

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



Sledování exprese endoglinu u normocholesterolemických
a hypercholesterolemických myší.

The study of endoglin expression in normocholesterolemic and
hypercholesterolemic mice.

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2012

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD
Petr Fiala

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

„Rád bych poděkoval Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD za odborné vedení, cenné rady, příjemnou spolupráci a trpělivost při sestavování této diplomové práce. Velký dík patří také mé rodině a přátelům za neustálou podporu a povzbuzení.“

Abstrakt

Petr Fiala

Sledování exprese endoglinu u normocholesterolemických a hypercholesterolemických myší

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce: Sledovali jsme změny exprese endoglinu u normocholesterolemických a hypercholesterolemických myší. Změny exprese byly pozorovány v aortě myší za pomoci imunohistochemických metod. Kvantifikace změn exprese byla provedena pomocí Western blot analýzy.

Metody: Pro pokus bylo použito 8 samic normocholesterolemických myší kmene C57BL/6J a 8 samic Apo-E receptor deficičních myší kmene C57BL/6J. Myši z apoE-deficientní skupiny byly krmeny 8 týdnů standardní dietou s obsahem 1% cholesterolu. Dále byla provedena biochemická analýza krev. Pro imunohistochemickou analýzu byly nakrájeny řezy obsahující semilunární chlopně s aortou. Následně byly pořízeny příčné řezy a umístěny na podložní sklíčko potažené vrstvou želatiny. Pro detekci exprese endoglinu byla použita metodika Avidin-Biotin (ABC) s detekčním činidlem diaminobenzidinem (DAB).

Výsledky: Expresse endoglinu byla viditelná pouze na cévním endotelu u normocholesterolemických myší. U Apo-E deficičních myší byla expresse endoglinu detekována na cévním endotelu aterosklerotické léze, endotelu aortálních chlopní a dále v oblastech mimo léze a v kapilárách myokardu. Expresse endoglinu byla významně výraznější u apoE-deficientních myší ve srovnání s normocholesterolemickými jedinci. Kvantifikací anlyzou Western blot bylo zjištěno, že expresse endoglinu u hypercholesterolemických Apo-E deficičních myší byla signifikantně zvýšena ve srovnání s normocholesterolemickými jedinci.

Závěr: Vyšší exprese endoglinu u hypercholesterolemických myší může ukazovat na potenciální obrannou reakci cévního endotelu na hypercholesterolemii, což by mohlo do jisté míry představovat protektivní působení endoglinu v iniciaci aterogeneze.

Abstract

Petr Fiala

The study of endoglin expression in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background: We studied the changes of expression of endoglin in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice. The changes of endoglin expression were detected in aorta by means of immunohistochemical methods and followed by quantification by Western blot analysis.

Methods: We used 8 female normocholesterolemic mice C57BL/6J and 8 female ApoE deficient mice C57BL/6J. ApoE deficient mice were fed during a 8 weeks by chow diet with 1% of cholesterol. Biochemical analysis of blood samples was performed. Then we prepared cuts of aorta with segment of semilunar valve for immunohistochemical analysis. Detection of expression of the endoglin was performed by Avidin- Biotin method (ABC) with detection by DAB.

Results: The expression of endoglin was detected only on endothelium of normocholesterolemic mice. The expression of endoglin in apo-E deficient mice was detected on endothelium of atherosclerosis plaque, aortic semilunar valves and also in endothelium with no atherosclerosis and in capillaries in myocardium. The stronger expression of endoglin was visible in Apo-E deficient mice when compared with normocholesterolemic mice. The Western blot analysis confirmed significant increase of endoglin expression in hypercholesterolemic Apo-E deficient mice.

Conclusions: We propose that higher expression of endoglin in hypercholesterolemic might be considered as potential protective reaction of endothelium in early atherosclerosis suggesting the role of endoglin in early atherogenesis.

Obsah

1 ÚVOD	8
2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	9
2.1 Základní stavba cév	10
2.2 Arterie	12
2.4 Kapiláry.....	13
3 ENDOTEL	14
3.1 Stavba a funkce endotelu	14
3.2 Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce	16
3.3 Hyperlipoproteinémie a endoteliální dysfunkce	17
3.4 Hypertenze a endoteliální dysfunkce	17
3.5 Diabetes mellitus a endoteliální dysfunkce.....	18
3.6 Ateroskleróza a endoteliální dysfunkce	18
3.7 Screening endoteliální dysfunkce.....	19
3.8 Léčba endoteliální dysfunkce.....	19
4 ATEROSKLERÓZA	20
4.1 Epidemiologie	22
4.2 Rizikové faktory aterosklerózy	22
4.3 Tabulka kardiovaskulárního rizika.....	24
4.4. Nové rizikové faktory aterosklerózy	25
4.5 Patogeneze aterosklerózy	26
4.5.1 Patogenní působení lipoproteinů	26
4.5.2 Vliv endotelu na patogenezi aterosklerózy.....	28
4.5.3 Monocyty a makrofágy v patogenezi aterosklerózy.....	28
4.5.4 Markery zánětu v patogenezi aterosklerózy	30
4.5.5 Fáze aterosklerózy	30

4.5.6 Buňky hladké svaloviny v patogenezi aterosklerózy	32
5 ENDOGLIN.....	34
5.1 Exprese endoglinu	34
5.2 Vliv endoglinu na endoteliální NO syntázu	35
5.3 Exprese endoglinu u modelu myši aterosklerózy.....	36
6 MYŠÍ MODEL ATEROSKLERÓZY.....	37
7 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE	40
8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
8.1 Zvířata	41
8.2 Biochemická analýza	41
8.3 Imunohistochemie	41
8.4 Protilátky	42
8.5 Postup.....	42
8.6 Western blot analýza	43
8.7 Statistická analýza	43
9 VÝSLEDKY	44
9.1 Biochemická analýza	44
9.2 Imunohistochemie	45
9.3 Western blot analýza	50
10 DISKUSE.....	51
11 ZÁVĚR	53
12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) řadíme dle epidemiologického profilu k takzvaným civilizačním onemocněním. Toto onemocnění je jednou z nejčastějších příčin úmrtí v moderních průmyslových zemích. Dle evidence Světové zdravotnické organizace (WHO) zapříčiňují KVO každý rok zhruba 4,5 milionů úmrtí v Evropě a 35% úmrtí ve Velké Británii. Nejčastější typem KVO postihujícím populaci je ischemická choroba srdeční (ICHS), které vzniká na podkladě aterosklerotických změn v krevním řečišti (1).

ICHS je v Evropě nejčastější příčinou úmrtí ze všech KVO. Ročně zemře v Evropě na komplikace spojené s výskytem ICHS 1,95 milionů lidí a ve Velké Británii toto onemocnění zapříčiní ročně 94000 úmrtí. Z geografického hlediska je mortalita zapříčiněná ICHS největší v zemích východní a střední Evropy, naopak nejnižší mortalitu nalézáme v Itálii, Francii a Japonsku. Na mortalitu zapříčiněnou ICHS můžeme také nahlížet z hlediska sociologického. Zde dojdeme k závěru, že úmrtnost je větší ve skupině mužů než žen a roste s přibývajícím věkem. Dalším hlediskem ovlivňujícím ICHS mortalitu jsou socio-ekonomické faktory. Paradoxem je, že úmrtí jsou častější v moderních průmyslových zemích s vyšší mírou stresu kladeného na populaci (1).

ICHS je onemocnění vzniklé na podkladě akutního nebo chronického omezení, případně zastavení průtoku krve věnčitými tepnami zásobujícími srdeční sval. Toto omezení vede k ischemii až nekrotizaci srdeční tkáně. K výslednému poškození srdečního svalu tedy dochází na základě nedostatku dodávaného kyslíku do srdečního svalu vzhledem k jeho spotřebě. Hovoříme tedy o poruše perfuze srdečního svalu (2).

Hlavní projevy ICHS lze dělit dle jejich symptomatologie na bolestivé a nebolestivé formy. Nebolestivé formy se projevují jako němá ischemie, srdeční selhání, srdeční arytmie a náhlá koronární smrt. Bolestivé formy pak jsou angina pectoris stabilní a nestabilní, akutní koronární syndrom, Prinzmetalova angina pectoris a infarkt myokardu (2).

Zúžení či uzávěr koronárních tepen vzniká nejčastěji na podkladě aterosklerózy. Dalšími příčinami mohou být spazmy koronárních tepen, hypertrofie myokardu či onemocnění malých cév (2).

K výskytu ICHS jsou predispoziční určité rizikové faktory. Tyto rizikové faktory dělíme na neovlivnitelné a ovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné řadíme věk, pohlaví a

genetické faktory. Do skupiny ovlivnitelných rizikových faktorů spadají hyperlipoproteinémie, arteriální hypertenze, kouření, diabetes mellitus, obezita, tělesná inaktivita, emoční stres a dále také hyperhomocysteinémie, stopové prvky atd. (2).

Ateroskleróza je onemocnění, při kterém dochází k ukládání krevních lipidů ve stěně tepen. Tento jev vyvolá zánětlivou reakci a kaskádu dalších dějů, jejichž výsledkem je vznik aterosklerotického plátu. Tento plát postiženou tepnu zužuje a může dojít až k její úplné obturaci.

Rozvoj aterosklerózy významně ovlivňují rizikové faktory aterosklerózy. Tyto faktory dělíme na neovlivnitelné a ovlivnitelné. Neovlivnitelnými faktory jsou věk, pohlaví a genetické predispozice. Mezi faktory ovlivnitelné pak řadíme hyperlipoproteinémii, arteriální hypertenzi, kouření, diabetes mellitus, obezitu a porušenou glukózovou toleranci (2).

Již vzniklá ateroskleróza je dějem nevratným. Proto se v rámci terapie zaměřujeme na vlastní prevenci vzniku plátů a to jak režimovými opatřeními, tak farmakologickou léčbou zaměřenou na snížení rizikovosti ovlivnitelných faktorů.

2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Hlavní funkcí cévního řečiště je rozvod krve tkáním a převod pulzního proudění ze srdce na kontinuální proudění v periférii. Cévy tedy v tomto případě plní funkci pružníku. Pružníková funkce tepen je dána elastickými vlastnostmi jejich stěn. Právě elasticita dává cévnímu systému možnost flexibilně reagovat na tlakové změny v krevním řečišti (3).

Na základě typu a velikosti rozlišujeme v rámci cévního řečiště

- Arterie
- Vény
- Kapiláry

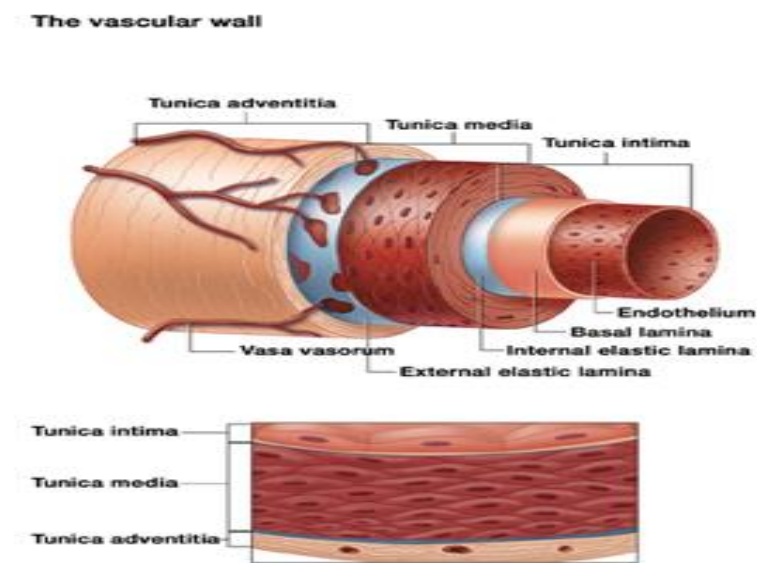
2.1 Základní stavba cév

Stavba cévní stěny vychází ze tří základních vrstev:

- *Tunica intima*
- *Tunica media*
- *Tunica adventitia*

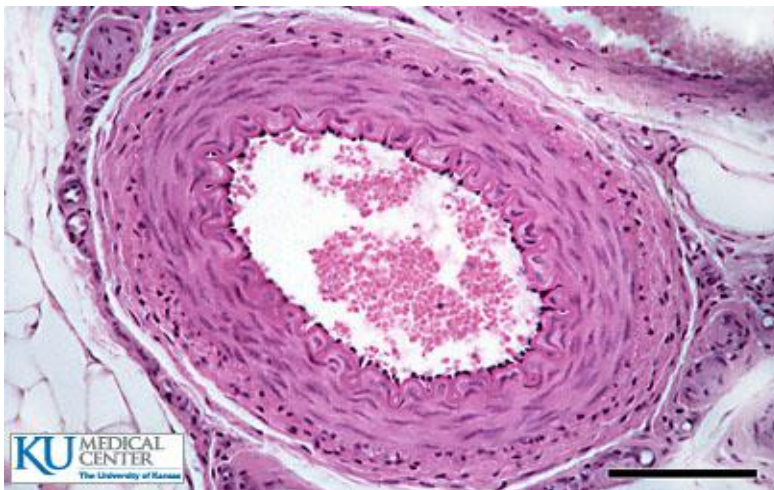
Obrázek 1: Stavba cévní stěny

(4.1.2012), <http://www.taramrusso.com/VascularWall.htm>



Obrázek 2: Mikroskopický preparát cévní stěny (4.1.2012)

<http://www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb/vascular/vasc06.htm>



Tunica intima

Tunica intima je vnitřní vrstva cévní stěny. Její základní vlastnosti vychází z faktu, že je přímo vystavena mechanickému působení krevního proudu. Tvoří ji vrstva endotelových buněk nasedajících na bazální laminu a vrstva subendotelová.

- *Endotel* je charakterizován jako jednovrstevný dlaždicovitý epitel. Buňky jsou zde polygonální, ploché a jsou protažené ve směru proudění krve.
- *Lamina basalis* je produktem endotelových buněk.
- *Subendotelová vrstva* je tvořena řídkým kolagenovým vazivem a částečně i buňkami hladké svaloviny. Tato vrstva dodává intimě mechanickou pevnost a odolnost (3).

Tunica media

Tunica media je střední vrstvou cévní stěny a zároveň je vrstvou nejmohutnější. Její základní složení propůjčuje medii důležitou funkční vlastnost, kterou je elasticita. Právě tato vrstva díky cirkulárně uspořádaným buňkám hladké svaloviny a vmezeřeným elastickým vláknům umožňuje cévní stěně flexibilně reagovat na tlakové změny v krevním řečišti (3).

Tunica adventitia

Tunica adventitia je nejsvrchnější vrstvou cévní stěny. Stojí v přímém kontaktu s okolní tkání a díky této vrstvě je céva do tkáně fixována. U velkých arterií je tunica adventitia prostoupena soustavou drobných cév (*vasa vasorum*), který vyživují cévní stěnu. Její struktura je tvořena řídkým kolagenním vazivem. Převládají zde longitudinálně uložená kolagenní a elastická vlákna. Dále zde nalezneme fibroblasty, adipocyty a buňky hladké svaloviny (3).

2.2 Arterie

Arterie dělíme na základě rozdílů v architektuře, průměru a poměru zastoupení svalové a elastické složky (3).

Tabulka 1: Typy arterií (4.1. 2012), (3)

Typ arterie	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
Velké elastické (např. aorta).	Silná, lumen vystýlá endotel (jednovrstevný dlaždicovitý epitel).	Velké množství koncentrických elastických vláken a mezi nimi hladkosvalové buňky.	Tenká, obsahuje kolagenní a elastická vlákna.
Střední, svalové (např. arteria brachialis, arteria mesenterica superior)	Méně výrazná, lamina elastica interna tvoří hranici mezi intimou a medií.	Silná, tvoří ji více vrstev hladké svaloviny (až 40). Podíl elastinů a proteoglykanů je závislý na velikosti arterie.	Tenká, obsahuje kolagenní a elastická vlákna.
Arterioly (malé cévy s průsvitem 0,1 – 0,5 mm)	Typický endotel, lamina elastica interna může chybět.	1 – 3 vrstvy hladkosvalových buněk, lamina elastica externa chybí.	Velmi tenká, složena z kolagenních vláken.
Metarterioly (malé větve arteriál, jejich stah řídí průtok krve kapilárami)	Typický endotel, není subendotelová vazivová tkáň ani membrana elastica interna.	Jedna nesouvislá vrstva hladké svaloviny.	Nesouvislá vrstva řídkého vaziva, kterou nelze odlišit od medie.

2.3 Vény

Z morfologického hlediska jsou vény blízké tepnám. Základní odlišností je tenčí a flexibilnější stěna. Je zde také méně svalových vláken. Právě na základě těchto morfologických odlišností se na žilách dolních končetin nachází chlopně k usměrnění toku krve (3).

