

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

Exprese P-selektinu v arteria brachiocephalica během aterogeneze

P-selectin expression in brachiocephalic artery during atherogenesis

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2014

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Magda Kadlecová

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

Datum:

Podpis:

„Tímto bych velice ráda poděkovala doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a za příjemnou spolupráci při sestavování této diplomové práce. Děkuji také mým nejbližším za neustálou podporu a povzbuzení během celého mého studia.“

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Expres P-selektinu v arteria brachiocephalica během aterogeneze

Diplomová práce

Magda Kadlecová

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Cíl práce: Sledovali jsme expresi P-selektinu v arteria brachiocephalica u apoE/LDL-receptor deficientních myší, které byly krmeny dietou s vysokým obsahem proteinů a nízkým obsahem cukrů.

Metody: Pro tuto práci byly použity apoE/ LDLR^{-/-} myší samice rozdělené do dvou skupin po 6 zvířatech. Jedna skupina (kontrolní) byla krmena standardní stravou (AIN-93G), druhá skupina byla následujících 8 týdnů krmena stravou s nízkým obsahem cukrů a vysokým obsahem proteinů (LCHP - low-carbohydrate, high-protein). Imunohistochemická detekce P-selektinu byla realizována pomocí Avidin-biotin metody (ABC) s detekčním činidlem diaminobenzidinem (DAB).

Výsledky: U myší krmených LCHP dietou prokázala biochemická analýza významné zvýšení hladin cholesterolu oproti myším krmeným kontrolní dietou. Imunohistochemické barvení odhalilo, že P-selektin se exprimuje u všech pozorovaných myší jen na cévním endotelu, intenzivnější zbarvení pak bylo na endotelu aterosklerotických plátů. Aterosklerotické pláty byly téměř u všech myší v LCHP skupině oproti kontrolní skupině, tam u některých myší pláty chyběly. Plocha a intenzita barvení P-selektinu však byla stejná u kontrolní i LCHP diety.

Závěr: Myši krmené LCHP dietou měly vyšší hladiny cholesterolu v krvi, ale námi použitá imunohistochemická metoda neodhalila významný rozdíl v expresi P-selektinu mezi oběma skupinami myší.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

P-selectin expression in brachiocephalic artery during atherogenesis

Diploma thesis

Magda Kadlecová

Supervisor: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Background: We studied the expression of P-selectin in brachiocephalic artery in the apoE^{-/-}/LDLr^{-/-} deficient mice, which were fed with the low carbohydrate, high protein diet.

Methods: For this study we used the female apoE^{-/-}/LDLr^{-/-} deficient mice, which were divided into two groups, 6 mice in each group. Control mice were fed with AIN-93G diet (control group) and the second group was fed by low carbohydrate, high protein diet for 8 weeks. Immunohistochemical analysis was performed in tissue sections of brachiocephalic artery by avidin-biotin complex method with DAB detection.

Results: Biochemical analysis revealed significantly increased levels of total cholesterol after feeding with low carbohydrate, high protein diet. Immunohistochemical analysis detected P-selectin expression only in endothelial cells, with more intensity in endothelial cells covering atherosclerotic plaques in both groups apoE^{-/-}/LDLr^{-/-} deficient mice. Atherosclerotic plaques were found in all mice in LCHP group. In control group, there were few mice without plaques. However, the staining intensity and pattern of P-selectin was very similar between both groups.

Conclusions: In blood of mice, which were fed with low carbohydrate, high protein diet, we found increased plasma levels of cholesterol, but immunohistochemical analysis by avidin-biotin complex method did not reveal significant differences in P-selectin expression between both groups.

