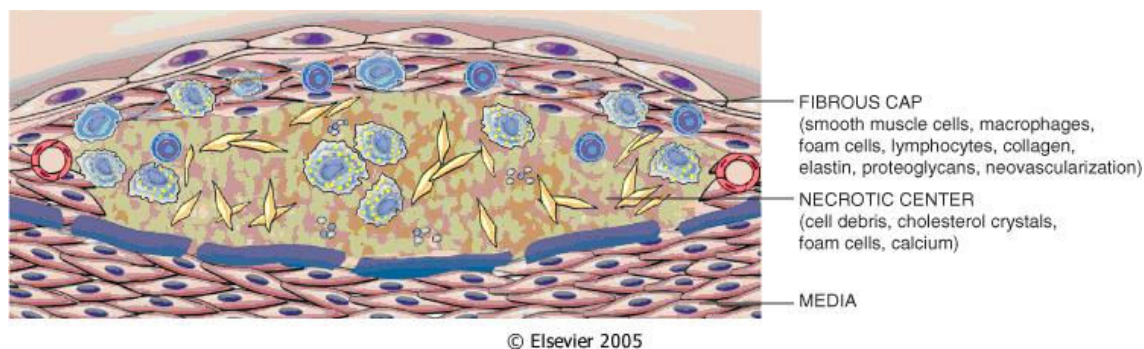
Vznikají nahromaděním pěnových buněk, jedná se o první makroskopické projevy aterosklerózy (1).

Nalezneme je i u malých dětí, především v hrudní aortě, s přibývajícím věkem se jejich rozsah a počet zvyšuje. Můžeme je pozorovat jako vyvýšená žlutavá ložiska v intimně, která dosahují velikosti několika mm až cm. Žlutavou barvu způsobují právě lipidy, které se nacházejí v plazmě pěnových buněk v podobě jemných kapiček (27). Význam tukových proužků ve vývoji aterosklerózy není zatím plně objasněn, neplatí, že by vždy po jejich vytvoření následovala přeměna na ateromový plát. Jedná se tedy o strukturu, která může být prekurzorem ateromového plátu, ale může také vymizet (13).

■ ateromový plát

Je charakterizovaný vysokým obsahem lipidů, v centru plátu v rozšířené intimně se nachází různě velká dutina, která obsahuje žlutavou kašovitou hmotu bohatou na cholesterol a jeho estery (13).

Lipidy nejsou orientovány intracelulárně ale extracelulárně, protože řada makrofágů přeplněných lipidy byla apoptózou zničena (28). Velikost plátů je opět v řádu mm až po několik cm, pláty jsou však výrazně vyšší než tukové proužky a mohou omezovat krevní cirkulaci v lumen cévy. Histologicky se plát popisuje jako nekrotické ložisko bohaté na lipidy, které je od lumen odděleno vrstvou hyalinního vaziva, nazývaná jako vazivová čepička. Často dochází k rozšíření ateromového plátu i do medie (27).



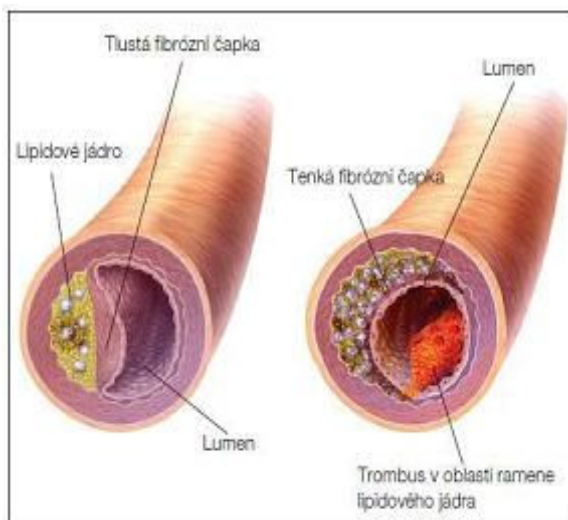
Obrázek 8 – stabilní ateromový plát

<http://www.biology.estranky.cz/clanky/patologie/patologie-aterosklerozy.html>
(23.4.2011) (29)

Charakter vazivové čepičky určuje stabilitu plátu (13).

Stabilní plát je charakterizován silnou vazivovou čepičkou zpevněnou kolagenovými vlákny, elastinem a proteoglykany (14). Bývají hemodynamicky významné, ale stálé (30).

Nestabilní plát má čepičku tenkou, prostoupenou makrofágy, jejichž produkce enzymů metaloproteináz ztenčuje vazivovou čepičku štěpením kolagenu a mohou tak vyvolat destabilizaci ateromového plátu. K nestabilitě přispívá i zánětlivý proces v ateromovém plátu, kdy buňky imunitního systému produkují interferony gama, které snižují tvorbu kolagenu a také zeslabují vazivou čepičku (14,30).



Obrázek 9 – rozdíl mezi stabilním a nestabilním ateromovým plátem

<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fofolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141>
(24.4.2011) (31)

■ ateromový vřed

pokud dojde k ruptuře vazivové čepičky, odhalí se ateromová hmota, která je vysoce trombogenní a způsobí masivní agregaci trombocytů a vznik krevní sraženiny. Tato sraženina může lumen cévy úplně zablokovat, což vede k ischemii zásobované oblasti. Nejčastěji k tomuto dochází v cévách koronárních a mozkových (13).

Ve větších cévách, jako aorta, není problém zúžení cévy, ale odtrhnutí krevní sraženiny a následné periferní embolizace. U cév dochází také na podkladě poškozené, zeslabené medie k jejímu vyklenutí a vzniku výdutě neboli aneuryzmatu, které pokud praskne, dochází k velmi nebezpečnému vnitřnímu krvácení (10,13).

Může dojít také k uvolnění velkého množství lipidů do krevního oběhu, které mohou způsobovat v periferii embolizaci (27).

■ Kalcifikace ateromových hmot

Je posledním významným jevem v morfologickém obraze aterosklerózy. Jedná se o ukládání vápenatých solí jak do ateromové hmoty tak do hyalinního vaziva. Ve větších cévách dochází ke vzniku tvrdých destiček ve stěně plátu. U cév menšího kalibru může dojít až k přeměně na tvrdé trubičky (13, 27).

3.4 Klinická manifestace aterosklerózy

„Klinické projevy aterosklerózy jsou vlastně následkem zmenšení cévního průsvitu nebo uzávěru, poruchy kontinuity a embolizace.“ (27)

- ateroskleróza v koronárních tepnách je příčinou ischemické choroby srdeční, k její manifestaci dochází při zúžení koronárních tepen o více než 60%, snížený průtok krve neuspokojí metabolické nároky myokardu a dochází k ischemii. Při ruptuře aterosklerotického plátu a vzniku trombu dochází k nekróze a rozvoji infarktu myokardu (1,2).

- ateroskleróza mozkových tepen může v případě vzniku trombu či embolu vyvolat cévní mozkovou příhodu, postižení s liší podle toho, která oblast mozku byla zasažena. Může jít o poruchy řeči, citění či hybnosti, demenci, ale i úmrtí (1,13).

- ateroskleróza tepen dolních končetin vede k ischemické chorobě dolních končetin (ICHDK), je charakterizovaná intermitentní klaudikací. Zúžená tepna není schopna přivádět dostatečné množství krve do svalů a při zvýšené námaze dochází k ischemii a bolesti. Čím výraznější zúžení, tím se více zkracuje klaudikační vzdálenost (vzdálenost chůze, kterou pacient ujde bez bolesti). Výrazné zúžení vede i ke klidové bolesti a úplné uzavření k nekróze (1).

- ateroskleróza renálních tepen vyvolává nefrosklerózu, stenóza renálních tepen snižuje průtok ledvinami a vyvolá se tak aktivace systému renin-angiotenzin, který vyvolá sekreci vazokonstrikčních působků, dochází tak k vytvoření bludného kruhu a ke zhoršování aterosklerózy (27).

Charakter onemocnění a jeho průběh závisí především na rozsahu postižení tepen, místě stenózy či uzávěru. Ateroskleróza postihuje většinu tepen a proto, pokud dojde ke klinické manifestaci v jednom typu řečiště, například v koronárním, je zde vysoké riziko, že i ostatní tepny jsou postiženy aterosklerózou a ke komplikacím může dojít i v jiných řečištích (1).

4 MYŠÍ MODELY

4.1 obecný úvod k modelům aterosklerózy

Pro studium patogeneze aterosklerózy a možností její léčby bylo použito mnoho zvířecích druhů. První důkaz experimentální aterosklerózy byl popsán již v roce 1908 na zvířecím modelu králíka, krmeném stravou bohatou na živočišné bílkoviny, v jehož aortě Ignatowski popsal velké jasné buňky způsobující rozšíření intimy (32).

Jako další zvířecí modely byly používány primáti, prasata, králíci, zřídka pak křečci, holubi, krysy, či psi. Výhodou při používání prasat jako modelu byla tvorba lézí, které byly podobné aterosklerotickým lézím lidským, navíc při použití tohoto modelu byla odhalena a popsána infiltrace monocytů, jedna z primárních fází aterogeneze (33). Avšak nevýhody tohoto modelu jako problémy s udržováním chovu a náklady na chov, převážily plusy a přestaly se používat. Modely opic a králíků také byly důležité při studiu a definování vzniku a rozvoje aterosklerotických lézí (34,35). Nicméně i tyto modely předčilo používání modelu myšího, který překonal problémy a nedostatky modelů větších zvířat (36).