Tabulka 2: *Typy vén (4.1. 2012), (3)*

Typ vény	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
Velké vény (např. vena cava superior a inferior)	Dobře vyvinuta se silnou vrstvou subendotelové tkáně. Její výběžky do lumina se nazývají chlopně.	Několikavrstevná, obsahující retikulární a kolagenní vlákna, méně elastických.	Silná, obsahuje hlavně kolagen a logitudální svazky hladké svaloviny, které ji zesilují.
Malé a střední vény (např. vena portae)	Typický endotel, méně chlopní, membrána elastica interna není.	Tenká obsahující kolagenní a elastinová vlákna.	Relativně silná, obsahuje hlavně kolagen nežli svalovinu.
Venuly (průměr 0,2 - 1 mm)	Typický endotel bez chlopní.	Velmi tenká.	Je nejsilnější, složená hlavně z kolagenu.

2.4 Kapiláry

Kapilární řečiště je označováno jako mikrovaskulární část oběhu. Tvoří spojení mezi arteriálním a venózním oddělením krevního řečiště. Kapiláry se stávají finálním místem látkové výměny, tedy výměny plynů a živin. Průměr kapilár se pohybuje v rozmezí 7-9 μm a jejich délka se pohybuje kolem 1mm. Stěna kapiláry je tvořena buňkami plochého dlaždicovitého epitelu endotelu nasedajícími na bazální laminu. Struktura je dále doplněna nepravidelně rozmístěnými pericyty. Pericyty jsou mezenchymové buňky s dlouhými výběžky tvořící vlastní bazální laminu. Obsahují kontrakční proteiny a svou funkcí tedy doplňují medii. Dle struktury stěny dělíme kapiláry na tři základní typy:

- Kapiláry se souvislou výstelkou (somatické) - svaly, mozek, plíce.
- Kapiláry fenestrované (viscerální) – glomerulus, endokrinní žlázy.
- Kapiláry sinusoidní – játra, slezina.

(4)

3 ENDOTEL

Endotel hraje zásadní roli v regulaci funkcí cévního systému a v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. Nejčastějším projevem poruchy endotelu způsobené vlivem rizikových faktorů je endoteliální dysfunkce. Rizikové faktory jsou hypertenze, hyperlipoproteinémie, diabetes a kouření. Tyto faktory svým chronickým působením poškozují fyziologické funkce endotelu a vedou ke vzniku dysfunkce. Jako endoteliální dysfunkci označujeme stav lokalizovaného či generalizovaného poškození endotelu charakterizovaného zvýšenou permeabilitou cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními a hemokoagulačními mechanismy. Endoteliální dysfunkce tedy hraje důležitou roli v patogenezi aterosklerózy (5,6).

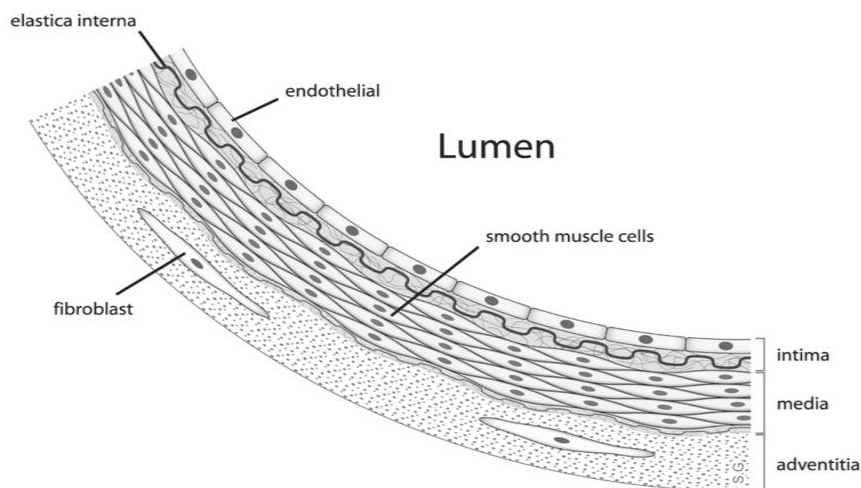
3.1 Stavba a funkce endotelu

Z histologického hlediska je endotel jednovrstevný dlaždicovitý epitel. Tento epitel je také nazýván plochý. Má mozaikovitý vzhled a oploštělé jádro uložené uprostřed (6).

Tyto specializované buňky mají celou řadu regulačních funkcí. Endotel reguluje cévní tonus a permeabilitu, ovlivňuje strukturu cévní stěny, udržuje rovnováhu koagulačních procesů a zajišťuje interakci s buňkami v krevním oběhu (5).

Obrázek 3: Endotel na povrchu cévní stěny (4.1. 2012),

http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Anatomy_artery.png



1. Regulace cévního tonu

Hlavním úkolem endotelu je udržení cévního tonu produkcí vazoaktivních látek. Mezi tyto látky řadíme vazodilatátory a vazokonstriktory. Hlavní vazodilatační látkou je oxid dusnatý (EDRF/NO) a stejný účinek vykazují také bradykinin a prostacyklin (PGI₂). Protipólem a nejsilnější vazokonstrikční látkou je endotelin-1. Do skupiny vazokonstrikčně působících látek dále patří angiotensin II, acetylcholin nebo tromboxan A₂. V případě poškození funkce endotelu dochází k narušení rovnováhy mezi vazoaktivními faktory. Tento stav vede k narušení vazorelaxační schopnosti endotelu a tedy ke spazmu. Nejčastěji k tomuto jevu dochází na základě snížené tvorby oxidu dusnatého a zvýšené produkci vazokonstrikčních faktorů (5).

2. Ovlivnění struktury cévní stěny

Struktura cévní stěny je ovlivněna schopností endotelu tvořit látky s růst stimulujícími a růst inhibujícími účinky. Odpovědí na zvýšené mechanické napětí cévní stěny je produkce růstových faktorů jako je PDGF (růstový faktor tvořený destičkami) a IGF-1 (inzulinu podobný růstový faktor). Mitogenní účinek na hladné svalové buňky a endotel vykazují také endotelin-1 a angiotensin II. Mezi látky inhibující proliferaci a buněčné dělení buněk cévní stěny řadíme EDRF/NO, prostacyklin a TGF- β (*transforming growth factor*)- homodimerní protein pracující jako cytosin (5,6).

3. Antitrombotické a fibrinolytické vlastnosti

Endotel vytváří uvnitř krevního řečiště dokonale nesmáčivý povrch, který udržuje rovnováhu mezi faktory regulujícími trombotické a fibrinolytické procesy. Důležitým koagulačním dějem je kaskáda adheze a agregace trombocytů. Právě této kaskádě zabraňuje endotel tvorbou EDRF/NO a prostacyklinu. Tyto dva faktory tedy působí antikoagulační aktivitou. Tato aktivita spočívá ve vytváření bariéry mezi cirkulujícími koagulačními faktory a tkáňovým faktorem a v produkci antikoagulačně působícího heparan sulfátu a trombomodulinu. Protichůdným dějem koagulace je fibrinolýza. Na její regulaci se endotel podílí tvorbou plazminogenového aktivátoru (tPA) a inhibitorů plazminogenových aktivátorů (PAI-1,2) (5).

4. Interakce s buňkami krevního oběhu

Důležitou funkcí cévního endotelu je exprese adhezivních molekul na jeho povrch. Tyto molekuly zprostředkovávají interakce s buňkami krevního oběhu. Za běžného fyziologického stavu je na povrchu endotelu pouze minimum adhezních molekul. Za této situace je adheze mezi buňkami krevního oběhu a endotelem minimální. V případě aktivace endotelu dochází ke zvýšené expresi adhezních molekul

(E-selektin, ICAM-1 - intercelulární buněčná adhezivní molekula, VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezivní molekula) na povrchu endotelu a leukocytů. Dochází tak k usnadnění adheze a průniku leukocytů do cévní stěny (5, 6).

5. Regulace permeability

Jednou z nejdůležitějších funkcí endotelu vůbec je vytvoření bariéry mezi krevním řečištěm a cévní stěnou. Endotel zde funguje jako selektivní bariéra bránící průniku škodlivých látek do cévní stěny. V případě patologických změn vzniklých poškozením endotelu, aktivací zánětlivými působky či ischemií, se zvyšuje propustnost endotelu pro aterogenní lipidy a monocyty. Endotel tedy ztrácí svou funkci selektivní bariéry. Výsledkem těchto dějů je subendoteliální kumulace výše uvedených fragmentů vedoucí k rozvoji zánětlivé reakce a iniciaci pochodů směřující k vytvoření aterosklerotického plátu (5).

3.2 Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce

Endotel je v neustálém kontaktu s okolním prostředím. Flexibilně tak odpovídá na celou řadu lokálních i systémových podnětů. K aktivaci endotelu dochází právě na základě těchto podnětů. Výsledkem aktivace endotelu může být změna permeability, vazospastická reakce, porušení hemostatických mechanismů a uvolnění růstových faktorů. Aktivace endotelu lze chápat jako přechodný reverzibilní stav vyvolaný např. virovou infekcí nebo krátkodobou expozicí aktivačními faktory. Rizikové faktory KVO jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, kouření, hyperhomocysteinémie nebo nedostatek estrogenů svým chronickým působením poškozují fyziologické endoteliální funkce a vedou ke vzniku endoteliální dysfunkce. Endoteliální dysfunkce je stav lokalizovaného či generalizovaného poškození endotelu charakterizovaného zvýšenou propustností cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi faktory vazorelaxačními a vazokonstrikčními, prokoagulačními a antikoagulačními, růst stimulačními a růst inhibujícími. Výsledkem tohoto děje je proaterogenní účinek s převahou vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů vedoucí k progresi aterosklerózy. Právě endoteliální dysfunkce je společným jmenovatelem celé řady KVO. Porucha funkce endotelu hraje důležitou roli v patofyziologii aterosklerózy, hypertenze, diabetu, ICHS, srdečního selhání či cévních mozkových příhod (7).

Obrázek 4: Rizikové faktory působící endoteliální dysfunkci (4.1. 2012),

<http://www.japi.org/september2007/R-643.htm>

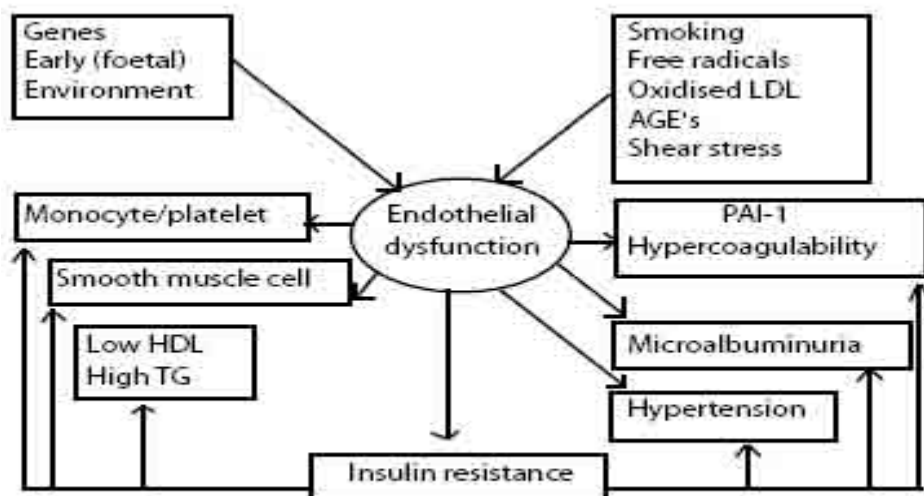


Fig. 1 : Endothelial dysfunction and insulin resistance

3.3 Hyperlipoproteinémie a endoteliální dysfunkce

Při působení aterogenních lipidů na endotel dochází ke snížení aktivity vasodilatačně působícího faktoru NO. Ke snížení aktivity dochází vlivem odbourávání NO prostřednictvím kyslíkových radikálů. Tento proces vede k proliferaci růstových faktorů a k subendoteliálnímu průniku monocytů a LDL částic vedoucím k vytvoření pěnových buněk. Přítomnost lipoproteinů vede k inhibici fybrinolytických pochodů a dochází k adhezi a agregaci trombocytů, jejichž výsledkem jsou trombotické komplikace (8).

3.4 Hypertenze a endoteliální dysfunkce

U pacientů s arteriální hypertenzí dochází vlivem tlakové přetížení cévní stěny velice často k poškození endotelu. K hlavní spouštěcí mechanismem tohoto poškození je zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron a snížená aktivita vazodilatačních působků (EDRF/NO, prostacyklinu). Vlivem nastalé endoteliální dysfunkce dochází ke zvýšené permeabilitě cévní stěny a k zvýšené expresi adhezních molekul cévního endotelu. Tento stav vede k adhezi a průniku zánětlivých buněk do cévní stěny. Dochází tak k rozvoji zánětlivé reakce a ke strukturním změnám. Tyto změny se po

morfologické stránce projevují hypertrofií a hyperplazií hladkých svalových buněk a tedy zbytněním cévní stěny (9).

3.5 Diabetes mellitus a endoteliální dysfunkce

Glykosylace proteinu a glykace bílkovin způsobené hyperglykemickými stavy vede ke zvýšené permeabilitě endotelu pro aterogenní lipidy. Hyperglykémie také aktivuje cévní endotel k zvýšené expresi adhezních molekul a dochází ke zvýšenému průniku monocytů do lumen cévní stěny. Narušena je také rovnováha vazoaktivních a koagulačních faktorů. Tato situace ústí v patologické spastické stavy cévní stěny a v hyperkoagulační reakci v daném místě (2).

3.6 Ateroskleróza a endoteliální dysfunkce

Chronické působení rizikových faktorů jakou jsou např. kouření a hypertenze vede k poškození fyziologické funkce endotelu. Vznik endoteliální dysfunkce je iniciačním krokem ke vzniku aterosklerózy. V první fázi rozvoje aterosklerózy vede zvýšená permeabilita cévního endotelu ke zvýšenému průniku aterogenních lipidů a monocytů do cévní stěny. K rozvoji endoteliální dysfunkce přispívá nedostatečná produkce vazodilatačně, antiadhezivně a antitromboticky působícího NO a zvýšená syntéza kontraktilních a růst stimulačních faktorů. Toto vše přispívá k progresi patologické reakce. Při cirkulaci leukocytů v blízkosti aktivovaného endotelu dochází k interakci s adhezivními molekulami, jejichž výsledkem je adheze a migrace do subendotelového prostoru. V tomto prostoru dochází k oxidaci LDL částic, které jsou následně fagocytovány monocyty a mění se na pěnové buňky. Výsledkem tohoto děje je vznik tukových proužků. Tyto proužky signalizují primární stadium aterosklerózy a postupnou agregací krevních buněk a lipoproteinů dochází k vytvoření aterosklerotického plátu. V pokročilých fázích aterosklerózy se zvyšuje trombotická aktivita v místě endoteliální dysfunkce a s ní roste riziko ruptury aterosklerotického plátu. Dochází tak k vytvoření nestabilního aterosklerotického plátu s vysokým obsahem lipidů a makrofágů, které se klinicky mohou manifestovat akutními kardiovaskulárními příhodami (10).

3.7 Screening endoteliální dysfunkce

V současné době nám moderní medicína nabízí tři základní metody detekce dysfunkce endotelu.

- Sledování cévní reaktivity na vazoaktivní podněty.
- Laboratorní stanovení markerů endoteliální dysfunkce.
- Sledování metabolismu značených prekurzorů.

Sledování cévní reaktivity na vazoaktivní podněty

Při této metodě se používá průkaz narušené vazorelaxační schopnosti cév na farmakologické podněty (např. průkaz patologické vazokonstrikce po podání acetylcholinu) nebo nefarmakologické testy (např. „flow mediated“ dilatace na předloktí po zvýšení průtoku). Výsledek se hodnotí invazivními metodami (angiograficky) nebo neinvazivně pomocí ultrasonografie.

Laboratorní stanovení markerů endoteliální dysfunkce

Další možností je laboratorní stanovení látek produkovaných endotelem. Stanovují se např. hladiny endotelinu-1, EDRF/NO, adhezních molekul (E a P-selektin, ICAM-1, VCAM-1), hemokoagulačních faktorů (PAI, t-PA, vWf) a zánětlivých mediátorů c-reaktivních proteinů (CRP).

Sledování metabolismu značených prekurzorů

Jedná se o dynamické testy, které sledují osud radioizotopem značeného substrátu např. L-argininu (11).