OBSAH

| | |
|---|----|
| OBSAH..... | 6 |
| 1 ÚVOD..... | 8 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1 Krevní oběh..... | 9 |
| 2.1.1 Stavba krevních cév | 9 |
| 2.1.2 Typy cév | 9 |
| 2.2 Endotel | 12 |
| 2.2.1 Specifické funkce endotelu | 12 |
| 2.2.2 Dysfunkce endotelu | 13 |
| 2.3 Ateroskleróza | 15 |
| 2.3.1 Epidemiologie | 15 |
| 2.3.2 Metabolismus lipidů | 15 |
| 2.3.3 Rizikové faktory | 16 |
| 2.3.4 Vznik aterosklerotického plátu | 19 |
| 2.3.5 Stabilita plátu | 20 |
| 2.4 Adhezní molekuly | 22 |
| 2.4.1 Selektiny | 23 |
| 2.4.2 P-selektin | 24 |
| 2.4.3 P-selektin a ateroskleróza | 24 |
| 2.5 Myší modely aterosklerózy..... | 25 |
| 2.5.1 Inbrední kmeny | 26 |
| 2.5.2 „Genově cílené“ modely | 26 |
| 2.5.2 Myší modely spontánní ruptury plátu | 27 |
| 2.6 Imunohistochemie..... | 27 |
| 2.6.1 Imunohistochemické metody | 28 |

| | |
|--|----|
| 2.6.2 Provedení metody | 28 |
| 3 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE..... | 30 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 31 |
| 4.1 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu | 31 |
| 4.1.1 Zvířata, experimentální dieta | 31 |
| 4.2 Imunohistochemie..... | 32 |
| 4.2.1 Použité protilátky | 32 |
| 4.2.2 Příprava roztoků a činidel | 32 |
| 4.2.3 Postup..... | 33 |
| 4.4 Statistická analýza..... | 34 |
| 5 VÝSLEDKY | 35 |
| 5.1 Biochemická analýza | 35 |
| 5.2 Imunohistochemická analýza..... | 36 |
| 5.2.1 Imunohistochemické barvení P-selektinu v arteria brachiocephalica..... | 36 |
| 6 DISKUSE..... | 41 |
| 7 ZÁVĚR | 43 |
| 8 SEZNAM ZKRATEK | 44 |
| 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 45 |

1 ÚVOD

V současnosti jsou kardiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou úmrtí v Evropě. Jejich podkladem je většinou ateroskleróza, což je chronické multifaktoriální zánětlivé onemocnění cévní stěny. Její vývoj je spojen s životním stylem a mnoha rizikovými faktory. Rozvoj aterosklerózy je zdrojem mnoha výzkumů, snažíme se zjistit, jak ateroskleróza přesně vzniká a co ji způsobuje. Díky výsledkům těchto výzkumů jí pak můžeme předcházet a efektivněji ji léčit.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na vliv stravy s nízkým obsahem cukrů a vysokým obsahem proteinů (která byla původně určena pro hubnutí) na rozvoj aterosklerózy u apoE/LDL-receptor deficientních myší.

Dále jsme se zabývali expresí adhezní molekuly P-selektinu na tomto modelu myší se vznikající aterosklerózou. P-selektin je molekula, která se účastní raných fází vzniku aterosklerózy, proto jsme očekávali jeho zvýšenou expresi při podávání této vysoko proteinové, potenciálně aterogenní, stravy. P-selektin jsme sledovali v arteria brachiocephalica, protože právě v této cévě se vyvíjejí u myší komplexní aterosklerotické pláty.

K detekci P-selektinu jsme použili imunohistochemickou metodu, která nám umožnila pomocí navázání protilátek a následného barvení vizualizovat P-selektin ve tkáni.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Krevní oběh

Kardiovaskulární systém je tvořen srdcem a krevními cévami. Společně zajišťují oběh krve a tím i transport látek, tepla a krevních buněk po těle. Ze srdeční komory vychází jedna tepna (aorta nebo plicní kmen). Ta se dále dělí na další cévy, které se postupně zužují až na arterioly. Arterioly se větví do krevních cév s nejmenším průměrem – kapilár, které se pak opět spojují ve venuly, z nich se tvoří větší žíly, až vzniká horní a dolní dutá žíla a plicní žíly. Ty ústí do srdečních síní. (1, 2)