4.2 myší modely

První myší modely byly použity během 60.let 20.století ve Wisslerově laboratoři. Jsou výhodné především díky své reprodukovatelnosti (36). Myši jsou vysoce odolné vůči ateroskleróze na rozdíl od lidí, což je dáno především odlišným lipidovým profilem. Zatímco u lidí tvoří 75% plazmatického cholesterolu LDL-cholesterol, u myši většina plazmatického cholesterolu se vyskytuje ve formě antiaterogenního HDL cholesterolu. Proto také při podávání krmení s nízkým obsahem cholesterolu nepřesahuje plazmatická hladina cholesterolu hodnot 100 mg/dl, je tvořena majoritní frakcí HDL a nevyvíjí se léze. Výjimkou je inbrední kmen myši C57BL/6 (37). Tyto genotypově stejné myši, vytvořené příbuzenskou plnitbou (38) vytváří při podávání krmení s vysokým obsahem cholesterolu aterosklerotické léze. U jiných inbredních kmenů jako například C3H/HeJ se léze nevyvinuly (37).

Pro kvantifikaci lézí v myších modelech vytvořily Paigen a spol. široce používané testy. Jedná se o měření průřezu léze v oblasti kořene aorty. Postup začíná izolací srdce, která se fixují do formalinu a poté vkládají do želatiny, nechají se zamrazit a nakonec se krájí na tenké řezy na přesně anatomicky definovaných místech (v aortálním sinu a oblastí chlopní). Léze se měří mikroskopicky (39).

I když jsou myší modely široce používané, najdeme také několik jejich nevýhod. Především se jedná o to, že léze jsou většinou malé, v rozsahu několik set až tisíc μm čtverečních, které se rozvíjí jen do formy pěnových buněk a tukových proužků a nerozrůstají se do dalších stádií, která známe u lézí u lidí. Vznik lézí navíc bývá formován potravou, která obsahuje nefyziologické množství cholesterolu a kyselinu cholovou. A dále na rozdíl od člověka se výskyt lézí u myšího modelu omezuje jen na oblast aortálního kořene. Nevýhodou je také jejich malá velikost, která může činit obtíže při chirurgických manipulacích a zobrazování in vivo (36).

Mezi výhody používání myších modelů patří především jednoduchost chování zvířat a možnost chovu i větších skupin. Aterosklerotické léze se u nich vyvíjejí v relativně krátkém časovém horizontu a velký význam má především podrobná prostudovanost myšího genomu. To umožňuje rozvoj genetického inženýrství, které posunuje myší modely na další úroveň charakterizovanou tzv. knock-out modely, u kterých je vyřazen určitý gen důležitý pro správnou funkci lipoproteinů (36).

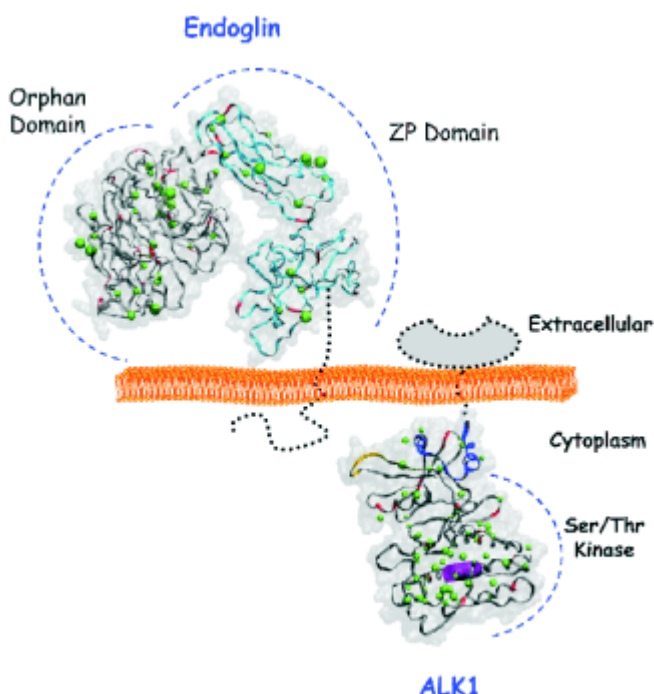
Rozlišují se 3 knock-out modely, ApoE deficitní myši, LDL-receptor deficitní myši a myši, které mají deficit jak ApoE tak LDL-receptoru. Tyto modely jsou důležité, protože vytváří už i pokročilé aterosklerotické léze s ateromovým jádrem (36). U posledního typu není třeba podávat k vytvoření léze ani aterogenní potravu (40).

Náš výzkum se ale zaměřil na normocholesterolemické myši, proto nebudeme knock-outové modely více rozvádět.

5 ENDOGLIN

Endoglin (CD 105) je membránový glykoprotein, který je důležitou součástí receptorů rodiny proteinů TGF-beta, transformujícího růstového faktoru. Také je součástí rodiny proteinů zona pellucida (41).

Struktura lidského endoglinu je členěna na 3 části. Rozlišuje se velká extracelulární doména, rozdělena na orphan a ZP (zona pellucida) doménu, následuje hydrofóbní transmembránová doména a krátké cytosolové domény (42).



Endoglin vytváří dimery, spojené disulfidickými můstky. Cytoplazmatická doména je fosforylována a váže se na ní serin/threonin kináza, která je součástí TGF – beta receptoru. (např. ALK1)

Jsou popsány dvě izoformy endoglinu, S a L. Liší se od sebe cytosolovou doménou. S (short) izoforma je menší, její cytosolová doména se skládá ze 14 aminokyselin, L (long) izoforma obsahuje 47 aminokyselin. Převážnou část

Obrázek 10 – struktura endoglinu

http://www.zsf.jcu.cz/jab/8_3/bernabeu.html (27.4.2011)
(43)

exprese tvoří L forma. Pokud tedy není uvedeno, že se jedná o S formu, vztahují se dané studie na L formu (41).

Díky tomu, že endoglin působí jako pomocný receptor TGF- β (označovaný také jako receptor TGF- β III), může ovlivňovat působení TGF- β a signalizační kaskádu po vazbě na jeho receptor.

Receptory pro TGF- β jsou heterodimerní komplexy na buněčném povrchu, rozlišujeme typ I a II (41).

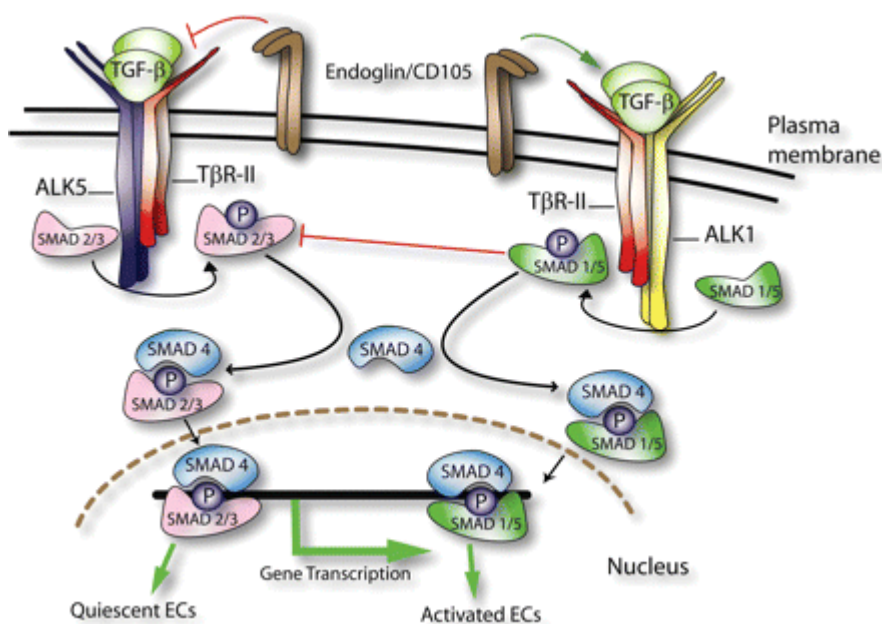
Jedná se o serin/threonin kinázy, které fosforylují uvnitř buňky Smad proteiny a aktivují tak signalizační kaskádu (44). Receptor typu I je známý také jako „activin receptor-like“ kináza (ALK) a zahrnuje 7 typů, receptor II pak zahrnuje 5 typů (41).

Signalizační kaskáda začíná nejprve tím, že aktivovaný receptor II fosforyluje typ I, který následně šíří signál prostřednictvím Smad proteinů. Nejdůležitější typy receptoru I jsou ALK 1 a ALK 5, přičemž ALK 1 aktivuje Smad 1/5 a ALK 5 aktivuje Smad 2/3. Celý proces je zakončen spojením daných Smad proteinů se Smad 4 a tento komplex přechází do jádra, kde reguluje transkripční aktivitu cílových genů (45).

Bylo potvrzeno, že ALK 1 stimuluje proliferaci a migraci endotelových buněk, na rozdíl od ALK 5, která tento proces inhibuje (46).

Endoglin podporuje vazbu ligandu a signalizaci přes ALK 1 a přes ALK 5 spojenou se Smad 2 (47) naopak tlumí kaskádu ALK 5 spojenou s Smad 3 (48).