3.8 Léčba endoteliální dysfunkce

Léčbou endoteliální dysfunkce můžeme předejít rozvoji aterosklerózy. Zabráníme přechodu funkčních změn ve změny strukturální a můžeme docílit stabilizace již vytvořeného aterosklerotického plátu. Právě transformace plátu na stabilní formu může významně zlepšit prognózu celého onemocnění. Léčba onemocnění spojených s endoteliální dysfunkcí by měla směřovat k obnovení fyziologických funkcí endotelu eliminací rizikových faktorů. Tento směr léčby můžeme označit jako režimová opatření. Tyto opatření bereme jako základ úspěšné terapie, k nim pak přidáváme

vhodnou farmakologickou léčbou stimulující vazodilatační, antiadhezivní a antiagregační vlastnosti endotelu.

Nefarmakologická léčba- režimová opatření

Principem režimových opatření je odstranění rizikových faktorů úpravou životosprávy. Tato léčba vyžaduje maximální adherenci pacienta k nastaveným režimovým opatřením. Vyloučení vlivu kouření vede do několika měsíců k normalizaci endoteliálních funkcí. Zlepšení endoteliální dysfunkce můžeme také dosáhnout úpravou glykémie u diabetiků. U nemocných se srdečním selháním a všech pacientů obecně klademe důraz na přiměřené zvýšení fyzické aktivity v aerobním rozsahu. Důležitá je také změna dietních návyků u nemocných s hyperlipoproteinémií. Všechna výše popsaná režimová opatření slouží také jako primární prevence vzniku aterosklerózy.

Farmakologická léčba

Mezi základní farmaka používaná v léčbě endoteliální dysfunkce patří tyto:

1. Hypolipidemika
2. Inhibitory ACE
3. Antioxidační látky
4. Estrogeny
5. Blokátory kalciových kanálů

(12)

4 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je pomalu progredující zánětlivé onemocnění postihující cévy tepenného řečiště, které vzniká na podkladě endoteliální dysfunkce. Samotný pojem ateroskleróza vznikl jako spojení řeckých slov *atharé*= kaše a *sklerós*= tvrdý. Toto spojení svým smyslem dokonale charakterizuje vlastnosti hlavní jmenovatele aterosklerózy, aterosklerotického plátu. Tento plát je výsledkem kaskády reakcí kde na počátku stojí dysfunkce cévního endotelu a dále dochází ke kumulaci lipidických složek, cholesterolu, monocytů, makrofágů, mediátorů zánětu, buněk hladké svaloviny, ke zmnožení fibrózní tkáně a k nahromadění odpadních látek a vápníku v cévní stěně.

Nadřazeným pojmem v problematice aterosklerózy je arterioskleróza. Tento termín zahrnuje aterosklerózu, arteriolosklerózu a Monckebergovu mediokalcinózu. Tyto stavy se od sebe liší lokací a velikostí postižených tepen. Ateroskleróza je onemocnění velkých a středních tepen a to hlavně svalového a elastického typu, např. věnčitých tepen, aorty a arterií dolních končetin. Arterioloskleróza postihuje malé arterie a arterioly. Dochází ke ztluštění jejich stěn a tedy k postupnému zúžení cévního lumina vedoucímu až k ischemii dané oblasti. Tyto změny se nejčastěji objevují u pacientů s hypertenzí a diabetem, tedy u pacientů se zvýšeným rizikem výskytu mikroangiopatií. Monckebergova mediokalcinóza je označení stavu, kdy dochází ke kalcifikaci a hyelinizaci *tunica media* tepen horních a dolních končetin. Toto se projevuje zvýšením tuhosti cévy, v extrémních případech se cévy mohou stát až hmatné, ale nedochází ke zúžení řečiště (13).

Ateroskleróza postihuje většinou starší pacienty, ale v některých případech lze již kolem dvacátého roku zaznamenat při běžném pozorování změny na stěně cévy charakterizované žlutými proužky různé velikosti a tvaru. Tyto proužky později přechází ve fibrózní pláty, dochází ke kalcifikaci a následně vznikají ateromové pláty. Na příkladu této kaskády můžeme tedy jasně vidět, že ateroskleróza je onemocnění postupně progredující (13).

Z anatomického hlediska a lokace postižených tepen rozdělujeme aterosklerózu na typ centrální a periferní. Jako centrální typ označujeme aterosklerotické změny probíhající na aortě. Zde je nejvíce postižena břišní oblast. Po rozvětvení aorty bývají shodně postiženy i obě velké tepny směřující do končetin. V případě výrazného postižení stěny aorty aterosklerózou dochází ke snížení její pevnosti a zvyšuje se riziko vzniku výdutí- aterosklerotické aneurysma. Tato situace pacienta přímo ohrožuje na životě z důvodu prasknutí vytvořené výdutě a tedy masivnímu vnitřnímu krvácení. Druhým případem je periferní typ aterosklerózy. Zde jsou postiženy především mozkové, věnčité a ledvinové tepny. Aterosklerotické změny vedou ke zúžení cévního průsvitu, nasedající trombóze a může dojít až ke krvácení do aterosklerotického plátu. Tento stav vede k ischemickým změnám v orgánech, které tepny zásobují kyslíkem. Takto vzniklé změny jsou většinou ireverzibilní a rozsah poškození závisí na době trvání ischemie a velikosti postižené tkáně. Právě komplikace aterosklerózy jsou jedním z nejčastějších příčin úmrtí (13).

4.1 Epidemiologie

KVO z nichž naprostá většina je způsobena aterosklerózou jsou hlavní příčinou úmrtnosti obyvatel v průmyslově rozvinutých zemích. Přesné statistiky, jaké procento pacientů aterosklerózou trpí, nebývají prezentovány s ohledem na skutečnost, že jejich vypovídací hodnota je značně zkreslena. Příčinou zkreslení je fakt, že nemocní bývají zachyceni až v době, kdy se u nich ateroskleróza klinicky manifestuje formou ICHS, ICHDK, cévní mozkovou příhodou apod. V České republice je více než 50% úmrtí způsobeno vlivem KVO. Každých 9 minut zemře jeden člověk na onemocnění srdce a cév (2).

Tabulka 3: Příčiny úmrtnosti v ČR v roce 2000 (%) (2.1. 2012), (2)

	úmrtnost v ČR v r. 2000 (%)	
	muži	ženy
kardiovaskulární onemocnění	49,6	54,9
nádory	28,1	25,9
ostatní	22,3	29,2

4.2 Rizikové faktory aterosklerózy

Soubor faktorů, které napomáhají rozvoji aterosklerózy, označujeme jako rizikové faktory aterosklerózy. Vzájemná kombinace těchto faktorů výrazně zvyšuje predispozici k ateroskleróze u exponovaných jedinců. Jejich působení vyvolává poškození endotelu a následný rozvoj zánětlivé reakce v subendoteliálním prostoru cévní stěny. Základní dělení rizikových faktorů vychází z jejich modifikovatelnosti. Dělíme je tedy na rizikové faktory nemodifikovatelné (neovlivnitelné) a rizikové faktory modifikovatelné (ovlivnitelné) (1).

Nemodifikovatelné (neovlivnitelné) rizikové faktory

- Věk
- Pohlaví
- Rodinná anamnéza
- Příslušnost k etnické skupině

Modifikovatelné (ovlivnitelné) rizikové faktory

- Kouření
- Dyslipidémie- snížení hladiny HDL x zvýšení hladiny LDL
- Hypertenze
- Diabetes mellitus
- Porušená glukózová tolerance
- Obezita centrálního typu
- Nedostatek tělesné aktivity
- Hyperhomocysteinémie

Rizikové faktory mají aditivní charakter. To znamená, že u pacientů u kterého diagnostikujeme více rizikových faktorů zároveň, má významně vyšší riziko vzniku a rozvoje aterosklerózy než pacient s jedním diagnostikovaným faktorem (1, 2).

Pokud u pacienta diagnostikujeme několik rizikových faktorů současně, pak hovoříme o takzvaném metabolickém syndromu. Tento stav přináší pacientům zvláště vysoké riziko vzniku a rozvoje aterosklerózy a pozdějších komplikací. V České republice trpí metabolickým syndromem asi 25% populace v produktivním věku a 40% seniorů (1,2).

Tabulka 4: *Metabolický syndromu, (2.1. 2012), <http://www.cims-ops.cz/cz/uvod>*

Definice metabolického syndromu

- **Abdominální obezita:** muži ≥ 102 cm
ženy ≥ 88 cm
- TG $\geq 1,7$ mmol/l (nebo hypolipidemická léčba)
- HDL-ch muži $< 1,0$ mmol/l **≥ 3 RF**
ženy $< 1,3$ mmol/l
- TK ≥ 130 / ≥ 85 mmHg nebo antihypertenzní léčba
- Glykémie nalačno $\geq 5,6$ mmol/l nebo PGT nebo DM2

TG = triglyceridy, HDL-ch = high density lipoprotein cholesterol, TK = krevní tlak, PGT = porušená glukózová tolerance, DM 2 = diabetes mellitus 2. typu

Podle: K.G.M.M. Alberti, Robert H. Eckel, Scott M. Grundy et al. A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, and International Association for the Study of Obesity. Circulation 2009;120:1640-1645.

4.3 Tabulka kardiovaskulárního rizika

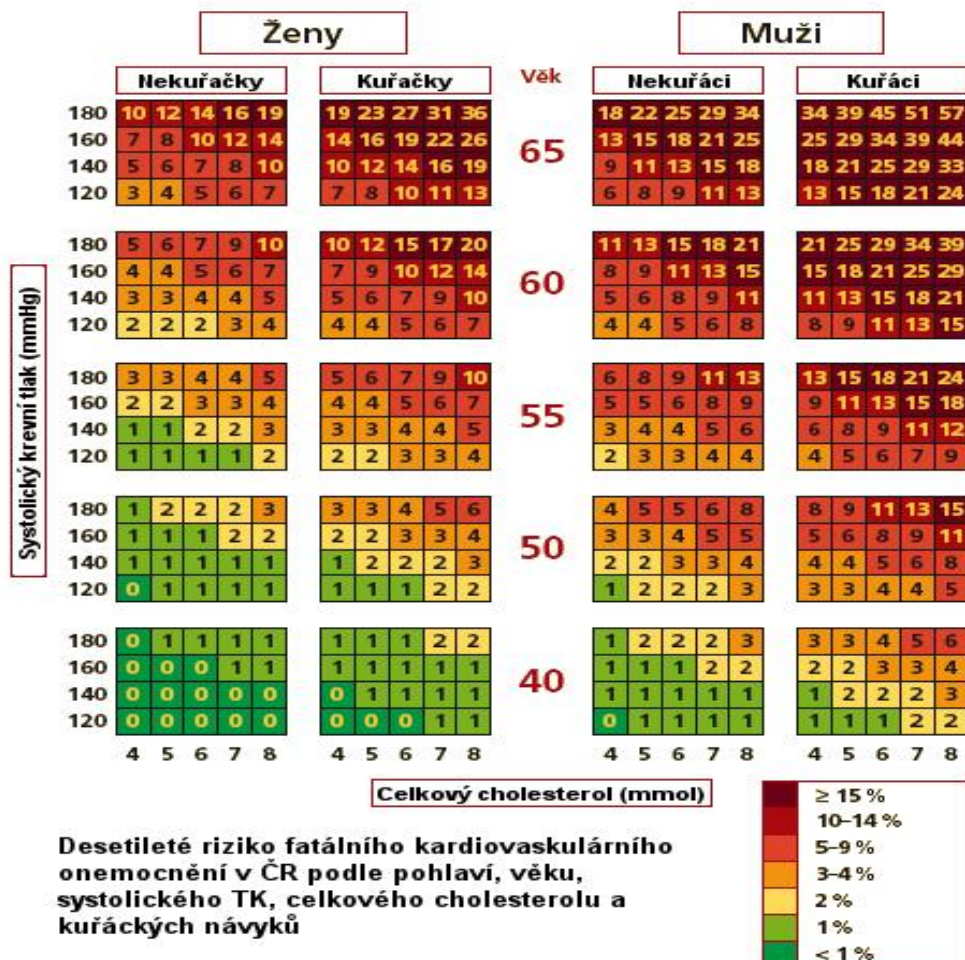
Tato tabulka je výsledkem projektu Score. Pro správnou aplikaci této tabulky je nutné znát:

- Pohlaví pacienta
- Věk pacienta
- Kuřák x nekuřák
- Hladinu cholesterolu
- Krevní tlak

Průnik všech výše uvedených hodnot v daném pásmu nám pak ukáže procentuální riziko úmrtí na KVO v příštích deseti letech (2).

Tabulka 5: Tabulka kardiovaskulárního rizika (2.1. 2012),

<http://www.athero.cz/odkazy-a-zdroje-informaci/vypocet-rizika/tabulka-kardiovaskularniho-rizika.html>



Tabulka 6: Interpretace hodnot (2.1. 2012), <http://www.athero.cz/odkazy-a-zdroje-informaci/vypocet-rizika/tabulka-kardiovaskularniho-rizika.html>

Hodnoty absolutního rizika KVO jsou vyšší než hodnoty odečtené z tabulky SCORE:

- u osob, které se věkem přibližují vyšší věkové kategorii
- u asymptomatických osob s preklinickými známkami aterosklerózy (zjištěnými při sonografickém vyšetření nebo při nálezů kalcifikací v tepnách či při stanovení kalciového skóre pomocí CT)
- u osob s pozitivní rodinnou anamnézou KVO (prvostupňoví příbuzní ve věku do 55 let u mužů; do 65 let u žen)
- u osob s nízkou koncentrací HDL-cholesterolu (< 1,0 mmol/l u mužů; < 1,2 mmol/l u žen), zvýšenou koncentrací triglyceridů (> 1,7 mmol/l)
- u osob s porušenou glukózovou tolerancí (glykemie v žilní plazmě na lačno < 7,0 mmol/l; při orálním glukózovém tolerančním testu za 2 hod. 7,8–11,0 mmol/l)
- u osob se zvýšenou hladinou C-reaktivního proteinu (stanoveného vysoce senzitivní metodou), fibrinogenu, homocysteinu, apolipoproteinu B nebo Lp(a)
- u obézních nebo fyzicky inaktivních osob

16.06.2007 | Athero

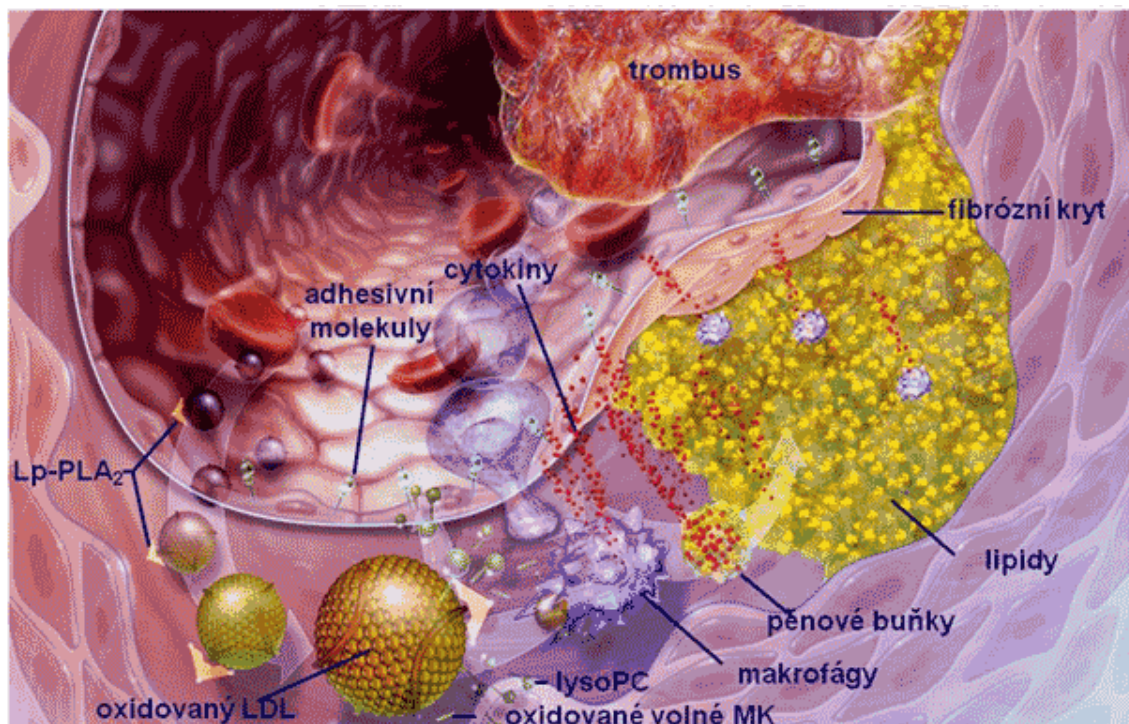
4.4. Nové rizikové faktory aterosklerózy

Je známou skutečností, že jedinci, kteří mají z hlediska spektra klasických rizikových faktorů „nízké riziko“, mohou být komplikacemi aterosklerózy postiženi. To vedlo ke studiu dalších faktorů, jejichž určení pomáhá zvýšit úspěšnost v odhalování predisponovaných pacientů. Celkové riziko manifestace onemocnění se při současném výskytu několika rizikových faktorů spíše násobí, než sčítá. Proto je posledním trendem tzv. odhad celkového rizika (global risk assessment), který je podkladem pro vytvoření algoritmů ke stanovení preventivních a terapeutických opatření. V současné době je tedy věnováno úsilí na identifikaci nových faktorů, které by dále zvýšily možnosti odhalení rizika KVO. V tomto ohledu je nyní pozornost věnována faktorům zánětu jako jsou C-reaktivní protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), markerům preklinické aterosklerózy (zvýšené kalciové skóre koronárních arterií), zvýšení IMT (intima media thickness), faktorům ukazujícím změnu hemokoagulační rovnováhy, ukazatelům oxidačního stresu, hladině homocysteinu a také hladině leptinu nebo adiponektinu (14).