2.1.1 Stavba krevních cév

Stěna krevních cév je obvykle složena ze třech koncentricky uspořádaných základních vrstev tak, jak ukazuje obrázek č. 1. Nejbližší lumen cévy leží tunica intima, prostřední vrstva se nazývá tunica media a vnější vrstva je tunica adventitia (také externa). (3) Tyto tři vrstvy mohou být odděleny elastickými blankami, známými jako membrana elastica interna (leží mezi tunica intima a tunica media) a membrana elastica externa (odděluje tunica media a tunica adventitia). (3, 1)

Dále jsou součástí cévní stěny: endotel – odděluje intra- a extravaskulární prostor, tvoří ho jedna vrstva plochých polygonálních buněk umístěných na bazální lamině paralelně s prouděním krve, mezi endoteliálními buňkami jsou zonulae adhaerentes, tight junctions a gap junctions; hladká svalovina – reguluje napětí a průsvit stěny cévy a tvorbu mezibuněčné hmoty; mezibuněčná hmota – složena z kolagenu, proteoglykanů a elastických vláken, která určují pružnost cévní stěny (1)

2.1.2 Typy cév

Tepny

tepny svalového typu

Do této skupiny lze zařadit tepny od středně velkých až po arterioly s vnitřním průměrem pod 100 μ m. Jejich tunica intima je složena z endotelových buněk a tenké subendotelové vrstvy, kterou tvoří z velké části mezibuněčná hmota. Subendotelová vrstva leží mezi endotelem a membrana elastica interna. Nejmohutnější vrstvou je tunica media. Tu tvoří buňky hladké svaloviny (spirálovitě uspořádané a propojené gap junctions) a mezibuněčná hmota, kterou produkují. Membrana elastica interna je

uspořádána z elastických vláken s otvory, membrana elastica externa je výrazná jen u velkých tepen. Adventitia obsahuje hodně vaziva, které umožňuje přichycení cévy do okolí. Jsou v ní i další struktury jako vasa vasorum, které vyživují hlavně zevní část medie. U větších artérií tudy procházejí i lymfatické cévy. V tunica adventitia je také důležitá nervová síť, která ale neproniká do tunica media. Další buňky mimo tunica adventitia jsou aktivovány pomocí gap junctions nebo difúzí mediátoru. (1)

tepny elastického typu

Patří mezi ně velké tepny (např. aorta) a jejich velké větve. Hlavně v okolí srdce mají tyto cévy funkci pružníku. Díky své elasticitě se roztáhnou a zmírní nárazovitou pulsaci krve ze srdce, tím zajistí kontinuální proudění krve. Směrem k periférii se mění na typ svalový. (4)

V tunica intima je zřetelnější subendotelová vrstva s hladkosvalovými buňkami a mezibuněčná hmota. V tunica media najdeme soustředně uložené elastické lamely a buňky hladkých svalů ve vrstvách. Buňky jsou k lamelám připoutány fibrillinem a jsou vzájemně příčně propojeny. Strukturu stabilizují kolagenní vlákna a proteoglykany. Membrana elastica interna a externa nejsou výrazné. Tunica adventitia obsahuje množství vasa vasorum. (1)

Žíly

Stěna žil bývá tenčí než jak je tomu u příslušných artérií a nemá tak výrazné členění do vrstev. (4) Struktura tunica intima je obdobná jako u tepen. Membrana elastica interna nemusí být souvislá. Stavba tunica media je značně variabilní, záleží na části těla, ve které se žíla nachází. U žil na krku je slabší než u končetinových žil. Koncentricky uspořádaná svalovina je méně kompaktní, většinou jsou přítomny podélně orientované buňky hladkých svalů. Adventicie je nejsilnější vrstvou u žil v oblasti břicha (např. v. portae). Žíly jsou oproti tepnám méně inervované, zato mají více vasa vasorum. (1) Významné jsou také žilní chlopně, vyskytující se hlavně v končetinách. Vycházejí z intimy a jsou poloměsíčitého tvaru. Zabraňují zpětnému toku krve. (4)

Mikrocirkulace

Terminální řečiště tvoří arterioly, kapiláry a postkapilární venuly. Arterioly obsahují jednu až dvě vrstvy hladké svaloviny a jejich průměr nepřesahuje 100 μ m. Periferní odpor cév je dán celkovým průřezem arterioli a malých artérií (100-500 μ m). (1)