Obrázek 11 – schéma signalizační kaskády TGF- β a endoglinu



<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/86/1/12.full> (27.4.2011) (49)

Hlavní role endoglinu se připisuje angiogenezi a cévní remodelaci ovlivněné TGF- β . Především stimuluje signalizační kaskádu TGF- β /ALK-1/Smad1/5, která vede ke stimulaci migrace a proliferace endoteliálních buněk (41).

Důkazy o jeho zvýšené expresi v endotelu cév jsou již z období angiogeneze embrya, dále je zvýšená v místě zánětu, při poranění cévy a hojení (50), také v cévách tumoru, což vede k myšlence, že endoglin podporuje neoangiogenezi v rostoucích tumorech (51). Jeho syntéza byla také zjištěna v ischemizovaných tkáních. Naopak v klidových endoteliálních buňkách se exprimuje endoglin velmi málo. Vidíme tedy, že jako spouštěcí faktory vystupují často cévní poškození, hypoxie a cytokiny (41).

Jeho důležitost byla prezentována na myších, kterým byl vyřazen gen pro endoglin. Tyto myši umíraly již v embryonálním stádiu z důvodu vadné angiogeneze (41). S mutací genu pro endoglin je také spojováno vzácné dědičné onemocnění nazývané hereditární hemorrhagická telangiektázie typu I, známá také jako Oslerova-Renderova-Weislerova nemoc. Je charakterizovaná cévními lézemi a ztrátou kapilární sítě, klinicky se projevuje častým a náhlým krvácením z nosu a mukokutánní telangiektázií (52).

Endoglin se netvoří pouze v endoteliálních buňkách, jeho exprese je popsána také u buněk hladké svaloviny cév (VSMC), u kardiálních fibroblastů, kde moduluje působení angiotenzinu II a také u monocytů při jejich diferenciaci na makrofágy (41, 53).

Mimo významnou roli při angiogenezi byla také popsána jeho role při erythropoéze ale především byla pozorována regulace exprese a aktivity eNOS (endoteliální NO-syntázy), která má protektivní účinky na cévní endotel, působí vazodilatačně a antiaterogenně. Na druhou stranu zvýšená exprese endoglinu v aterosklerotických plátech může naznačovat opak, tedy proaterogenní působení. Jeho účinek v procesu aterosklerózy není zatím plně objasněn (41).

6 ENDOTELIÁLNÍ NO – SYNTÁZA (eNOS)

Endoteliální NO – syntáza patří do rodiny enzymů produkující oxid dusnatý (NO) z aminokyseliny L-argininu (54).

6.1 Izoformy NO – syntázy

Rozlišujeme 3 izoformy, neuronální (nNOS), inducibilní (iNOS) a endoteliální (eNOS) (2).

- neuronální NO – syntáza byla poprvé pozorována v neuronech, je exprimována v centrálním i periferním nervovém systému a v kosterním svalstvu, produkuje konstitutivně NO, hlavní funkcí je ale především funkce neurotransmiteru (55).

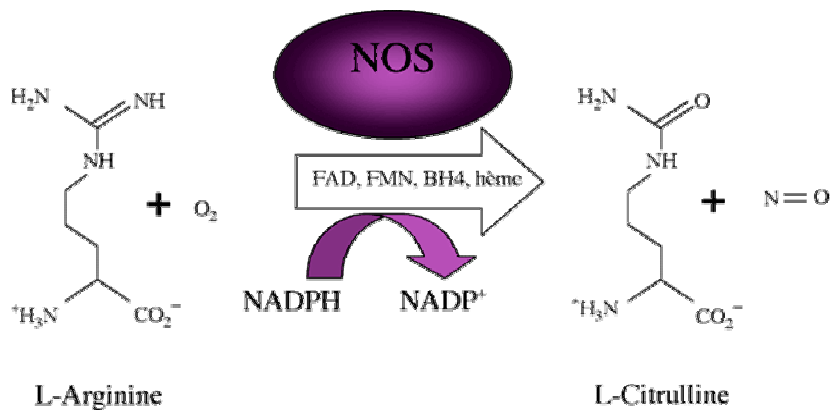
- inducibilní NO – syntáza je enzym, který neprodukuje NO konstitutivně v malých množstvích, naopak tvoří NO ve vysokých koncentracích jako odpověď na patologické stimuly, mezi něž řadíme bakteriální endotoxiny a zánětlivé cytokiny (interferon, TNF- α , interleukin 1) (55). iNOS byla nejprve popsána v makrofázích, kromě nich může být exprimována v Kupferových buňkách, neutrofilech, hepatocytech či fibroblastech (2).

- endoteliální NO – syntáza produkuje konstitutivní množství NO v endotelu, mimo endotel cév byla ještě eNOS popsána také v kardiomyocytech, ledvinových mezangiálních buňkách, osteoblastech, osteoklastech a také v krevních destičkách (2).

6.2 Tvorba oxidu dusnatého a jeho funkce v organismu

Oxid dusnatý je malá lipofilní molekula, která se uvolňuje při enzymatické přeměně aminokyseliny L-argininu na L-citrulin. Jedná se o oxidační reakci, kdy kyslík využívá atomu dusíku guanidinového konce L-argininu (13).

K funkční reakci je potřeba řada kofaktorů, jedná se o flavinadenin dinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), tetrahydrobiopterin (BH₄) a železnatý protoporfyn (hem) (2).



Obrázek 12 - syntéza NO

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-c2.htm> (30.4.2011) (56)

Účinky NO jsou dány jeho reakcí s guanylycyklázou. NO reaguje s hemovou částí tohoto enzymu, což vede k jeho aktivaci a enzymatické přeměně guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), který je zodpovědný za účinky NO (2). Účinek cGMP je ukončen jeho odbouráním na guanosinmonofosfát (GMP), které je katalyzováno enzymy fosfodiesterázami (PDE) (57).

V prvé řadě působí vazodilatačně na hladkou svalovinu cév, toto působení umožňuje snížení odpovědi vápenatých iontů na kontraktální agonisty vedoucí k hyperpolarizaci membrán buněk hladké svaloviny. Účinek byl pozorován i u inhalačního podání, kdy dochází k významné plicní vazodilataci, čehož by se mohlo využívat u nemocích, jako je syndrom respirační tísně u dospělých (2).

Mezi další působení NO patří inhibice adheze a agregace krevních destiček, neutrofilních leukocytů a monocytů. Vysvětlení spočívá v inhibici exprese endoteliálních adhezivních molekul (VCAM 1, ICAM 1) (58) a ve snížení působení chemokinů a MCP 1 (monocyte chemotactic protein) (59).

Tyto účinky jsou velmi důležité v ochraně před trombózou i před aterosklerotickými pláty a mohou mít také vliv na protizánětlivé působení (2).

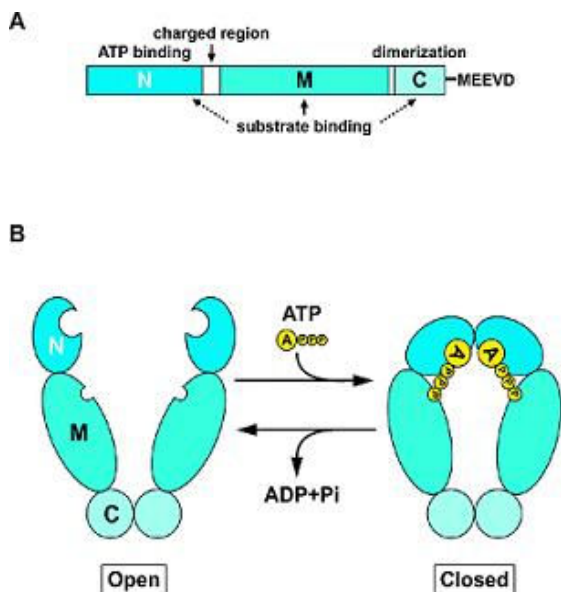
Oxid dusnatý však může mít i nepříznivé účinky, při vzniku patologických koncentrací NO se mohou projevit cytotoxické účinky, dané buď přímým

působením (např. nitrosylace nukleových kyselin) nebo nepřímým působením vznikem peroxynitritových anionů, které vznikají reakcí NO se superoxidem. Tyto anionty mohou poškozovat buňky a tkáně přes lipidové peroxidace, inaktivace enzymů a jiných proteinů oxidací a nitrací, či aktivací matrixových metaloproteináz (MMP) a vést k apoptóze (2, 57).

6.3 Struktura a funkce NO – syntázy

Všechny tři izoformy tvoří dimerické enzymy (2). Pro vytvoření správné trojrozměrné struktury a pro stabilizaci eNOS je důležitý molekulární chaperon – heat shock protein, protein teplotního šoku (hsp 90) (60).

Molekulární chaperony jsou speciální proteiny navazující se již na částečně složené proteiny. Jednak je udržují v rozvinuté formě při pohybu cytoplazmou a přes buněčné membrány a jednak umožňují správné složení peptidového řetězce do trojrozměrné podoby (61).



Hsp 90 má ATP/ADP aktivitu, je schopen tedy na sebe vázat ATP. Při navázání ATP dochází k vzniku uzavřené konformace hsp 90, která obklopí eNOS a pomáhá mu ve správném složení, ve stabilizaci a dozrání. Po odbourání ATP na ADP se konformace hsp 90 otevře (62).

Obrázek 13 – funkce hsp90

<http://jb.oxfordjournals.org/content/137/4/443/F1.expansion>(29.4.2011) (63)

Na ATP vazebné místo se mohou vázat i jiné sloučeniny, ty však vedou k poruše funkce hsp 90 a k destabilizaci dozrávajícího proteinu, v našem případě enzymu eNOS.