4.5 Patogeneze aterosklerózy

Patogeneze aterosklerózy vychází z kaskády na sebe navazujících reakcí, jejichž výsledek je definován jako chronické zánětlivé onemocnění postihující cévní stěnu. Toto onemocnění postupně progreduje a dá se rozdělit do několika fází (14).

Obrázek 5: Postup aterosklerózy (8.1. 2012), <http://www.medista.cz/funkce-lpllasub2sub/laboratore/plac%C2%AE-test/produkty/medista-sro/?id=71>



4.5.1 Patogenní působení lipoproteinů

Lipidy jsou krví transportovány v podobě kulovitých molekulárních komplexů, tyto komplexy nazýváme lipoproteiny (LP). Lipoproteinová partikule se skládá z jádra a obalu. Obal tvoří amfifilní lipidy- cholesterol a fosfolipidy. Jádro je tvořeno ze silně hydrofobních lipidů- triacylglyceroly (TG) a estery cholesterolu, ty tvoří transportní a skladovací formu cholesterolu. LP se rozlišují dle velikosti, denzity, složení lipidů a rovněž na základě svých apolipoproteinů. Apolipoproteiny jsou strukturální elementy LP a slouží jako ligandy pro LP-receptory v membráně LP-cílových buněk (15).

Hlavní úlohu v patogenezi aterosklerózy hrají LDL (low density lipoprotein) částice. LDL částice jsou hlavní partikule pro transport cholesterolu, takže právě díky LDL částicím vstupuje cholesterol do stěny arterie (15).

Prekurzorem LDL částic jsou VLDL (very low density lipoprotein) částice. Z nich účinkem endotelové lipoproteinové lipázy vznikají IDL (intermediate density lipoprotein) částice a ty jsou dále štěpeny jaterní a lipoproteinovou lipázou na LDL částice (15).

Ve stěně arterie dochází k odbourávání pohlcených LDL částic navázáním na LDL receptory prostřednictvím ApoB a ApoE. Druhou cestou je pak navázání na scavengerové receptory buněk monocyto-makrofágové linie. Na rozdíl od klasických LDL receptorů není počet scavengerových receptorů zpětně regulován. S rostoucí koncentrací LDL se lineárně zvyšuje akumulace těchto částic v monocitech a makrofázích, tím je potencována jejich změna v pěnové buňky a akceleruje se rozvoj aterosklerózy (16).

Oxidace a glykace přeměňuje LDL částice do formy, ve které jsou přednostně vychytávány scavengerovými receptory monocytů a makrofágů. Tato chemická modifikace LDL je způsobena nadbytkem volných radikálů. To vede ke vzniku oxidované formy LDL částic, které působí jako antigen stimulující imunitní systém ve stěně cévy. Dle některých předpokladů je právě hladina oxidovaného LDL určující pro nástup a rozvoj aterosklerózy (16).

Tabulka 7: Přehled LP a jejich působení (8.1.2012),

<http://pfyziolfup.upol.cz/castwiki2/?p=1449>

Lipoprotein (LP)	zdroj	složení *	funkce	riziko aterosklerózy
Chylomikra -CL	střevo	TAG (90%), FL, CH, CHE, ApoA, B48 C, E	Transport exogenních lipidů přijatých v potravě	neovlivňují
CL remnants	CL	TAG(70%), FL, CH, CHE	-	zvyšují ++
LP o velmi nízké hustotě (VLDL)	játra	TAG(55%), FL, CH, CHEApoB100, C, E	Transport endogenních lipidů	mírně zvyšují +
LP o střední hustotě (IDL)	VLDL	TAG(23%), CH (38), FL, CHEApoB100, E	-	silně zvyšují +++
LP o nízké hustotě (LDL)	IDL	TAG, CH(50%), CHE. FLApoB100	Transport CH do jater a ostatních tkání	silně zvyšují +++
LP o vysoké hustotě (HDL)	játra, střevo	CH(19%), CHE, FL, TAGApoAI, AII, C, E	Transport CH z extrahepatálních tkání do jater	silně snižují ---

*Pozn. CH-cholesterol, CHE –cholesterolester, TAG-triacylglyceroly, FL-fosfolipidy, Apo-apoprotein

4.5.2 Vliv endotelu na patogenezi aterosklerózy

Endotel je jednovrstevný dlaždicovitý epitel. Jeho ploché a protáhlé buňky tvoří nejnvnitřnější vrstvu cévní stěny. Má celou řadu fyziologických regulačních funkcí a je mechanicky odolný vůči tlakovým změnám uvnitř krevního řečiště (1).

Důležitým faktorem v patogenezi aterosklerózy je aktivace endotelu. Na aktivaci endotelu se kromě zánětu a oxidované formy LDL částic podílí i klasické rizikové faktory jako jsou kouření, hypertenze atd. Aktivované buňky endotelu mění svůj tvar a funkci. Stávají se okrouhlými, prolifерují a zvyšují svou permeabilitu. Stávají se tedy propustnější pro oxidované částice LDL a další elementy aterosklerotického procesu. Na povrchu dochází k expresi řady adhezních molekul, které umožňují navázání krevních monocytů a dalších buněk imunitního systému. Mezi adhezivní molekuly patří:

- VCAM- 1 (vascular cell adhesion molecul- 1)
- ICAM- 1 (intercelluar cell adhesion molecul- 1)
- Selektiny E, P

Dalším faktorem podílejícím se na patogenezi aterosklerózy je snížená tvorba vazodilatačně působící molekuly NO. Tento jev je vyvolán přímou inhibicí NO- syntézy prostřednictvím oxidované formy LDL částic. Snížení množství vazodilatačně aktivních molekul NO vede k rozvratu rovnováhy mezi vazoaktivními látkami. Výsledkem je převaha vazokonstrikčně aktivních faktorů a tedy spasmus cévní stěny. Snížením hladiny molekul NO také dochází k agregaci trombocytů a adhezi leukocytů. Endotelové buňky se také podílí na regulaci koagulačních a fibrinolytických aktivit, které jsou za fyziologického stavu v rovnováze. Vlivem patologických změn v endotelu však dochází k zvýraznění prokoagulačních vlastností (1).

4.5.3 Monocyty a makrofágy v patogenezi aterosklerózy

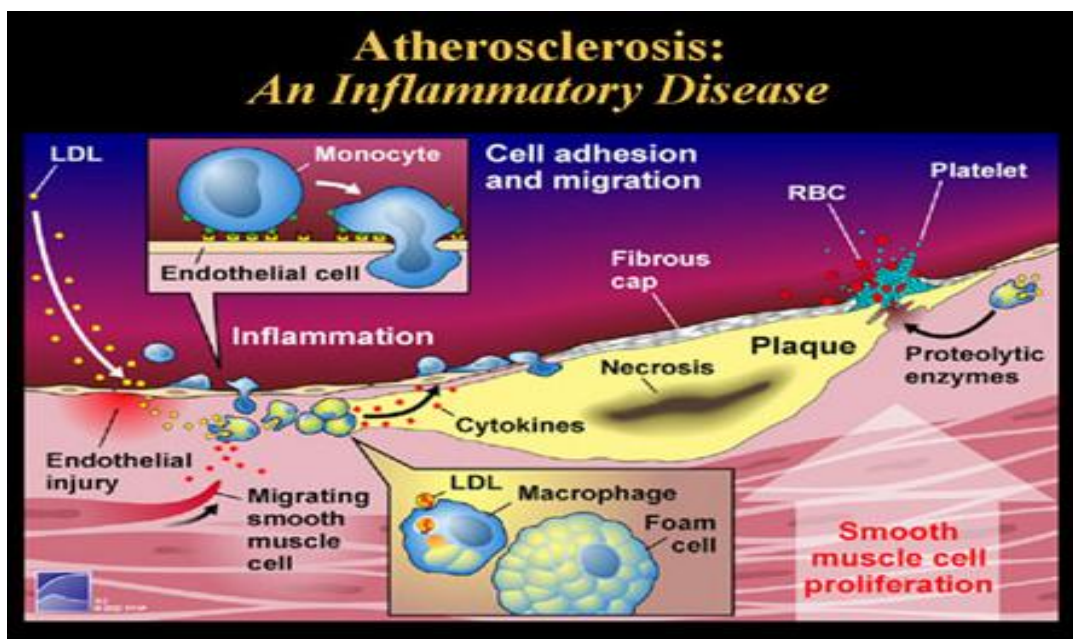
Buňky monocyto-makrofágové linie jsou centrálními buněčnými elementy, které se podílí na progresi aterosklerózy. Ve větším či menším množství nalezneme tyto buněčné elementy ve všech aterosklerotických plátech. Prvním krokem interakce monocytů a cévní stěny je adheze k aktivovaným endotelovým buňkám. Po přechodu do intimy je zahájena aktivace a diferenciacie monocytů a jejich finální přeměna v makrofágy. Právě makrofágy jsou velice aktivními elementy v patogenezi

aterosklerózy. Tvoří růstové faktory, mediátory zánětu a další enzymy. V největší míře je makrofágy produkován růstový faktor VEGF (vascular endothelia growth factor). Mediátory zánětu produkovanými v intimě pak jsou IL- 1 (interleukin 1), IL- 2 (interleukin 2), TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa), INF- γ (interferon gama). Všechny tyto faktory vedou k další aktivace buněk monocyto- makrofágové linie a akceleraci proaterosklerotických procesů (16).

Makrofágy mají na svém povrchu specifické LDL receptory. Jejich počet je regulován zpětnovazebně dle hladiny cholesterolu. Druhým receptorovým systémem na povrchu makrofágů jsou scavengerové receptory. Jejich struktura je blízka LDL receptorům a jejich množství není zpětnovazebně regulováno hladinou cholesterolu. Proto se v prostředí s nadbytkem LDL zvětšuje počet scavengerových receptorů a tím roste absorbované množství LDL částic makrofágem. Vyšší specifitu vykazují tyto receptory k oxidované formě LDL. Rychlá akumulace lipidů vede ke zvětšení makrofágu, který tak uvázne ve stěně arterie. Postupně zde dochází k přeměně makrofágu v pěnovou buňku. Makrofág tak podléhá apoptóze. Pěnové buňky se pak stávají základním buněčným elementem aterosklerotického plátu. Důležitým znakem pěnových buněk je jejich nestabilita, které vede k rozpadu a vzniku extracelulární masy ateromu (16).

Obrázek 6: *Progrese patogeneze aterosklerózy (8.1. 2012),*

<http://lancastria.net/blog/atherosclerosis-link-to-alzheimers.html>



4.5.4 Markery zánětu v patogenezi aterosklerózy

Zánět hraje klíčovou roli v patogenezi aterosklerózy. Jedna z definic vidí aterosklerózu jako chronické zánětlivé onemocnění cévní stěny. Na vzniku zánětu se podílejí všechny výše uvedené mechanismy. Lokálně vzniklý zánět alteruje progresi aterosklerózy a mediátory zánětu působí jako mesengery v celé kaskádě aterosklerotických reakcí (17).

Tabulka 8: Markery zánětu (8.1. 2012), <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fosfolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141>

Skupina markerů	Příklad molekuly
adhezní molekuly	VCAM-1, selektin-P, selektin-E
cytokiny	tumor necrosis factor, IL-1, IL-18,
proteázy	MMP-9
messenger cytokiny	IL-6
destičkové působky	CD-40L, MRP (myeloid-related protein)
adipokiny	adiponektin
reaktanty akutní fáze	CRP, SAA, PAI-1, fibrinogen
markery vaskulárního zánětu	Lp-PLA2

4.5.5 Fáze aterosklerózy

Patologické změny probíhající v cévní stěně během progresu aterosklerózy se dají rozdělit do tří základních stadií:

- I. Stadium- tvorba lipidového proužku

Přes endotel pronikají do cévní stěny LDL částice. Jejich přítomnost aktivuje buňky monocyto-makrofágové linie, které pronikají přes poškozený endotel a fagocytují lipidové částice. Rychlá akumulace lipidů uvnitř makrofágu vede k jeho zvětšení. Makrofág je transformován na

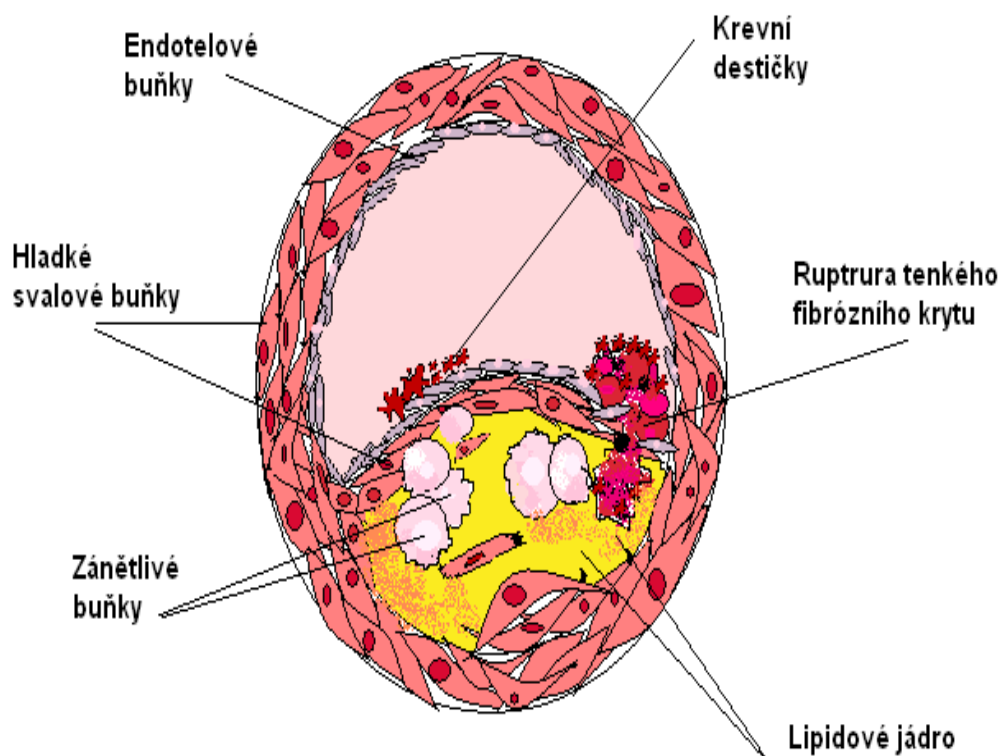
pěnovou buňku a dochází k jeho apoptóze. Tím je zahájen první krok v procesu aterosklerózy, zatím zcela bez klinických projevů. Makroskopicky se tyto změny projevují jako nažloutlé lokalizované tečky či proužky. Lipidové proužky vzniklé v tomto stadiu pak dále progredují v navazujících procesech (18).

- II. Stadium- tvorba fibrózního plátu

Fibrózní plát již prominuje do lumen cévy a zužuje její průsvit. Dostavuje se tedy manifestace prvních klinických příznaků. Fibrózní plát je tvořen proliferujícími buňkami hladké svaloviny, vazivem, lipidy, pěnovými buňkami a makrofágy v různém stadiu transformace. Dochází zde také ke ztluštění a vyklenutí intimy. Tento prostor je vyplněn prostor je vyplněn ateromovou masou, tedy žlutou nekrotickou hmotou obsahující velké množství krystalků cholesterolu (18).