Tyto látky se označují jako hsp 90 inhibitory a mezi nejvýznamnější látky se uvádí antibiotikum geldanamycin. Při podání inhibitorů hsp 90 bylo pozorováno snížení sekrece NO a s tím související potence aterogeneze (64).

K funkčnímu komplexu eNOS a dalších dvou izoform jsou nezbytné kofaktory, které jsme uváděly výše, tzn. FAD, FMN, BH4 a hem, dále nesmí chybět vazebná místa pro substrát L-arginin, pro NADPH a kalcium – kalmomodulin (2). Právě dostupnost či nedostupnost substrátů a kofaktorů je významným regulačním mechanismem ovlivňující funkci eNOS.

Nezbytným pro správnou funkci eNOS je tetrahydrobiopterin (BH4). Jeho funkcí je stabilizace dimerické struktury eNOS a usnadnění navázání substrátu L-argininu (57). Význam BH4 podtrhla studie s hypertenzními potkany, u kterých došlo při podávání BH4 v potravě ke zlepšení endotelové dysfunkce. Naopak chybění a nedostatek BH4 vedlo ke zvýšení produkce superoxidu a zhoršení endotelové dysfunkce (65).

Samozřejmou věcí je, že pro potřebnou funkci enzymu eNOS je nezbytný dostatek substrátu. Při nedostatku L-argininu je i snížená produkce NO, ta může být i úplně zablokována podáním podobných látek jako L-arginin, tedy podáním analogů L-argininu. Mezi tyto látky patří L-NMMA (N- monometyl- L-arginin) L-NAME (N-nitro-L-arginin- metyl-ester) nebo ADMA (asymetrický dimethylarginin) (13). Po podání analogů L-argininu bylo pozorováno vyvolání vazokonstrikčního účinku, zvýšení tvorby trombů a zvýšení progresu aterosklerózy (66).

6.4 regulace eNOS

Regulace eNOS a správné hladiny NO jsou důležité pro zachování endoteliální funkce, v případě chybné regulace eNOS může docházet k progresi cévních onemocnění jako je právě ateroskleróza a s ní související poruchy (54).

Je známo, že funkci eNOS a syntézu NO zvyšují některé látky, jmenujme acetylcholin (ACh), bradykinin, substance P, histamin, serotonin, dále je aktivita zvýšená při hypoxii, stimulaci el.proudem a při tzv. shear stresu (13).

Bylo zjištěno, že jistý vliv mají i růstové faktory včetně TGF- β 1, kde hraje důležitou roli i výše zmiňovaný endoglin (54).

Regulace daná endoglinem je založena na 2 různých mechanismech. První mechanismus je regulace tvorby mRNA pro eNOS. Druhým mechanismem se rozumí ovlivnění propojení eNOS aktivity a přitahování cytoplazmatického hsp90 do míst syntézy NO. U myšič s deficitem endoglinu byla pozorována porucha eNOS a s tím související syntéza NO, ale také zvyšování koncentrace superoxidu a peroxidu vodíku (41).

Regulace endoglinu a eNOS spolu úzce souvisí, popsaly jsme, jak endoglin ovlivňuje syntézu NO, byla však také dokázána regulace v opačném směru, kdy při blokádě tvorby NO analogy L-argininu dochází ke snížení angiogeneze, hlavní úlohy endoglinu (54).

Naopak snižování tvorby NO a inhibice eNOS bylo prokázáno u TNF α či lipopolysacharidů, kteří snižují genovou expresi eNOS, konkrétně snížením stability mRNA pro eNOS. Aktivita eNOS je dále snižována endotelinem 1, inhibitory COX (cyklooxygenázy), či oxidovanými LDL částicemi (13, 54).

K poruše funkce tohoto enzymu dochází i při nedostatku substrátu, například při podání inhibitorů L-argininu, nebo při nadbytečném působení enzymu arginázy, který katalyzuje arginin na močovinu a ornitin (38).

Při nedostatku některého z jeho kofaktorů, především tetrahydrobiopterinu. Významný je i nedostatek molekulárního chaperonu hsp90, který zabezpečuje stabilitu a dozrání eNOS (54). Ke snížení tvorby dochází také při hypercholesterolémii, což bylo pozorováno u myšič krmených cholesterolem (67).

Závěrem lze říci, že regulace eNOS je významným činitelem v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. Při nedostatku NO dochází k poruše relaxace hladké svaloviny cév a k vývoji hypertenze. Je vyšší riziko tvorby krevní sraženiny a je pozorována dysfunkce endotelu a rozvoj aterosklerotických lézí. Naopak při patologicky zvýšených koncentracích NO dochází také k poškození endotelu na základě tvorby reaktivních kyslíkových radikálů, chronická nadprodukce může vést až k sepsi (54).

7 CÍL PRÁCE (ZADÁNÍ)

Cílem této diplomové práce bylo popsat expresi eNOS a endoglinu v aortě u dvou kmenů myši s rozdílnou predispozicí k ateroskleróze. K tomuto účelu byly použity imunohistochemické metody.

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Zvířata

Samice normocholesterolemických myší (n=16) byly rozděleny do dvou skupin po osmi, jednu skupinu tvořily myši kmene C3H/ HEJ a druhou myši kmene C57BL/6J. Obě skupiny myší byly ve věku 4 měsíce od narození. Obě skupiny byly krmeny stejnou dietou po dobu 12 týdnů po odstavu.

Na konci experimentu byla zvířata usmrcena předávkováním v párách éteru. Zvířatům byly odebrány vzorky krve pro biochemické vyšetření a segmenty tkání pro imunohistochemické vyšetření. Tyto segmenty se ponořily do OTC media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

8.2 Biochemická analýza

Nejdříve byly získány jednotlivé frakce sérových lipoproteinů využitím analytické ultracentrifugace (Beckman TL 100, Palo Alto, CA, USA).

Koncentrace lipoproteinových frakcí byly zjištěny enzymaticky podle konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a pomocí spektrofotometrické analýzy (cholesterol při vlnové délce 510 nm, triglyceridy při vlnové délce 540 nm, ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Švédsko).

8.3 Imunohistochemie

Pro imunohistochemickou analýzu byly nakrájeny řezy obsahující semilunární chlopně s aortou. Následně byly pořízeny příčné řezy tlusté 7 μm a umístěny na podložní sklíčko potažené vrstvou želatiny.

8.3.1 Imunohistochemická detekce exprese endoglinu

Pro detekci exprese endoglinu byla použita metodika avidin-biotin (ABC) s detekčním činidlem diaminobenzidinem (DAB), který v případě pozitivní reakce poskytuje hnědou barevnou reakci.

Primární protilátka

Pro detekci endoglinu v cévní stěně jsme použily primární monoklonální protilátku Rat Anti-Mouse Endoglin (BD Pharmingen) ve zředění 1:50.

Sekundární protilátka

Jako sekundární protilátka jsme použili monoklonální protilátku goat anti-rat Ig (Vector laboratoires, USA) ve zředění 1:400.

Detekce

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Dánsko).

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

Postup při detekci exprese endoglinu ABC systémem

Podložní sklíčka s tkáňovými řezy jsme umístili na 15 minut do roztoku acetonu uchovávaného při teplotě -20 stupňů Celsia. Po krátkém oschnutí (15 minut) jsme postup zopakovali, čímž došlo k lepšímu přilnutí vzorku na sklíčko.

Poté jsme řezy opět krátce osušili (15 minut), následně vložili do roztoku PBS (2x5 minut) a připravili pro analýzu.

Nejprve jsme nanесли 10 % roztok goat séra v PBS (30 minut) za účelem blokace nespecifických vazebných míst. Následně jsme řezy inkubovali s roztoky anti-avidinu a anti-biotinu (Vector Laboratoires, USA).

Poté jsme provedli inkubaci (1 hodina) s primární protilátkou Rat Anti-Mouse Endoglin (BD Pharmingen) při pokojové teplotě. Následoval oplach v roztoku PBS (2x5 minut) a patnáctiminutová inkubace v 3% roztoku H₂O₂. Po dalším oplachu PBS (2x5 minut) jsme nanесли sekundární protilátku goat anti-rat Ig (Vector laboratoires, USA), kterou jsme nechali působit po dobu 30 minut. Poté jsme řezy opět vložili do roztoku PBS (2x5 minut). Při dalším kroku jsme nanесли enzym peroxidázu konjugovaný s avidin-biotin komplexem. Následovalo přidání detekčního činidla DAB (Dako, Dánsko).

V další fázi experimentu jsme řezy opláchli v acetonu a odvodnili v aceton-xylenu (10:1, 3 minuty), aceton-xylenu (1:10, 3 minuty) a v xylenu (3x2 minuty). Na závěr jsme řezy ukotvili pomocí Eukittu.

8.3.2 Imunohistochemická detekce exprese eNOS

Pro detekci exprese endoteliální NO syntázy byla použita metodika En Vision s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Primární protilátka

K detekci endoteliální NO - syntázy (eNOS, NOS3) jsme použili primární protilátku NOS3 (eNOS) - rabbit anti rat (Santa Cruz Biotechnology) ve zředění 1:100.

Sekundární protilátka

Jako sekundární protilátku jsme použili Anti rabbit - HRP (Dako).