Obrázek 7: Aterosklerotický plát (9.1.2012)

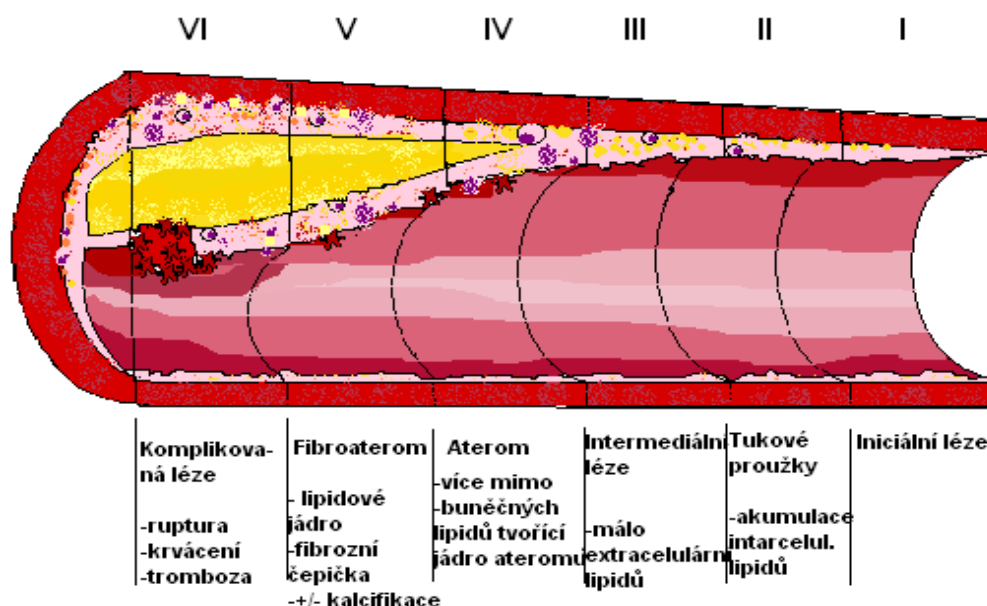
<http://pfyziolfup.upol.cz/castwiki2/?p=1449>



- III. Stadium- ateromový vřed
Ateromový vřed vzniká z ateromového plátu, u kterého dojde k ruptuře povrchu. Dochází tak k odhalení subendotelových vláken a ateromové hmoty. To v daném místě způsobí kumulaci krevních elementů a vytvoření trombu. Vytvoření trombu a totální ischemie dané oblasti je jednou z nejčastějších komplikací aterosklerózy (18).

Obrázek 8: Progrese aterosklerózy (6.1. 2012),

<http://pfyziolfup.upol.cz/castwiki2/?p=1449>



4.5.6 Buňky hladké svaloviny v patogenezi aterosklerózy

Buňky hladkého svalstva se nachází v cévní stěně ve dvou fenotypech. A to v podobě kontraktilní a syntetické. Syntetický typ je stimulován PDGF, FGF a TGF k proliferaci a k sekreci komponent extracelulární matrix. Buňky hladkého svalstva tak zvětšují celkovou hmotu ateromu. Současnou tvorbou extracelulární matrix se plát zpevňuje a stabilizuje proti ruptuře (16).

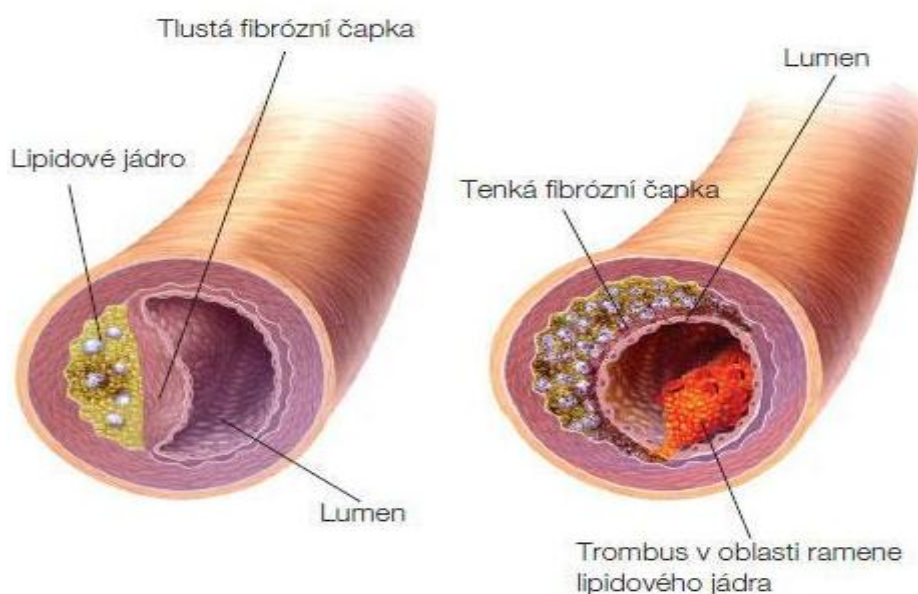
4.6 Typy aterosklerotického plátu

Dle morfologie rozlišujeme dva typy aterosklerotického plátu. Buňky hladkého svalstva cévní stěny proliferují a migrují do subendotelového prostoru. Zde vytvářejí mezibuněčnou hmotu (kolagen, proteoglykany, elastin). Zároveň se zde vyskytují proteolytické enzymy, které tuto hmotu rozpouštějí a umožňují buňkám migraci. Zmnožování vaziva vznikají fibrózní pláty. Dále dochází k postupnému odumírání pěnových buněk a akumulovaný tuk se uvolňuje do mezibuněčného prostoru. Takto vzniklým ložiskům říkáme ateromové pláty (2).

Charakter vazivové čepičky dále určuje typ plátu dle stability. Pláty se silnou, málo buněčnou čepičkou zůstávají stabilní. Nemají tedy tendenci k ruptuře a pouze zužují průsvit arterie. Pláty, jejichž čepička je tenká a prostoupená četnými makrofágy, označujeme jako nestabilní. Tyto pláty jsou náchylné k erozi a ruptuře. Dochází zde k odhalení subendotelové tkáně nebo ateromové hmoty. Tyto substance jsou vysoce trombogenní. Výsledkem je pak zachycení a kumulace krevních destiček vedoucí k vytvoření krevní sraženiny. V případě tenkých tepen vede tento proces k ischemii dané oblasti jejímž výsledkem je ischemická nekróza. Ve velkých tepnách tromby průtok krve výrazně neomezují, ale mohou se trhat a embolizovat do periferie (2).

Obrázek 9: Typy aterosklerotických plátů (6.1. 2012),

<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha>



5 ENDOGLIN

Endoglin (CD 105) je homodimerní membránový glykoprotein, který je součástí komplexu receptorů pro transformující růstový faktor β (TGF- β). Dimerní struktura endoglinu je tvořena dvěma podjednotkami o velikosti 95 kDa, které jsou spojeny disulfidickými můstky a dále dělena do tří domén. Extracelulární doména čítá 561 aminokyselin, transmembránová doména je s počtem 25 aminokyselin doménou nejmenší a poslední intracelulární doména je složená ze 47 aminokyselin. Byly také identifikovány dvě isoformy endoglinu, lišící se sekvencí cytosolických domén. Dominantní izoformou je L-izoforma čítající 47 aminokyselin, zatímco minoritní S-izoforma je složena ze 14 aminokyselin. Obě isoformy jsou schopny vázat přirozené ligandy endoglinu. Liší se ve stupni fosforylace a v kapacitní možnosti regulace TGF- β dependentních dějů. Mimo těchto strukturních odlišností se obě isoformy liší ve svých funkcích. To demonstruje příklad, kdy oba endogliny interagují s ALK-1 (activin receptor like kinase-1) a ALK-5 (activin receptor like kinase), ale vykazují rozdílnou afinitu k těmto receptorům. V důsledku tohoto tedy L-endoglin podporuje angiogenezi, zatímco S-endoglin působí opačným efektem. Dalším rozdílem je působení na eNOS (endoteliální NO syntéza). S-endoglin snižuje expresi eNOS, ale L-endoglin naopak expresi eNOS zvyšuje (19, 20).

5.1 Exprese endoglinu

Expresi endoglinu se primárně nachází v buňkách, které nalezneme v cévní stěně. Mezi tyto buňky patří endotelové buňky, buňky monocyto-makrofágové linie, fibroblasty a buňky hladké cévní svaloviny. Kromě toho, exprese endoglinu zahrnuje také placentární syncytiotrofoblasty.

Fakticky se exprese endoglinu nejvíce promítá do vývoje kardiovaskulárního systému, cévního vývoje, angiogeneze a vaskulární homeostázy. Vysoká exprese je patrná v zánětlivé tkáni, v hojící se tkáni v místě cévního zranění a v tumorech (21).

Endoteliální buňky hrají důležitou roli v patogenezi aterosklerózy. Endoteliální dysfunkce charakterizovaná zvýšenou expresí zánětlivých a adhezních faktorů, alterovaná vazokonstrikce a trombogenní aktivita patří mezi zásadní děje aterosogeneze. Při těchto stavech je exprese endoglinu indukovaná hypoxií. Bylo zjištěno, že endoglin je

exprimován v endotelových buňkách aorty a v kapilárách myokardu u normocholesterolemických a hypercholesterolemických myší (22).

Buňky hladké svaloviny cév jsou zodpovědné za růst aterosklerotické léze prostřednictvím zmnožení extracelulárního matrix. Částečně tak dochází ke stabilizaci plátu produkcí kolagenu a formováním fibrózní čepičky. Právě endoglin je důležitý pro vývoj buněk hladké svaloviny cévní stěny. Tento fakt je podpořen studií, kdy geneticky modifikované myši narozené s deficitem endoglinu mají vyšší výskyt mortality spojené s defekty angiogeneze a kardiovaskulárního systému. Tyto defekty jsou spojené s abnormálním vývojem cévních buněk hladké svaloviny. Je to tedy právě endoglin, který je exprimován cévními buňkami hladké svaloviny a hraje důležitou roli v regulaci růstového faktoru TGF- β . Tím dochází k inhibici migrace cévních buněk hladké svaloviny a ovlivnění cévní integrity (22).

Exprese endoglinu byla nalezena i u buněk monocyto-makrofágové linie. Toto je demonstrováno hlavně v případě diferenciovaných monocytů (21).

5.2 Vliv endoglinu na endoteliální NO syntázu

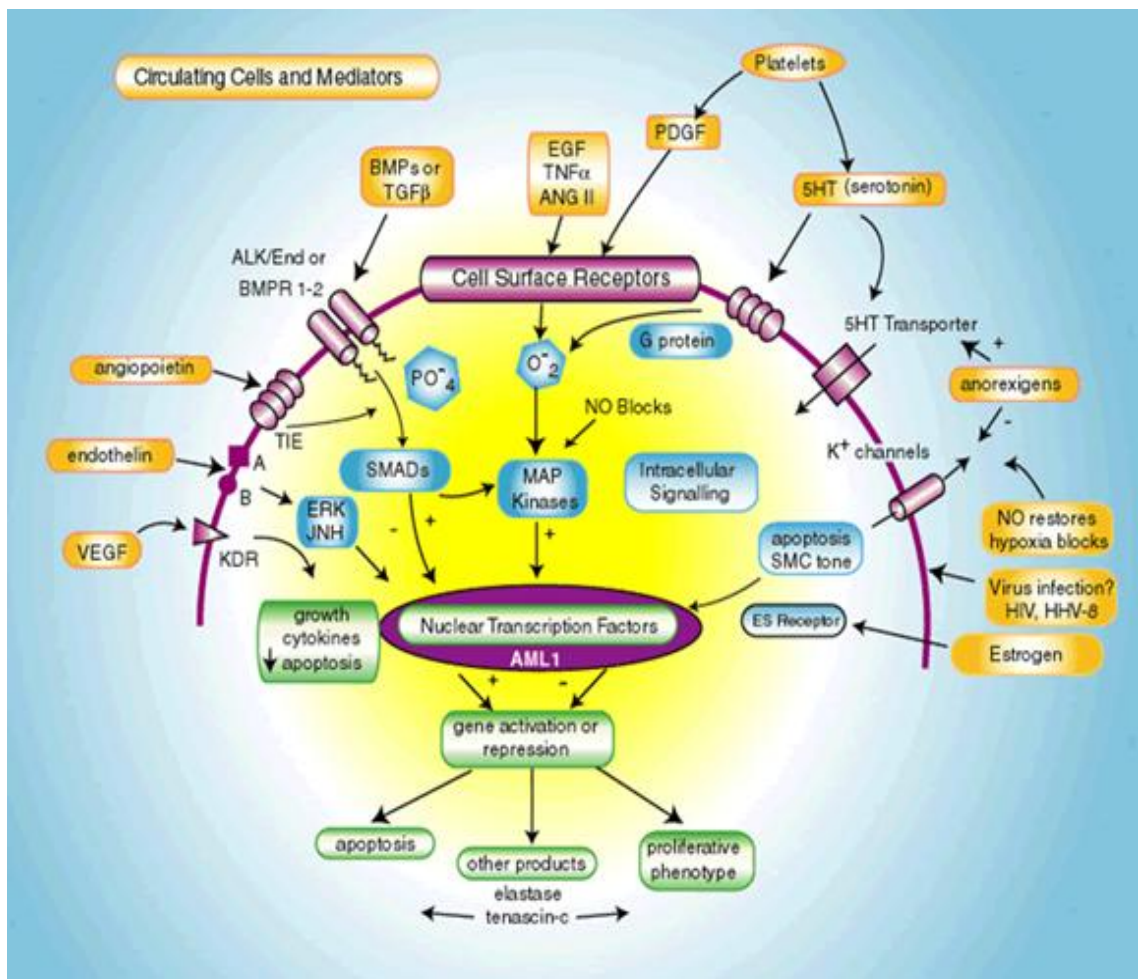
Endoteliální NO syntáza (eNOS) hraje klíčovou roli v produkci NO endoteliálními buňkami. Správná funkce eNOS je velice důležitý pro zachování fyziologických funkcí endotelu. V případě snížení exprese eNOS dochází k rozvoji procesů směřujícím ke vzniku endoteliální dysfunkce a tedy k prvnímu kroku aterosklerózy. Prokazatelně tedy existuje spojení mezi endoglinem a eNOS a to jak v prostředí *in vivo* tak *in vitro* (23).

Na myším modelu bylo prokázáno, že exprese endoglinu je v přímé souvislosti s expresí eNOS. Bylo prokázáno snížené množství eNOS u endoglin haploinsuficientních myší, které vedlo k poškození vazodilatačních funkcí endotelu. Je faktem, že eNOS jako hlavní faktor tvorby NO a hraje důležitou roli v endoglin dependentní angiogenezi. Endoglin působí jako esenciální aktivátor eNOS. Hraje tedy důležitou roli ve fyziologickém fungování endotelových buněk a v regulaci lokálního tonu cévní stěny (23).

Studie *in vitro* ukázala mechanismus, kterým dochází k up-regulaci eNOS a tedy ke zvýšení exprese a účinnosti. Bylo prokázáno, že endoglin zvyšuje hladinu Smad2, zvyšuje stupeň jeho fosforylace a také stabilitu. Výsledkem toho je rostoucí exprese eNOS. Předpokladem je, že stejný vztah jako je mezi endoglinem a eNOS je

aplikovatelný do trojúhelníku endoglin, endotel/endotelové dysfunkce, ateroskleróza (23).

Obrázek 10: Schéma signální dráhy (11.1. 2012),
<http://www.nhlbi.nih.gov/meetings/workshops/pah-wksp.htm>



5.3 Expres endoglinu u modelu myši aterosklerózy

Expres endoglinu u myši je hlavně lokalizována v lumen endoteliálních buněk jak u zdravých tak aterosklerózou postižených cév. Z tohoto důvodu se tedy u myši zaměřujeme hlavně na působení endoglinu na endotelové buňky během aterogeneze.

Expres endoglinu endotelovými buňkami aorty je ovlivněna hladinou cholesterolu v krvi a také tedy stádiem aterosklerózy. Byla zjištěna zvýšená expres endoglinu společně se zvýšeným obsahem cholesterolu v endotelu aorty a to u

C57BL/6J myši s cholesterolovou dietou, u kterých nebyla detekována aterosklerotická léze. Předpokladem tedy je, že exprese endoglinu je na vzestupu na počátku aterosklerotického procesu a to v důsledku reakce endotelu na stres a na zvýšenou hladinu cholesterolu (24, 25).

Expresi endoglinu může být také výrazně ovlivněna léčbou. Nejčastěji používanou medikací z kategorie hypolipidemik jsou statiny. Statiny snižují hladinu cholesterolu u pacientů a stejně tak tomu je i u myších modelů. Molekula atorvastatinu je schopná snižovat hladinu cholesterolu, stabilizovat a zmenšovat aterosklerotický plát, snižovat sérovou hladinu endoglinu a simultánně také snižuje expresi endoglinu. Atorvastatin dále zvyšuje expresi endoglinu, stimuluje eNOS a pozitivně ovlivňuje lipidové spektrum, což pozitivně ovlivňuje velikost aterosklerotického plátu (24, 25).