Detekce

Stejně jako u detekce exprese endoglinu jsme použili chromogen diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, Dako, Carpinteria, USA). Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu byla provedena za použití digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Ottawa, Kanada) pomocí softwaru NIS (Labortory Imaging, Česká republika).

Postup při detekci exprese eNOS metodou En Vision

Zmražené tkáňové řezy na sklíčku jsme nejprve 30 minut sušili na vzduchu. Po rozmražení jsme je na 30 minut vložili do roztoku acetonu uchovávaného v minus 20 °C. Poté jsme řezy nechali 30 minut usušit. Tímto procesem jsme docílili fixace řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Po usušení jsme sklíčka s řezy vložili do fosfátového pufru (roztok PBS) na 5 minut.

Před nanesením primární protilátky jsme nejprve zablokovali nespecifická vazebná místa inkubací s 10% roztokem goat séra (kozí sérum) (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo) v PBS (30 minut).

Teprve poté se mohla pro detekci exprese eNOS použít primární protilátka NOS3 (eNOS) - rabbit anti rat (Santa Cruz Biotechnology), kterou jsme naředili v BSA v poměru 1/100. Inkubace s primární protilátkou probíhala 60 minut. Poté jsme řezy vložili do roztoku PBS (2x5 minut) a následně na 15 minut do 3% H₂O₂.

Po oplachu v roztoku PBS (2x5 minut) jsme aplikovali sekundární protilátka Anti rabbit - HRP (Dako). Inkubace s touto protilátkou trvala 30 minut. Poté jsme sklíčka s řezy opět opláchli roztokem PBS (2x5 minut).

Pro vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili chromogen diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, Dako, Carpinteria, USA). Tato vizualizace probíhala po dobu 45 sekund. Nakonec jsme řezy opláchli v roztoku PBS.

Poté jsme provedli dobarvení jader v hematoxylinu po dobu 10 sekund s následným modráním pod tekoucí vodou z kohoutku (1 minuta).

Na závěr jsme sklíčka s řezy opláchli v acetonu a odvodnili v aceton-xylenu (10:1) a aceton-xylenu (1:10). Oba trvaly 3 minuty. Ukončeno to bylo xylenem (3 x 2 minuty). Poté byla sklíčka zamontována do Eukitu.

8.4 Statická analýza

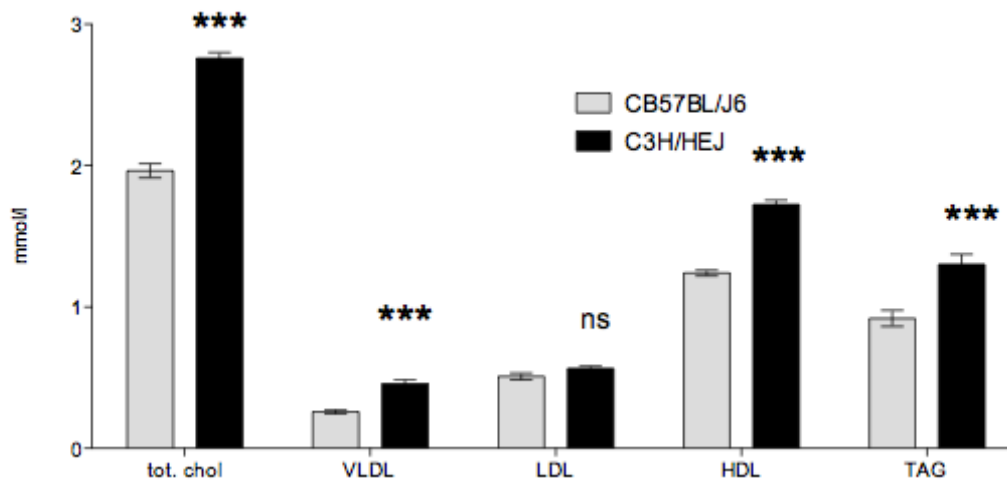
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u skupin zvířat byl použit nepárový T test. Rozdíly byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad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

9 VÝSLEDKY

9.1 Biochemická analýza

Biochemická analýza sledovala hladiny jednotlivých lipoproteinů u obou myších kmenů. Výsledky prokázaly signifikantní zvýšení hladin celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu triacylglycerolů u myšího kmene C3H. Zároveň byla u tohoto kmene zvýšena také hladina protektivního HDL cholesterolu (viz obr. 14)

Obrázek 14: Hladiny jednotlivých lipoproteinových frakcí u CB57BL/J6 a C3H. (*) $p < 0.001$)**

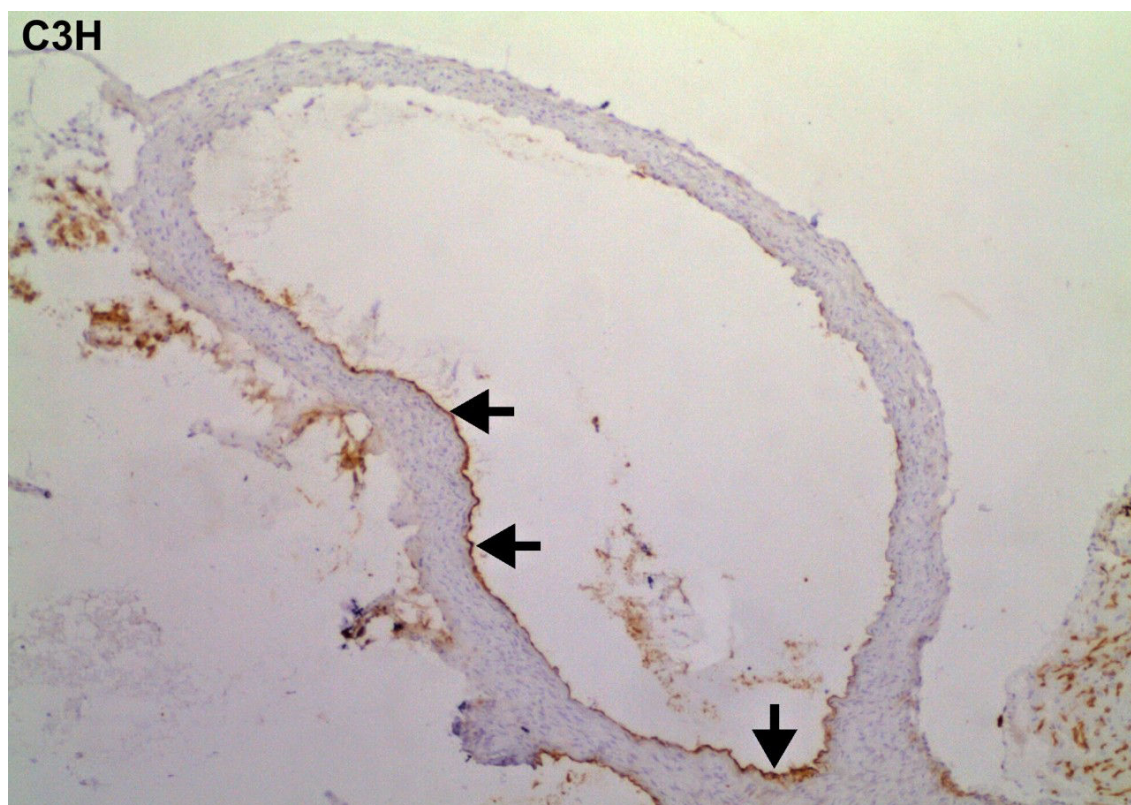


9.2 Imunohistochemická analýza

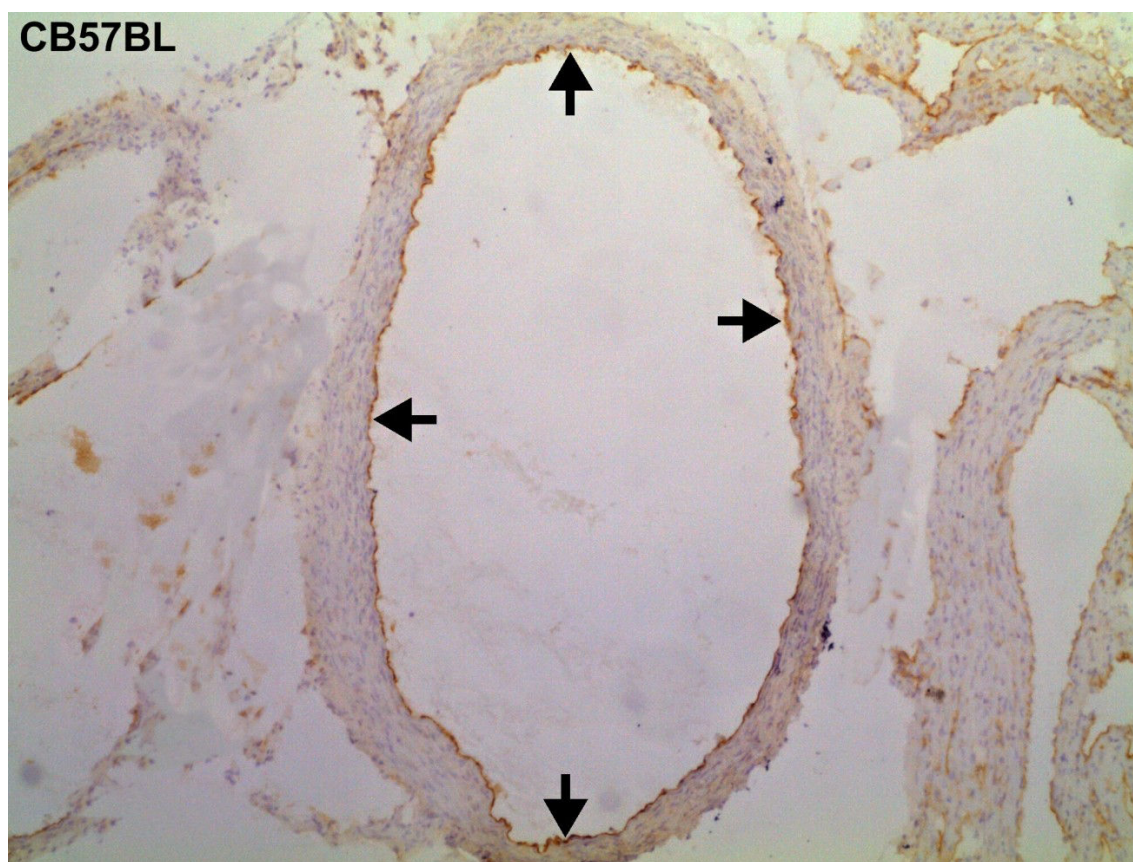
Expres obou protilátek byla pozorována pouze na cévním endotelu aorty v obou skupinách zvířat. Dále byla detekována na chlopních a také v kapilárách okolního myokardu. Pro srovnání exprese eNOS a endoglinu u obou skupin jsme použili 90 sklíček pro každou protilátku. Výsledky ukazují, že exprese eNOS je v aortě významnější u skupiny CB57BL/J6 ve srovnání se skupinou C3H. Podobný nález byl také zaznamenán u exprese endoglinu. (obr 15-18).

Obrázek 15 a 16: Reprezentativní obrázky exprese endoglinu v aortě u CB57BL/J6 a C3H myší. Exprese je pozorována pouze na cévním endotelu aorty (šipky). Zároveň je zřejmé, že exprese endoglinu je vyšší u CB57BL/J6 myší. Jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšení 40x.

Obrázek 15 – exprese endoglinu v aortě u CH3 myší

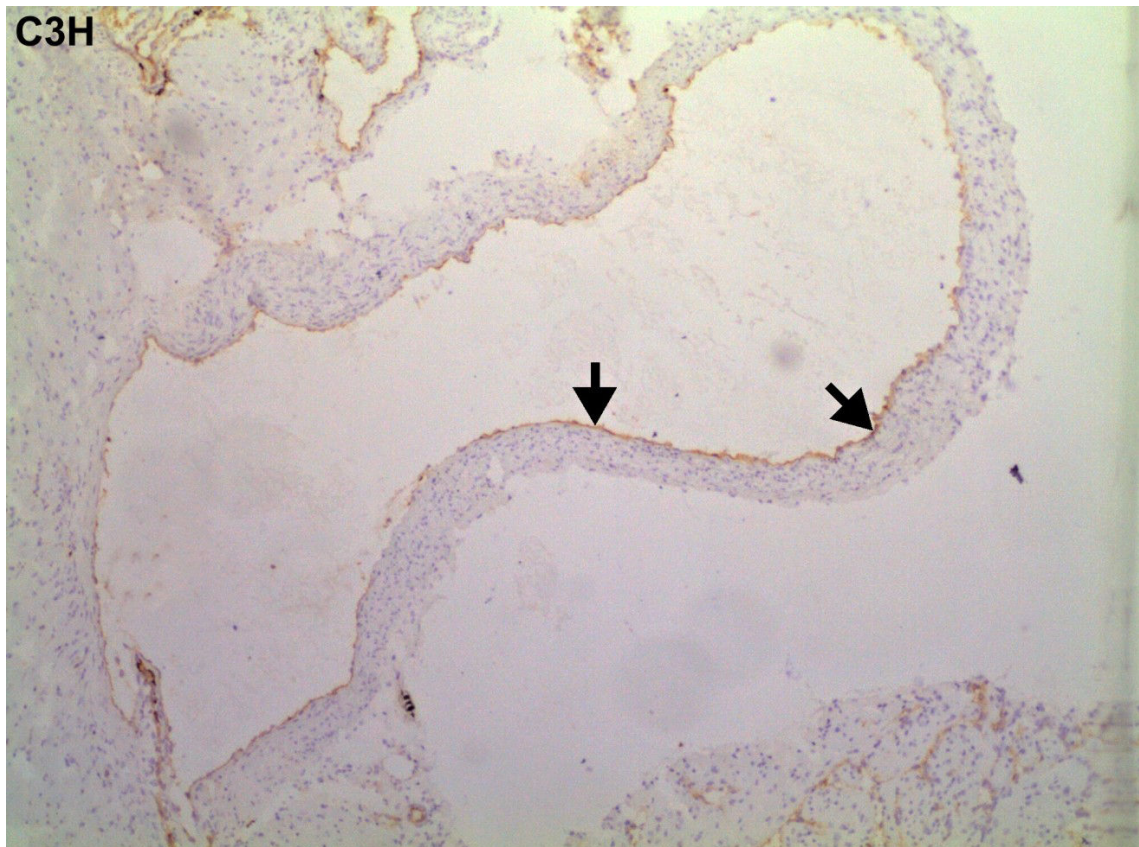


Obrázek 16 – exprese endoglinu v aortě u CB57BL myši

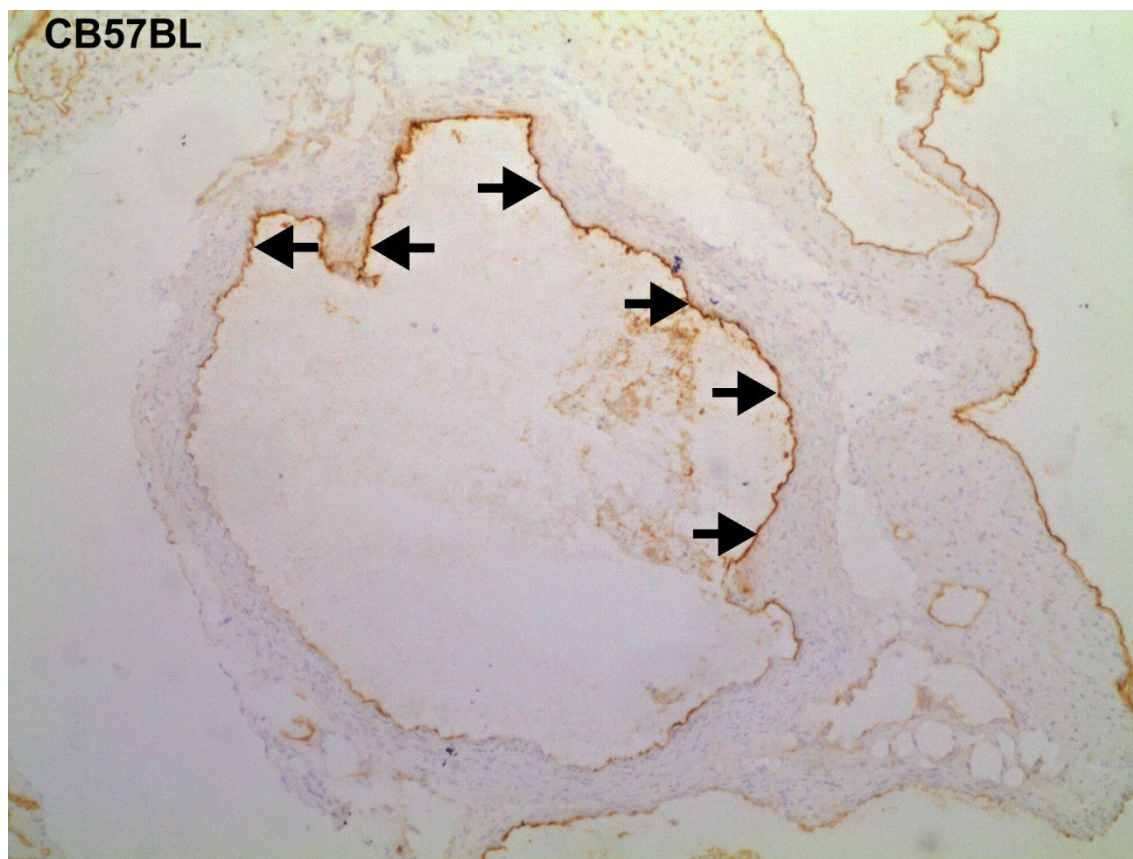


Obrázek 17 a 18: Reprezentativní obrázky exprese eNOS v aortě u CB57BL/J6 a C3H myši. Exprese je pozorována pouze na cévním endotelu aorty (šipky). Zároveň je zřejmé, že exprese eNOS je vyšší u CB57BL/J6 myši. Jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšení 40x.

Obrázek 17 – exprese eNOS v aortě u CH3 myši



Obrázek 18 – exprese eNOS v aortě u C57BL myší



10 DISKUZE

Ateroskleróza je podle WHO definována jako variabilní kombinace změn intimy arterií spojená s ukládáním lipidů(cholesterolu), polysacharidů a krevních elementů a v dalším vývoji tvorbou fibrózní tkáně provázenou ukládáním vápenatých sloučenin, se změnami v medii arterií.

Postihuje velké a střední arterie tvorbou subintimálního ztlustění (ateromu), které může vést k redukci nebo až obstrukci krevního průtoku.