6 MYŠÍ MODEL Y ATEROSKLERÓZY

Na konci 90. let došlo k prvním krokům směřujícím k umělému navození aterosklerózy u myši. Oblastí zájmu se staly především genové modifikace, které měly zapříčinit rychlejší nástup a rozvoj aterosklerózy.

Myši jsou obecně rezistentní vůči ateroskleróze. Potvrzuje to jejich lipidový profil. U myši nalezneme vysoké hladiny HDL a nízké hladiny LDL a VLDL. Tento fakt v kombinaci s nízkotučnou dietou vede právě k aterogenní rezistenci. Cestou k navození aterosklerózy u myši jsou tedy mutace genů realizované genetickým inženýrstvím (26).

Prvním modelem aterosklerózy se stal myší kmen C57BL/6. Ten je v rezistenci vůči ateroskleróze výjimkou. Vlivem nastavení diety se zvýšeným obsahem lipidů došlo k rozvoji aterosklerotických plátů. Pláty se však tvořili velice malé, neprogredující a pouze v omezeném úseku aorty. Nastavená strava také působila na myši negativně po stránce jejich vitality. To se manifestovalo hlavně chronickými záněty. Přesto posloužil kmen C57BL/6 jako základ pro další výzkum (27).

Právě rozdíl mezi rezistentními kmeny a kmenem C57BL/6 bylo předmětem dalšího výzkumu. Oblastí zájmu se staly především rozdíly v genetické výbavě jednotlivých kmenů. Výzkum se především soustředil na zmapování oblasti chromozomu 1, kde se nachází geny kódující HDL apolipoprotein a apolipoprotein A-II (apoA-II) (28).

Od roku 1992 je v popředí využití takzvaná knockoutová technologie. Tato genová metoda vedla k vygenerování myši s deficitem apolipoproteinu E (ApoE). ApoE je primárně tvořeno v játrech. ApoE deficientní myši mají prodlouženou clearance cholesterolu. Tento fakt znamená, že i při nízko-lipidové dietě se hladina cholesterolu u těchto myši pohybuje v rozmezí 11-16 mmol/l a to při současné akumulaci chylomikronů, VLDL a LDL částic. Tvoří se zde tedy léze typově velice podobné aterosklerotickým plátům u člověka (29).

Léze se zde formují v kořenu aorty, v aortálním oblouku, v mozkových cévách a karotidách a v renální arterii. Rozvoj plátu nastupuje zhruba mezi 5 až 6 týdnem stáří myši. V tomto období dochází k dysfunkci endotelu a k transendoteliální migraci. Zřetelné tukové proužky jsou v cévách patrné kolem 10 týdne. V 15 týdnu se dále přidává proliferace buněk hladké svaloviny. Fibrózní plát se objevuje po 20 týdnu věku a skládá se z nekrotické tkáně, pěnových buněk a makrofágů v různých stádiích transformace a je kryt fibrózní čepičkou tvořenou buňkami hladké svaloviny a kolagenem. S rostoucím věkem myši pak pláty dále progredují a velice často dochází k vytvoření aneurysmat. Trombotické komplikace u myši nebyly zaznamenány. Pokud jsou tyto myši krmeny takzvanou „Western- type diet“, tedy stravou obsahující 0,15% cholesterolu a 21% tuku, tak k progresi aterosklerotické léze dochází ještě rychleji. Je to dáno tím, že hladina cholesterolu u takto krmených ApoE deficientních myši roste zhruba 4 krát – 5 krát rychleji než u stejných myši s běžnou stravou. Western- type diet je de facto modelovým ekvivalentem běžné stravy lidí (30, 31).

Dalším myším modelem aterosklerózy se pak staly myši s deficitem LDL receptoru. LDL receptory prostřednictvím reakce s ApoB na LDL částicích a ApoE na VLDL částicích dochází k odstranění těchto partikulí z krevního oběhu. U LDL receptor deficientních myši je tato fyziologická funkce narušena. Při běžné nízko-lipidové dietě mají tyto myši 2 krát vyšší běžnou hladinu cholesterolu s převládajícím lipidovým profilem ve prospěch LDL a VLDL částic. Pokud však dojde ke změně stravy na stravu lipidovou se zvýšeným obsahem cholesterolu, pak se hladina cholesterolu v krvi dostává za hodnotu 39 mmol/l. Při těchto stavech vznikají masivní aterosklerotické léze (30, 31).

V laboratorní praxi je také využíváno spojení obou výše popsaných modelů. Spojení vlastností ApoE deficientních myši a LDL receptor deficientních myši, vzniká model spontánně vyvíjející se aterosklerózy. Ateroskleróza u těchto myši tedy vzniká nezávisle na podávání aterogenní stravy (32).

Myší modely aterosklerózy jsou velice cenné pro výzkum aterosklerózy *in vivo*. Poskytují jedinečnou příležitost studie aterogeneze a všech jejích stadií, v návaznosti na možnosti monitorování ovlivnění jednotlivých fází vývoje a progresu aterosklerózy prostřednictvím modifikace faktorů a medikace (33).

7 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo popsat změny exprese endoglinu u normocholesterolemických a hypercholesterolemických myší. Sledovali jsme změny exprese v aortě myší za pomoci imunohistochemických metod. Kvantifikace změn exprese byla poté provedena pomocí Western blot analýzy.

8 EXPERIMENTÁPNÍ ČÁST

8.1 Zvířata

Pro pokus bylo použito 8 samic normocholesterolemických myší kmene C57BL/6J a 8 samic ApoE receptor deficientních myší kmene C57BL/6J. Myši z ApoE-deficientní skupiny byly krmeny 8 týdnů standardní dietou s obsahem 1% cholesterolu.

Všechna zvířata měla neomezený přístup k vodě. Během pokusu nebyly zaznamenány žádné rozdíly ve spotřebě potravy mezi jednotlivými zvířaty.

Na konci pokusu byla zvířata přes noc vyhladověna a usmrčena éterem. Byly vyjmuty tkáňové vzorky obsahující aortu společně s horní částí srdce k následné analýze. Vzorky byly umístěny do vhodného media (Leica, Praha, Česká republika) a poté zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny při teplotě -80 stupňů Celsia. Dále byly odebrány vzorky krve pro biochemické vyšetření.

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). Tato analýza byla provedena na Gerontometabolické klinice FNHK (Mgr. Slanařová).

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.

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

8.4 Protilátky

Pro detekci endoglinu byla použita primární monoklonální protilátka rat anti-mouse endoglin (BD Pharmingen) ve zředění 1:50. Jako sekundární protilátka byla použita monoklonální protilátka goat anti-rat Ig (Vector laboratoires, USA) ve zředění 1:400.

8.5 Postup

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

Poté byly řezy opět krátce osušeny (15 minut), následně vloženy do roztoku PBS (phosphate buffer saline) (2x5 minut) a připraveny pro analýzu.

Nejprve byl nanesen 10 % roztok goat séra v PBS (30 minut) za účelem blokace nescifických vazebných míst. Následně se řezy inkubovaly s roztoky anti-avidinu a anti-biotinu (Vector Laboratoires, USA).

Poté byla provedena inkubace (1 hodina) s primární protilátkou při pokojové teplotě. Následoval oplach v roztoku PBS (2x5 minut) a patnáctiminutová inkubace v 3% roztoku H₂O₂. Po dalším oplachu PBS (2x5 minut) byla nanesen sekundární protilátka (30 minut). Poté se řezy opět vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dalším krokem bylo nanesení enzymu peroxidázy konjugovaného s avidin-biotin komplexem. Následovalo přidání detekčního činidla DAB (Dako, Dánsko).

V další fázi experimentu byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xylenu (10:1, 3 minuty), aceton-xylenu (1:10, 3 minuty) a v xylenu (3x2 minuty). Závěrem byly řezy ukotveny pomocí Eukittu.

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

8.6 Western blot analýza

Výsledky western blot analýzy byly laskavě poskytnuty Mgr. Zbyňkem Stráským.

8.7 Statistická analýza

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm 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).

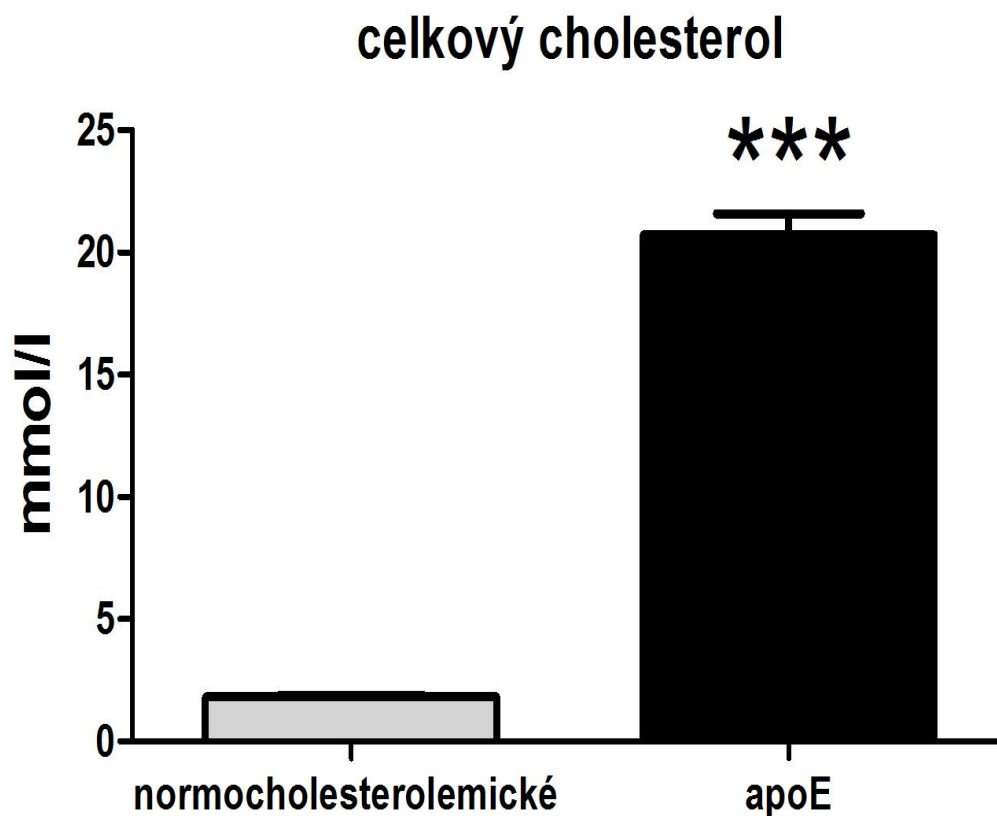
9 VÝSLEDKY

9.1 Biochemická analýza

Na základě výsledků biochemické analýzy byla stanovena hladina celkového cholesterolu u myší zapojených od experimentu. Z výsledků je patrné, že hladina celkového cholesterolu je po podávání dané diety rapidně zvýšena ve skupině ApoE-deficientních myší v porovnání se skupinou normocholesterolemických myší.

Graf 1: Hladina celkového cholesterolu

*Po osmitýdenním podávání standardní diety s obsahem 1% cholesterolu, byla celková hladina cholesterolu rapidně zvýšena ve skupině ApoE-deficientních jedinců v porovnání se skupinou normocholesterolemických jedinců. (***) $P < 0,001$*



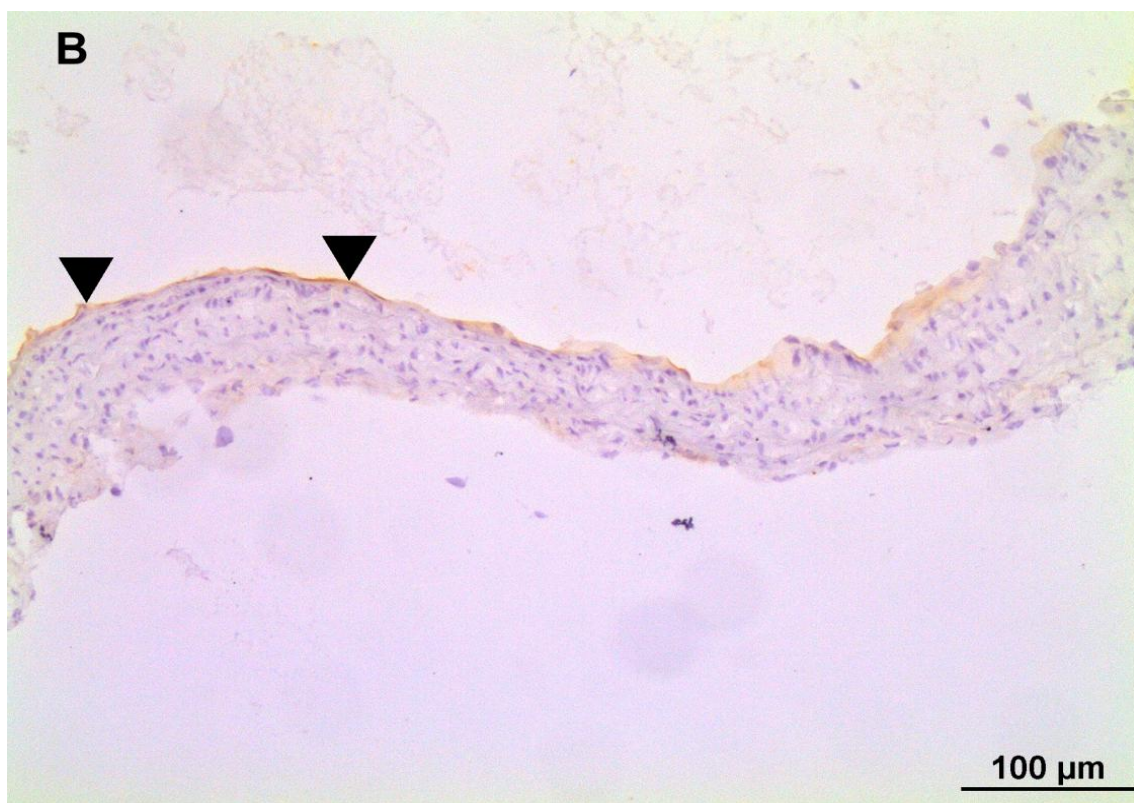
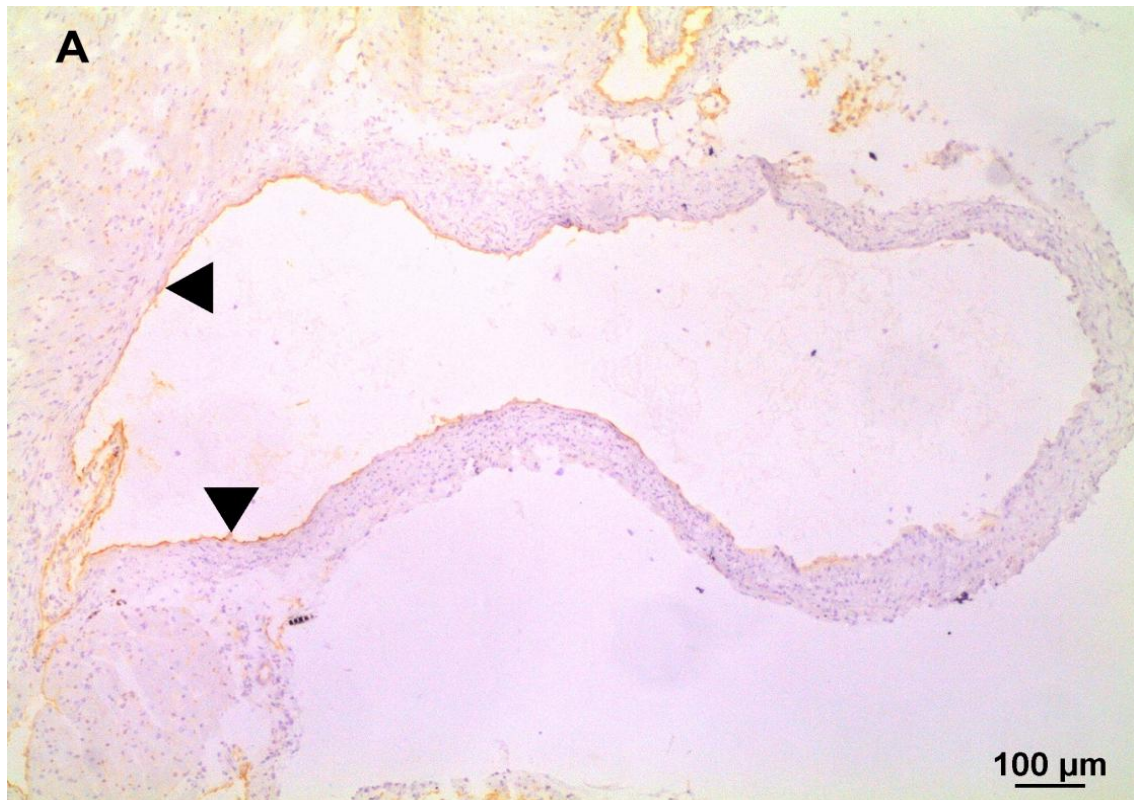
9.2 Imunohistochemie

Expres endoglinu byla sledována v aortě normocholesterolemických myších a v aortě hypercholesterolemických ApoE-deficientních myší obsahujících aterosklerotické pláty.