Endoteliální dysfunkce se zdá být klíčovou při vzniku kardiovaskulárních nemocí. Rizikové faktory jako kouření, věk, hypercholesterolemie, hyperglykémie nebo hypertenze iniciují chronický zánětlivý proces, který je doprovázený snížením či zánikem tvorby vasodilatačních a antitrombotických faktorů a vzrůstem tvorby vasokonstriktorů a protrombotických faktorů.

Ztráta vasodilatace závislé na endotelu není jedinou dysbalancí. Pokud jsou endoteliální buňky vystaveny prozánětlivým stimulům, začnou exprimovat leukocytární chemotaktické faktory, adhezní molekuly a zánětlivé cytokiny.

Ukazuje se, že endoteliální dysfunkce se díky tvorbě zánětlivých faktorů účastní adheze monocytů a T lymfocytů a podílí se na jejich přeměně na pěnové buňky. Dále participuje na migraci a proliferaci hladkých svalových buněk a na tvorbě extracelulární matrix, což vede k formování aterosklerotického plátu (68).

Endoteliální dysfunkce je tedy velkou změnou v endoteliálním fenotypu, která přispívá k rozvoji a klinickým projevům aterosklerózy. Významně se podílí také na pozdních stádiích nemoci a hraje roli i při akutních koronárních syndromech (69).

Významným faktorem z hlediska rozvoje je pokles exprese eNOS, tedy klíčového enzymu v homeostáze cévního endotelu (70).

Endoglin nebo také TGF- β RIII je schopen ovlivňovat činnost TGF- β , což je cytokin, který má v procesu aterosklerózy zřejmě protektivní účinky (71). Je tvořen třemi doménami. Extracelulární doména se skládá z 561 aminokyselin, transmembránová doména z 25 aminokyselin, a 47 aminokyselin tvoří intracelulární část. Studie ukázaly, že endoglin se vyskytuje ve dvou různých isoformách, L (long) a S (short), ty se liší v počtu aminokyselin v intracelulární části (72).

Endoglin je nepostradatelný pro spoustu životních funkcí. Mezi hlavní účinky patří vliv na normální vaskulogenezi a angiogenezi. Endoglin je důležitý i v procesu erythropoézy. Migraci a proliferaci endoteliálních buněk také podporuje dostatečné množství endoglinu, a to aktivací signální kaskády (73).

Řada studií prokázala, že endoglin zvyšuje tvorbu eNOS a tím reguluje jeho expresi (74). Poslední práce navíc poukazují na možný protektivní vliv endoglinu v aterogenezi, což by mohlo také souviset s touto regulací (75).

Cílem této diplomové práce tedy bylo popsat expresi eNOS a endoglinu v aortě u dvou myších kmenů s rozdílnou predispozicí k ateroskleróze. Kmen CB57BL/J6 se ukázal jako nejvíce náchylný k rozvoji aterosklerózy a tento kmen je dnes také základem pro vytváření geneticky upravených myších modelů aterosklerózy (76,77). Naproti tomu u kmene C3H byla prokázána nejmenší náchylnost k procesu aterogeneze (78).

Výsledky biochemické analýzy prokázaly celkově vyšší hladiny cholesterolu u C3H/HEJ myši což konvenuje s literárními údaji (79). Je nutno poznamenat, že byla zároveň takto zvýšena hladina HDL cholesterolu, což naznačuje, že z hlediska rizika aterogeneze jsou tyto modely obecně velmi rezistentní a zároveň z tohoto biochemického hlediska není mezi nimi výrazný rozdíl z hlediska predispozice k aterogenezi.

Výsledky imunohistochemické analýzy byly ovšem překvapivé. Na jedné straně se ukázalo, že exprese eNOS a endoglinu spolu do jisté míry souvisí, jak bylo naznačeno dříve (80). Nicméně celkem překvapivě byla exprese obou potenciálně antiaterogenních proteinů vyšší u kmene CB57BL/J6, který je k ateroskleróze více náchylný. Tyto překvapivé výsledky zatím bohužel nelze přesně objasnit a bude potřeba dalších metodických přístupů k objasnění těchto výsledků.

11 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce tedy bylo popsat expresi eNOS a endoglinu v aortě u dvou myších kmenů s rozdílnou predispozicí k ateroskleróze.

Výsledky biochemické analýzy prokázaly celkově vyšší hladiny cholesterolu u C3H/HEJ myši včetně HDL cholesterolu ve srovnání s CB57BL/J6 kmenem.

Expresie endoglinu a eNOS byla pozorována pouze na cévním endotelu aorty.

Expresie protektivních proteinů eNOS a endoglinu byla vyšší u kmene s větší predispozicí k ateroskleróze, CB57BL/J6 ve srovnání s kmenem C3H/HEJ.

Tyto překvapivé výsledky zatím bohužel nelze přesně objasnit a bude potřeba dalších metodických přístupů k objasnění těchto závěrů.

12 PŘEHLED ZKRATEK

ABC	avidin-biotin metodika
ADMA	asymetrický dimethylarginin
AGE	produkty pozdní glykace
ALK	activin receptor like kináza
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
Apo	apolipoprotein
BH4	tetrahydrobiopterin
BMI	index tělesné hmotnosti (body-mass index)
CETP	cholesterol ester transferující protein
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
COX	cyklooxygenáza
CRP	C – reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
EC	endotelová buňka
eNOS	endoteliální NO-syntáza
FAD	flavinadenindinukleotid
FGF	růstový faktor fibroblastů
FMN	flavinmononukleotid
GTP	guanosintrifosfát
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
Hsp 90	protein teplotního šoku (heat shock protein) 90
ICAM 1	intercelulární adhezní molekula 1
IDL	intermediárně denzitní lipoprotein
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IL 1	interleukin 1
INF α	interferon alfa
iNOS	inducibilní NO-syntáza
KVO	kardiovaskulární onemocnění

L-NAME	L-nitroarginin metylester
L-NMMA	L-NG-monometylarginin
LCAT	lecitin-cholesterol-acyl-transferáza
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LP	lipoprotein
LPL	lipoproteinová lipáza
NADPH	nikotinamid adenindinukleotid fosfát
M-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů a monocytů
MCP 1	chemotaktický protein monocytů 1
MMP	matrixové metaloproteinázy
NO	oxid dusnatý
nNOS	neuronální NO-syntáza
PDE	fosfodiesterázy
PDGF	destičkový růstový faktor
PON 1	paraoxonáza 1
Smad	intercelulární mediátory zprostředkují signalizaci TGFβ
TG	Triacylglyceroly
TGF β	transformující růstový faktor
TNF α	tumor nekrotizující faktor
VCAM 1	adhezní molekula 1 cévních buněk
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě
VSMC	buňky hladké svaloviny cév
ZP	zona pellucida

13 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. Vlček, J., Filipová D., a kol., *Klinická farmacie I*, 1.vydání, Grada Publishing a.s., 2010, s. 93-96, 108-111, 117-121, ISBN 978-80-247-3169-8
2. Lincová, D., Farghali, H., a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2.vydání, Galén, 2007, 672 s., ISBN 978-80-7262-373-0
3. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., *Funkční histologie*, 2.vydání, nakladatelství H&H Vyšehradská s.r.o., 2000, s.115 – 123, ISBN 80-86022-80-3
4. Junqueira, L. Carlos, Carneiro, J., Kelley, RO., *Základy histologie*, 7.vydání, nakladatelství H&H vyšehradská s.r.o, 1997, s. 204 – 216, ISBN 80-85787-37-7
5. obrázek 1, <http://www.healthline.com/adamimage?contentId=1-000159&id=19194> (20.4.2011)
6. Klika, E., Vacek, Z., *Histologie – učebnice pro lékařské fakulty*, 1.vydání, Avicenum, 1974, s.178 – 186, ISBN 08-084-74
7. obrázek 2,3
<http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection2/Cardiovascular03.htm> (20.4.2011)
8. Paulsen, D.F., *Histologie a buněčná biologie*, 1.vydání, H&H Vyšehradská s.r.o., 2004, s.158 – 162, ISBN 80-7319-024-9
9. obrázek 4
http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Cardiovascular%20System.htm (20.4.2011)
10. Silbernagl, S., Lang, F., *Atlas patofyziologie člověka*, 1. vydání, Grada Publishing, a.s., 2001, s.236-239; 246-247, ISBN 80-7169-968-3
11. Mačák, J., Mačáková, J., *Patologie*, 1.vydání, Grada Publishing a.s., 2004, s. 171,172, ISBN 80-247-0785-3
12. <http://www.tribune.cz/clanek/11261> (22.4.2011)
13. Povýšil, C., Šteiner, I., *Speciální Patologie*, 2.vydání, Galén, 2007, s.1-4, ISBN 987-80-7262-494-2

14. Malý, M., Vojáček, J., a kol., *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, 1.vydání, Grada Publishing a.s, 2004, s. 33-42, ISBN 80-247-0501-X
15. Rucki, Š., Vít, P., *Kardiologické minimum pro praktické dětské lékaře*, 1.vydání, Grada Publishing a.s, 2006, s.134,135, ISBN 80-247-1120-6
16. Bogers, R.P, Bemelmans, W.J, Hoogenveen, R.T, et al., for the BMI-CHD Collaboration Investigators. Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons, *Arch Intern Med*, 2007,167: s.1720-1728
17. Žurek, M., Patogeneze, diagnostika a léčba dny, *Vnitřní lékařství*, 2006, 52: s.736-741
18. Haluzík, M., Homocystein jako rizikový faktor aterosklerózy, *Interní medicína pro praxi*, 2000, 7
19. obrázek 5, <http://www.peprotech.com/content/focusarticles.htm?id=75> (21.4.2011)
20. obrázek 6 <http://ladulab.anat.uic.edu/research0.html> (24.4.2011)
21. Racek, J., Oxidované LDL a ateroskleróza, *Labor aktuell* 2010, 3: s.12-15
22. Kalousová, M., a kol., *Patobiochemie ve schématech*, 1.vydání, Grada Publishing a.s, 2006, s.126-140, ISBN 80-247-1522
23. Fejfar, R., Přerovský, I., *Klinická fyziologie krevního oběhu*, 1.vydání, Galén, 2002, s. 47-60, ISBN: 80-7262-130-0
24. www.pace.cz/go/archive_p0001_3 (24.4.2011)
25. Ross, R., Futer, V., Topol, E.J., Atherosclerosis and coronary heart disease, Philadelphia: *Lippincott – Raven Publisher* 1996, p. 441-460
26. obrázek 7 <http://macrophages.eu/Research/research.html> (23.4.2011)
27. Bednář, B., a kol, *Patologie*, 1. vydání, Avicenum, 1983, s.695-704
28. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis, *Nature*, 2002, 420: s. 868-874
29. obrázek 8 <http://www.biology.estranky.cz/clanky/patologie/patologie-aterosklerozy.html> (23.4.2011)
30. http://video.upol.cz/dpx_enterprise_media_user/dpx/slidemedia/56/03_03.pdf (24.4.2011)

31. obrázek 9 <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fosfolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141> (24.4.2011)
32. Ignatowski, A.C., Influence of snímal food on the organism of rabbits, *S Peterb Izviest Imp Voyenno-Med. Akad*, 1908, 16: s.154-173
33. Gerrity, R.G., The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood - borne monocytes into foam cells in fatty lesions, *Am J Pathol*, 1981, 103: s. 181-190
34. Faggiotto, A., Ross, R., Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque, *Arteriosclerosis*, 1984; 4: s. 341-356.
35. Rosenfeld, M.E., Tsukada, T., Chait, A., et al. Fatty streak expansion and maturation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits, *Arteriosclerosis*, 1987; 7: s. 24-34
36. Jawień, J., Nastalek, P., Korbut, R., Mouse models of experimental atherosclerosis, *Journal of fysiology and pharmacology*, 2004, 55, 3: s. 503-517
37. Paigen, B., Morrow, C., Brandon, C., et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice, *Atherosclerosis*, 1985; 57: s. 65-73
38. Vokurka, M., Hugo, J., a kol., *Velký lékařský slovník*, 8.vydání, Maxdorf, 2009, 1144s., ISBN 978-80-7345-166-0
39. Pangen, B., Morrow, A., Holme, P.A., Mitchell, D., Williams, R.A., Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice, *Atherosclerosis*, 1987, 68: s. 231-240
40. Witting, P.K., Pettersson, K., Ostlund-Lindqvist, A.M., 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. 667-67
41. Novoa, J. Lopéz, Bernabeu, C., et al, The physiological role of endoglin in the cardiovascular systém, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2010, 299: s. 959-974

42. Gougos, A., Letarte, M., Primary structure of endoglin, an RCD-containing glycoprotein of human endothelial cells, *J Biol Chem*, 1990, 265: s. 8361-8364
43. obrázek 10 http://www.zsf.jcu.cz/jab/8_3/bernabeu.html (27.4.2011)
44. Conley, B.A., Smith, J.D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, et al. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques, *Atherosclerosis*, 2000 153 : s. 323-335
45. Gordon, K.J., Blobel, G.C., Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease, *Biochim Biophys Acta* 2008 , 1782: s. 197–228
46. Cruz-Gonzalez, I., Pabón, P., Rodríguez-Barbero, A., et al., Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction, *J Cell Mol Med*, 2008, 12: s. 955–961
47. Blanco, F.J., Santibanez, J.F., Guerrero-Esteo, M., et al., Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor beta receptor complex, *J Cell Physiol*, 2005, 204: s. 574–584
48. Guo, B., Slevin, M., Li, C., Parameshwar, S., et al., CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling, *Anticancer Res*, 2004, 24: s. 1337–1345
49. obrázek 11, <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/86/1/12.full> (27.4.2011)
50. Torsney, E., Charlton, R., Paruka, D., Collis, M., Artur, H.M., Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo, *Inflamm Res*, 2002, 51: s. 464–470
51. Burrows, F.J., Derbyshire, E.J, Tazzari, P.L., et al., Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumor: implication for diagnosis and therapy, *Clin Cancer Res*, 1995, 1: s.1623–1634
52. McAllister, K.A., Grogg, K.M., Johnson, D.W., et al., Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1, *Nat Genet*, 1994, 8:s. 345–351

53. Lastres P, Bellon T, Cabañas C, Sanchez-Madrid F, et al., Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen, *Eur J Immunol*, 1992, 22: s. 393–397
54. Chatterjee, A., Catravas, J.D., Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiological regulation, *Vascular Pharmacology*, 2008, 49, s. 134-140
55. http://www.rndsistemas.com/mini_review_detail_objectname_MR00_NOS.aspx (27.4.2011)
56. Obrázek 12 <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-c2.htm> (30.4.2011)
57. Eugenov, O.V., Pachem, P., Schmidt, P.M., et al., NO – independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5: s. 755-768
58. Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N., 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4651
59. Zeiher, A.M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B., Busse, R., Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells, *Circ. Res.* 1995, 76: s. 980
60. Richter, K., Buchner, J., Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell. Physiol.* 2001, 188: s. 281
61. Alberts, et al. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, 2. vydání, Espero, 2005, s. 139-140, ISBN 80-902906-2-0
62. Chadli, A., Bouhouche, I., Sullivan, W., Stensgard, B., McMahon, N., Catelli, M.G., Toft, D.O., Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97: s. 12524
63. obrázek 13
<http://jb.oxfordjournals.org/content/137/4/443/F1.expansion> (29.4.2011)
64. Prodromou, C., Pearl, L.H., Structure and functional relationships of hsp90, *Curr. Cancer Drug Targets*, 2003, 3: s. 301
65. Hong, H.J., Hsiao, G., Cheng, T.H., Yen, M.H., Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension* 2001, 38: s. 1044

66. Nava, E., Noll, G., Luscher, T.F., Nitric oxide in cardiovascular diseases. *Ann. Med.*, 1995, 27: s. 343
67. Kojda, G., Husgen, B., Hacker, A., et. al., Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in experimental atherosclerosis is dependent on gender, *Cardiovasc. Res.*, 1998, 37: s. 738
68. Aikawa, M., Susgiyama, S., Hill, C.C., Voglic, S.J., Rabkin, E., Fukumoto, Y., Schopen, F.J., Witztum, J.L. and Libby, P., *Circulation*, 2002, 106: s. 1390-1396
69. Lahera, V., Goicoechea, M., de Vinuesa, S.G., Miana, M., de las Heras, N., Cachofeiro, V., and Luno, J., *Curr Med Chem*, 2007, 14: s.243-248
70. Sessa, W. C., *J Cell Sci*, 2004, 117: s. 2427-242
71. Mallat, Z., Gojova, A., Brun, V., Esposito, B., Fournier, N., Cottrez, F., Tedgui, A., Groux, H., *Circulation*, 2003, 108: s. 1232-1237
72. Blanco, F.J., Grande, M.T., Langa, C., Oujo, B., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Gomez, E., Quintanilla, M., Polez-Novoa, J.M., Barnabeu, C., *Circ Res*, 2008, 103: s. 1383-1392
73. van Laake, L.W., van den Driesche, S., Post, S., Feijen, A., Jansen, M.A., Driessens, M.H., Mager, J.J., Snijder, R.J., Westermann, C.J., Doevendans, P.A., van Echteld, C.J., ten Dijke, P., Artur, H.M., Goumans, M.J., Lenčín, F., Mummery C. L., *Circulation*, 2006, 114: s. 2288-2297
74. Santibanez, J.F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C.P., Polez-Novoa, J.M., Attisano, L., Barnabeu C., *J Cell Physiol*, 2007, 210: s. 456-468
75. Nachtigal, P., Pospíšilova, N., Večeřova, L., Micuda, S., Bracakova, E., Poslechová, K., Semecký, V., *J Atheroscler Tromb*, 2009, 16: s.265-274
76. Jawien, J., Nastalek, P., Korbut, R., *J Physiol Pharmacol*, 2004, 55: s. 503-517
77. Breslow, J. L., *Science*, 1996, 272: s. 685-688
78. Daugherty, A., *Am J Med Sci*, 2002, 323: s. 3-10
79. Stechman, M.J., Ahmad, B.N., Loh, N.Y, Reed, A.A., Stewart, M., Wells, S., Hough, T., Bentley, L., Cox, R.D, Brown, S.D., Thakker R. V. , *Lab Anim*, 2010, 44: s. 218-225

80. Jerkic, M., Rivas-Elena, J.V., Prieto, M., Carron, R., Sanz-Rodriguez, F.,
Perez-Barriocanal, F., Rodriguez-Barbero, A., Bernabeu, C., Lopez-
Novoa, J.M., *Faseb J*, 2004, 18: s. 609-611