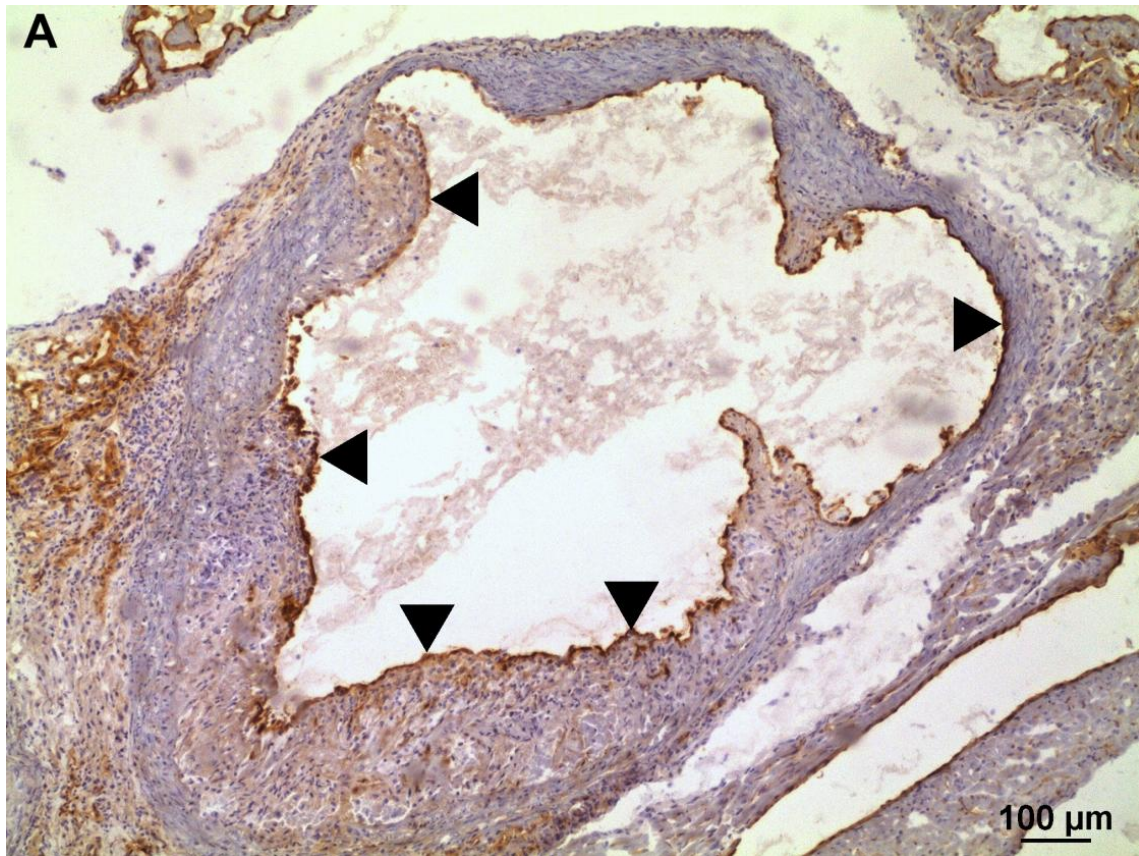
Expres endoglinu byla viditelná pouze na cévním endotelu u normocholesterolemických myší (Obr 11).

U ApoE-deficientních myší byla expres endoglinu detekována na cévním endotelu aterosklerotické léze, endotelu aortálních chlopní a dále v oblastech mimo léze a v kapilárách myokardu (Obr 12, 13). Expres endoglinu byla významně výraznější u ApoE-deficientních myší ve srovnání s normocholesterolemickými myšmi.

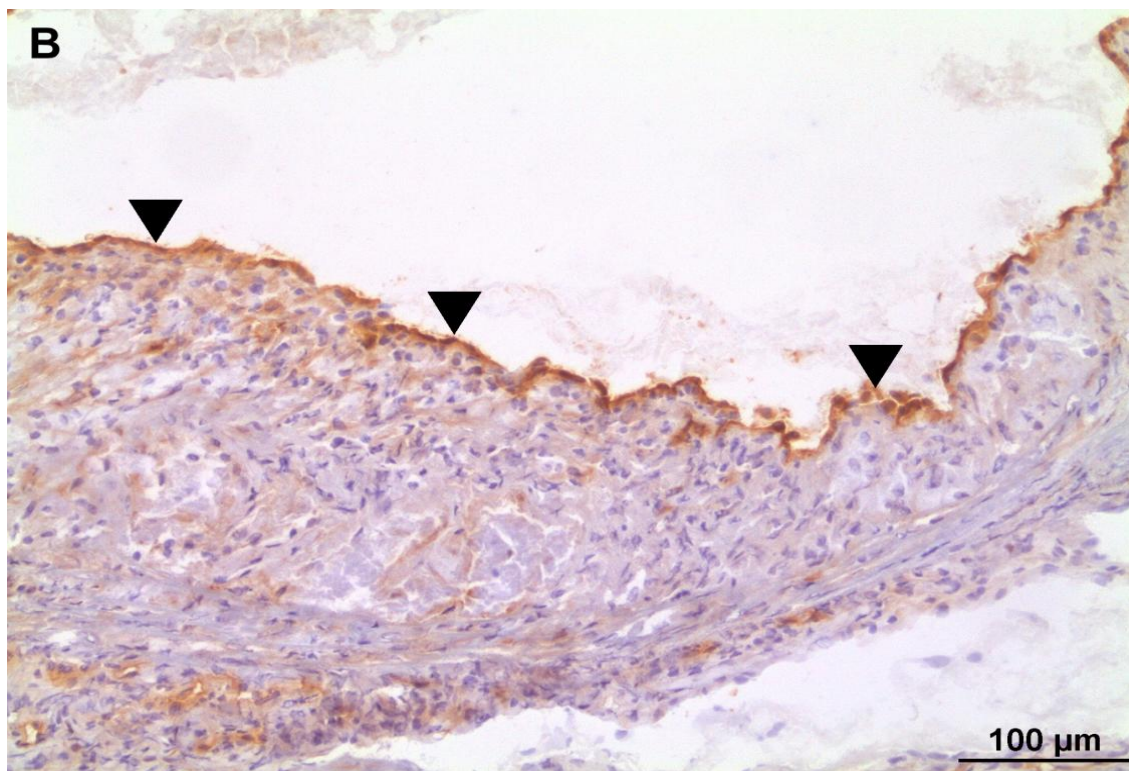
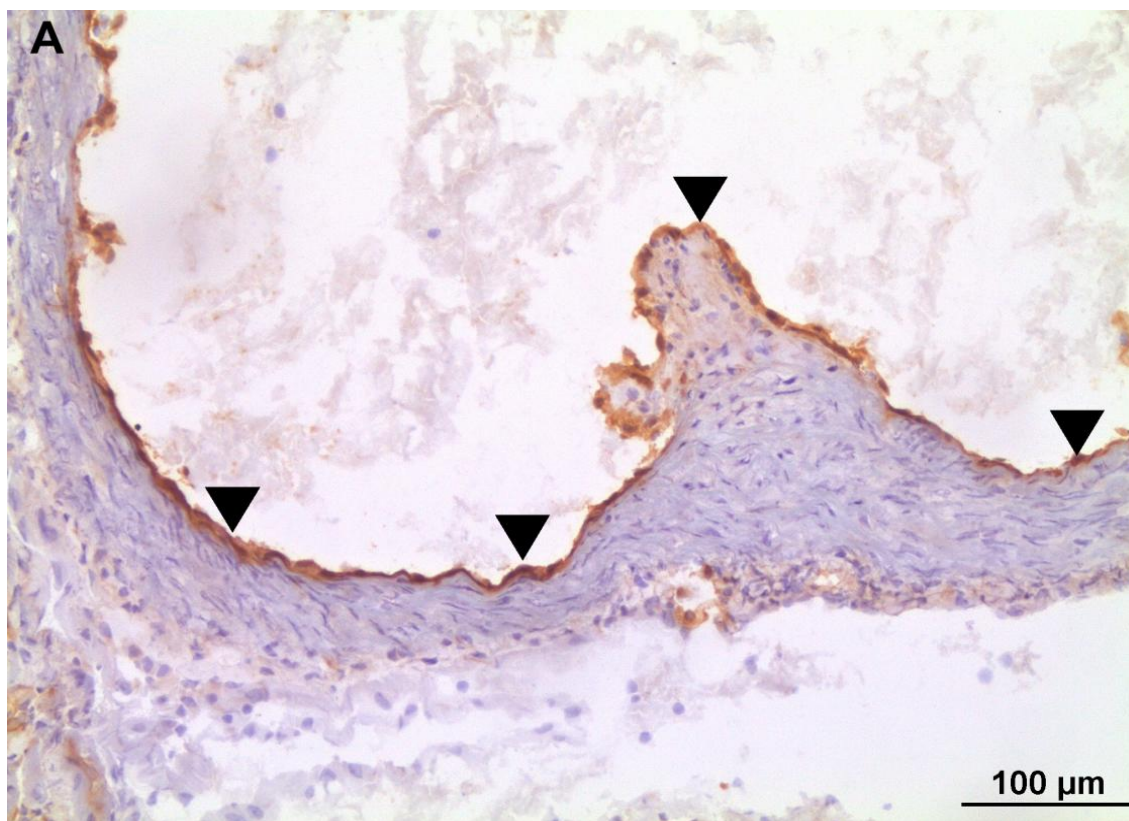
Obrázek 11: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení endoglinu normocholesterolemické myši. Exprese je pozorována pouze na cévním endotelu aorty (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 4x (A) a 10x (B).



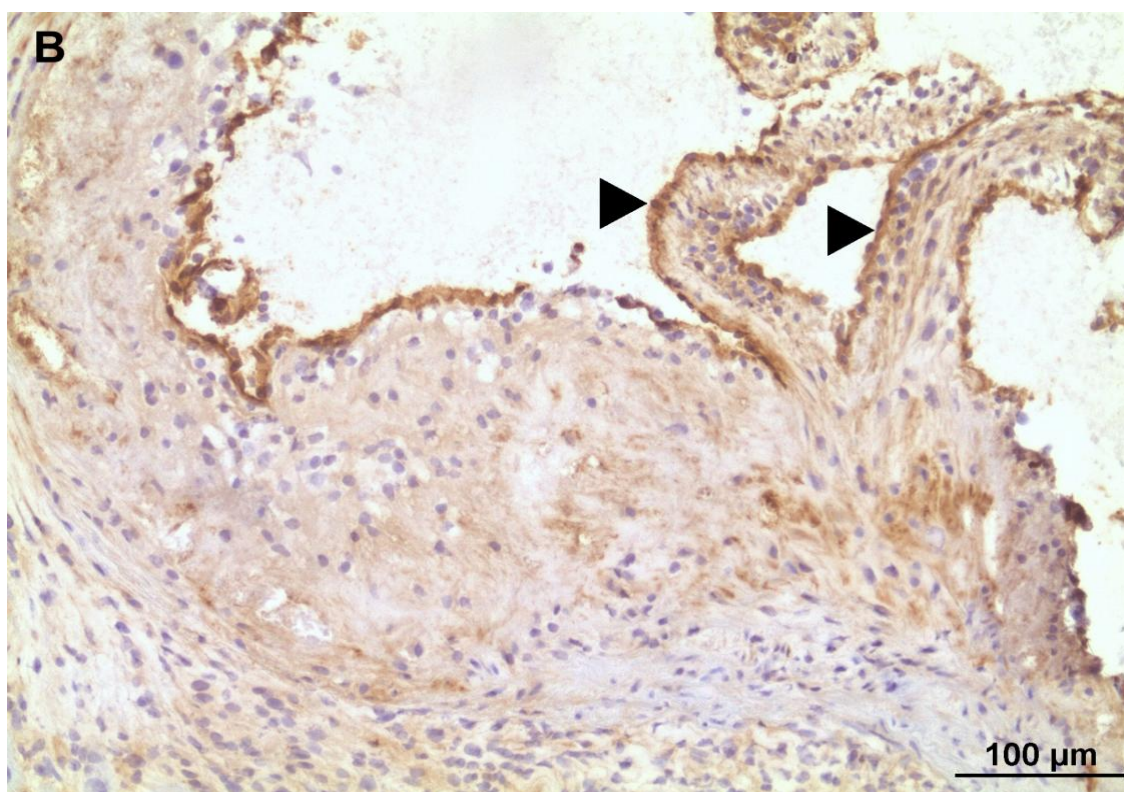
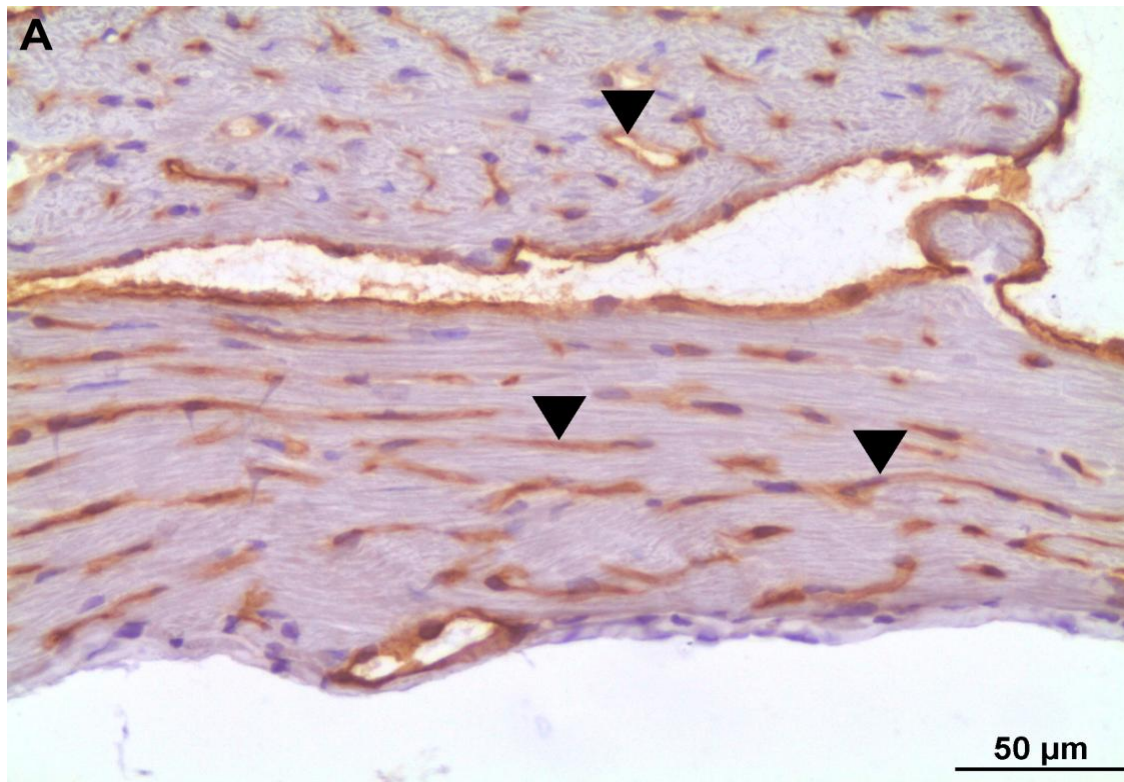
Obrázek 12: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení endoglinu u ApoE-deficientních myši. U těchto myši byly nalezeny aterosklerotické pláty. Exprese byla pozorována na endotelu těchto plátů (šipky) a také na intaktním endotelu bez plátů (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 4x.



Obrázek 13: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení endoglinu u ApoE-deficientních myší. Exprese byla pozorována na endotelu těchto plátů (B) (šipky) a také na intaktním endotelu bez plátů (A) (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 10x.



Obrázek 14: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení endoglinu u ApoE-deficientních myší. Exprese endoglinu byla detekována na malých arteriolách a kapilárách myokardu (A) (šipky). Dále byla exprese endoglinu viditelná na aortálních chlopních (B) (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 20x (A) a 10x (B).



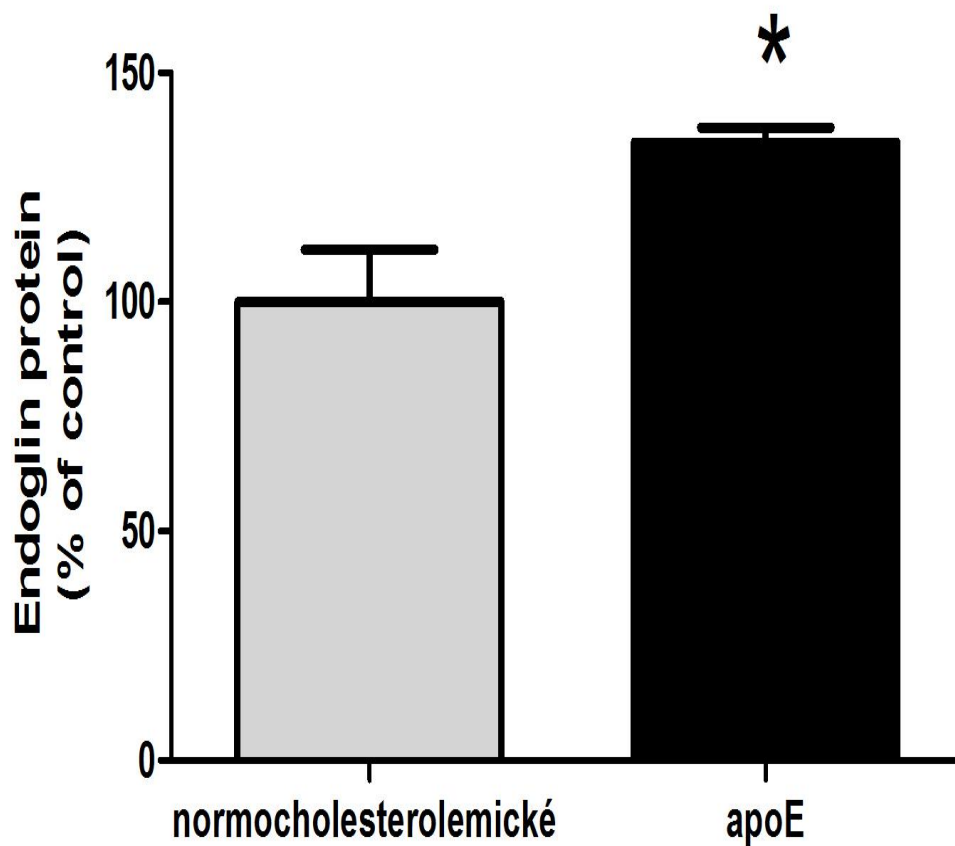
9.3 Western blot analýza

Western blot analýzou byla detekována exprese endoglinu v obou skupinách myší. Exprese endoglinu u hypercholesterolemických ApoE-deficientních myší byla signifikantně zvýšena ve srovnání s normocholesterolemickými jedinci. Výsledky byly laskavě poskytnuty Mgr. Zbyňkem Stráským.

Graf 2: Porovnání exprese endoglinu

Po ukončení experimentu byla u skupiny Apo-E deficientních jedinců exprese endoglinu signifikantně zvýšena v porovnání se skupinou normocholesterolemických jedinců.

(* $P \geq 0,5$)



10 DISKUSE

V roce 1983 byl skupinou vědců objeven cytokin se schopností transformovat fibroblasty. Studie krevních destiček pak potvrdily původ růstových faktorů na fibroblastech králíka. TGF- β (transforming growth factor beta) byl prvně izolován z neoplastické tkáně myši, vzniklé pod vlivem Moloney sarcoma viru. V současné době jsou v lidském těle popsány tři izoformy TGF- β a to TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3 (34).

TGF- β 1 byl z této rodiny růstových faktorů objeven jak první a v současné době patří mezi nejlépe prostudované faktory. TGF- β 1 je v největší míře exprimován ve zdravé cévní stěně, kde izoformy TGF- β 2 a TGF- β 3 úplně chybějí anebo se vyskytují pouze ve velmi nízkých hladinách. Kromě toho je TGF- β 1 účinným regulátorem vaskulárního vývoje a remodelace cévní stěny. Hraje tedy klíčovou roli v patogenezi aterosklerózy, ovlivňuje vznik stenózy a podílí se na regulaci endoteliálních buněk, buněk hladké svaloviny cévní stěny, makrofágů a T-lymfocytů. Patrně také ovlivňuje odpověď cévních buněk na probíhající kalcifikaci (35, 36).

Endoglin (CD 105) je homodimerní transmembránový glykoprotein. Významně interaguje s TGF- β 1 a TGF- β 3, ale to pouze za předpokladu asociace s T β R II. Celkově je endoglin nejvíce exprimován cévními endoteliálními buňkami, buňkami hladké svaloviny cévní stěny, makrofágy a T-lymfocyty (34, 36, 37, 38).

Expresí endoglinu byla také detekována v normálních a aterosklerotických cévách u lidí, prasat a myši (39, 40).

V této diplomové práci jsme chtěli porovnat změny exprese endoglinu u normocholesterolemických myši a hypercholesterolemických myši s aterosklerotickými pláty s cílem pospat jeho expresi a zjistit případnou změnu exprese (41).

U myši je endoglin exprimován pouze na cévním endotelu v plátech, mimo pláty, v srdečních chlopních a kapilárách myokardu, což jsme potvrdili i v této diplomové práci (42). Po vyhodnocení 60 řezů jsme zjistili, že exprese endoglinu je velmi silná na cévním endotelu plátu i mimo něj ve srovnání s normocholesterolemickými myšmi. Tyto nálezy byly dále ještě potvrzeny Western blot analýzou. Tyto výsledky, kdy exprese endoglinu je zvýšena u aterosklerotických cév ve srovnání se zdravými cévami, jsou v souladu s předchozí prací, kde ovšem exprese endoglinu byla detekována pouze v hladkých svalových buňkách, kde se pravděpodobně endoglin podílel na reparaci cévy po katetrizaci (43, 44). Některé předchozí studie naznačily, že endoglin by mohl hrát protektivní roli v aterogenezi,

protože zvyšuje expresi eNOS, má antiapoptotické účinky na cévní endotel a stabilizuje aterosklerotické pláty. Otázka zní, proč se jeho exprese zvyšuje při hypercholesterolemii. V této fázi můžeme pouze spekulovat, že by mohlo jít o obrannou reakci cévního endotelu na hypercholesterolemii, což by mohlo do jisté míry představovat potenciální protektivní mechanismus endoglinu v iniciaci aterogeneze. Tato hypotéza však ještě bude prokazována v dalších studiích (45).

11 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zaměřila na sledování exprese endoglinu u normocholesterolemických a hypercholesterolemických ApoE-deficientních myší.

Imunohistochemická detekce prokázala expresi endoglinu u obou skupin myší pouze na cévním endotelu.

U hypercholesterolemických myší byla exprese detekována na endotelu plátů, mimo pláty, na chlopních a v kapilárách myokardu.

Exprese endoglinu byla výrazně silnější u hypercholesterolemických myší ve srovnání s normocholesterolemickými myšmi.

Tento nález imunohistochemické analýzy byl také potvrzen Western blot analýzou, kde exprese endoglinu byla signifikantně vyšší u ApoE-deficientních myší.

Vyšší exprese endoglinu u hypercholesterolemických myší může ukazovat na potenciální obrannou reakci cévního endotelu na hypercholesterolemii, což by mohl do jisté míry představovat protektivní mechanismus endoglinu v iniciaci aterosklerózy. Tato hypotéza však ještě bude prokazována v dalších studiích.

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Sarah Jane George, Jason Johnson, *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*, WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. 2010 [s. 3-46], ISBN: 978-3-527-32448-4.
2. Jiří Vlček, Daniela Fialová a kol., *Klinická farmacie I*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2010, [s. 73-114], ISBN: 978-80-247-3169-8.
3. Douglas F. Paulsen, *Histologie a buněčná biologie*, 1. vydání, Nakladatelství H&H Vyšehradská s.r.o., 2004, [s. 158-162], ISBN: 801-73-024-4278-9.
4. <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/obeh-ho.pdf> (4.1. 2012)
5. Bell D.M., Johns T.E., Lopez L.M., *Endothelial dysfunction: implications for therapy of cardiovascular diseases*. *Ann Pharmacother* 1998, [s.459-470]
6. Blann A.D., Taberner D.A., *Reliable Marker of Endothelial Cell Dysfunction: Does It Exist?*. *British Journal of Haematology* 1995, [s. 244-248], ISBN: 674-7-648-66525-7.
7. De Caterina R., *Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease*. *Current Opinions in Lipidology* 2000, [s. 9-23], ISBN: 765-8-789-87943-8.
8. Vojáček J. Malý M. a kol., *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, 1. vydání, Grada Publishing a.s. 2004, [s. 33-43], ISBN: 80-247-0501-X.
9. Marečková Z., Heller S., Horký K., *Endoteliální dysfunkce u arteriální hypertenze*. *Vnitřní lékařství*, Grada Publishing a.s. 1999, [s. 232-237], ISBN: 978-80-247-2319-8.
10. R. Rubin, D. S. Strayer et al., *Rubin's Pathology*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, [s. 73-114], ISBN: 978-07817-9516-6.
11. Harrison's et al., *Principles of internal medicine – 4th. ed. Volume 1*. International edition. 1998, [s. 1345-1350], ISBN 0-07-115268-7.
12. Martínková J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 1. vydání, Grada Publishing a.s. 2007, [s. 213-215], ISBN: 978-80-247-1356-4.
13. J. Mačák, J. Mačáková, *Patologie*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 171, 172], ISBN: 80-247-0785-3.
14. A. Žák a kolektiv, *Ateroskleróza- Nové pohledy*, 1. vydání, Grada Publishing a.s. 2011, [s. 19-26], ISBN: 978-80-247-3052-3.

15. S. Silbernagl, F. Lang a kolektiv, *Atlas patofyziologie člověka*, 1. vydání, Grada Publishing a.s. 2001, [s. 236-239], ISBN: 80-7169-968-3.
16. J. Vojáček, M. Malý a kolektiv, *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, 1. vydání, Grada Publishing a.s. 2004, ISBN-10: 80-247-0501-X.
17. R. Fuster V. *The pathogenesis of atherosclerosis*, In eds Fuster V. Ross R. and Topol EJ. *Atherosclerosis and coronary heart disease*, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1996, [s. 441-460].
18. A. Šafránková, M. Nejedlá, *Interní ošetrovatelství I*, 1. vydání, Grada Publishing a.s. 2004, ISBN-10: 80-247-1148-6.
19. García-Pozo L, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, García-Monzón C. *Endoglin: structure, biological functions and role in fibrogenesis.*, *Rev Esp Enferm Dig* 2008, [s. 355-360], PMID: 18752365, [PubMed - indexed for MEDLINE].
20. Barbara A. Conley, Joshua D. Smith, Mercedes Guerrero-Esteo Carmelo Berabeu, Calvin P. H. Vary. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153, 2000, [s. 323-335], PMID: 11164421, [PubMed - indexed for MEDLINE].
21. García-Pozo L, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, García-Monzón C. *Endoglin: structure, biological functions and role in fibrogenesis*, *Rev Esp Enferm Dig* 2008; [s. 355-360], PMID: 18752365, [PubMed - indexed for MEDLINE].
22. Miguel-Romero L, Donderis J, Aristorena M, Blanco FJ, Round A, Rubio V, Bernabeu C, Marina A. *Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding*. PLoS One. 2012;7(2):e29948. Epub 2012 Feb 8.
23. Nachtigal P., Večeřová L., Rathouská J., Stráský Z., *The role of endoglin in atherosclerosis*, *Atherosclerosis* 2012 (2012), PMID: 22460049, [PubMed - as supplied by publisher].
24. Stráský Z., Večeřová L., Rathouská J., Slanařová M., Brčáková E., Kudláčková Z., Andrys C, Micuda S, Nachtigal P., *Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice*. *Circ J*. 2011;75(7):1747-55. Epub 2011 May 17. PMID: 21576826, [PubMed - indexed for MEDLINE].

25. Rathouská J., Večeřová L., Stráský Z., Slanařová M., Brčáková E., Mullerová Z., Andrys C, Micuda S, Nachtigal P., *Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis*. Pharmacol Res. 2011 Jul;64(1):53-9. Epub 2011 Apr 2., PMID: 21440631, [PubMed - indexed for MEDLINE].
26. Paigen B., Morrow A., Brandon C., Mitchell D., Holmes P., *Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice*, *Atherosclerosis*, [s. 57- 65] (1985), PMID: 3841001, [PubMed - indexed for MEDLINE].
27. Liao F., Andalibi A., deBorja F. C., Fogelman A. M., Lusis A. J., *Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice*, *J. Clin. Invest* 91, 2572 (1993), PMID: 8514869, [PubMed - indexed for MEDLINE].
28. Paigen B. et al., *Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3763 (1987), PMID: 3473481, [PubMed - indexed for MEDLINE].
29. Ishibashi S., Goldstein J. L., Brown M. S., Herz J., Burns D. K., *Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice*, *J Clin Invest.* 93, 1885 (1994), PMID: 8182121, [PubMed - indexed for MEDLINE].
30. Jawień J. Nastalek P. Korbut R., *Mouse models of experimental atherosclerosis*, *Journal of physiology and pharmacology* 2004, 55, 3, [s. 503-517], (2004), PMID: 15381823, [PubMed - indexed for MEDLINE].
31. Rubin E. M., Krauss R. M., Spangler E. A., Verstuyft J. G., Clift S. M., *Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI*, *Nature* 353, 265 (1991), PMID: 1910153, [PubMed - indexed for MEDLINE].
32. Schultz J. R., Verstuyft J. G., Gong E. L., Nichols A. V., Rubin E. M., *Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice*, *ibid.* 365, 762 (1993), PMID: 8413656, [PubMed - indexed for MEDLINE].
33. Linton M. F., Atkinson J. B., Fazio S., *Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation*, *Science* 267, 1034 (1995), PMID: 7863332, [PubMed - indexed for MEDLINE].

34. Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M., Sporn M. B., *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization*, *Biol Chem* 258, [s. 7155-7160] (1983), PMID: 6602130, [PubMed - indexed for MEDLINE].
35. Bobik A., *Transforming growth factor-betas and vascular disorders* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, [s. 1712-1720] (2006), PMID: 16675726, [PubMed - indexed for MEDLINE].
36. Lastres P., Bellon T., Cabanas C., Sanchez-Madrid F., Acevedo A., Gougos A., Letarte M. and Bernabeu C., *Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen.*, *Eur J Immunol* 22, [s. 393-397] (1992), PMID:1537377, [PubMed - indexed for MEDLINE].
37. Lastres P., Letamendia A., Zhang H., Rius C., Almendro N., Raab U., Lopez L. A., Langa C., Fabra A., Letarte M. and Bernabeu C., *Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1*, *Cell Biol* 133, [s. 1109-1121] (1996), PMID: 8655583, [PubMed - indexed for MEDLINE].
38. Li C., Hampson I. N., Hampson L., Kumar P., Bernabeu C., Kumar S., *CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells*, *Faseb Journal* 14, [s. 55-64] (2004), PMID: 10627280, [PubMed - indexed for MEDLINE].
39. Adam P. J., Clesham G. J., Weissberg P. L., *Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells*, *Biochem Biophys Res Commun* 247, [s. 33-37] (1998), PMID: 9636649, [PubMed - indexed for MEDLINE].
40. Nachtigal P., Večeřová L., Rathouská J., Stráský Z., *Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice*, *Atherosclerosis* (2012), PMID: 21576826, [PubMed - indexed for MEDLINE].
41. Nachtigal P., Večeřová L., Pospíšilová N., Micuda S., Brčáková E., Navarro Hernandez E., Pospěchová K., Semecký V., *Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study*, *Histol Histopathol* 24, [s. 1499-1506] (2009), PMID:19795348, [PubMed - indexed for MEDLINE].
42. Nachtigal P., Pospíšilová N., Večeřová L., Micuda S., Brčáková E., Pospěchová K., Semecký V., *Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice.*,

- Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 16, [s. 265-274] (2009). PMID:12144421, [PubMed - indexed for MEDLINE].
43. Conley B. A., Smith J. D., Guerrero-Esteo M., Bernabeu C., Vary C. P., *Atherosclerosis* 153, *Endoglin and TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques*, [s. 323-335] (2000), PMID:11164421, [PubMed - indexed for MEDLINE].
44. Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M., Sporn M. B., *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. J Biol Chem* 258, [s. 7155-7160] (1983), PMID: 6602130, [PubMed - indexed for MEDLINE].
45. Lebrin F., Deckers M., Bertolino P., Ten Dijke P., *TGF-beta receptor function in the endothelium, Cardiovasc Res* 65, [s. 599-608] (2005), PMID: 15664386, [PubMed - indexed for MEDLINE].