Kapiláry mají průměr kolem $7\mu\text{m}$ a jejich stěnu tvoří vrstva endotelu, bazální lamina a pericyty (ty mohou regulovat průsvit cévy a stabilizují stěnu). Průměr kapiláry většinou umožňuje projít jen jednomu erytrocytu, což usnadňuje látkovou výměnu. Průtok kapilárním řečištěm se může měnit v závislosti na potřebách orgánů, kapiláry se mohou rozšiřovat nebo uzavírat. (4)

V zásobovaných tkáních také záleží na uspořádání endotelu v kapilárách. Permeabilita souvislé endotelové výstelky se liší podle orgánu (vyskytuje se např. ve svalech, kůži, plicích). Nejnižší propustnost mají kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou v mozku, díky velkému počtu tight junctions. Endotel s fenestracemi je propustný pro vodu a malé hydrofilní molekuly a najdeme ho např. v endokrinních žlázách a sliznici střev. Nespojitém endotelem procházejí téměř všechny součásti plazmy, protože je prostoupen velkými póry (je např. v sinusoidách jater a kostní dřeni). (1)

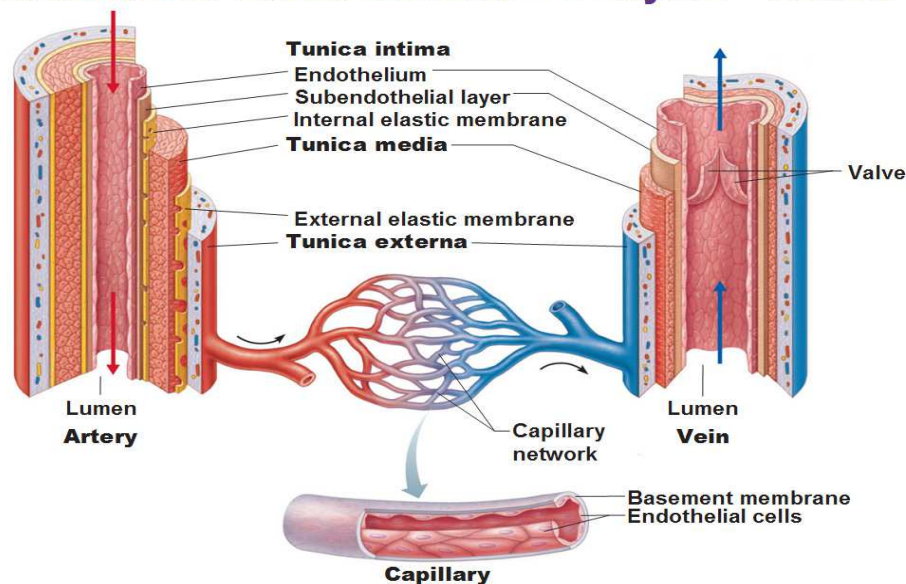
Postkapilární venuly s průměrem kolem $30\mu\text{m}$ jsou tvořeny, podobně jako kapiláry, endotelovými buňkami, bazální laminou a pericyty. Je zde malá koncentrace mezibuněčných spojů a permeabilita endotelu je vysoká. Mohou zde také vystupovat leukocyty – tzv. diapedesa. (1)

Soutokem sběrných žil ($50\mu\text{m}$), v jejichž stěně jsou pericyty a buňky hladkých svalů, vznikají nejmenší žíly. (1)

Obrázek č. 1: Struktura krevní cévy – 3 vrstvy

(cit. 2014-03-05) (5)

Structure of Blood Vessels – 3 Layers “Tunics”



2. 2 Endotel

Endotel pokrývá vnitřní povrch cév, je složen z přibližně $1-6 \times 10^{13}$ endotelových buněk a jeho celková plocha je asi $500-1000 \text{ m}^2$. (6, 7) Tvoří jednovrstevné souvislé polopropustné rozhraní mezi krví a tkání a jeho povrch je nesmáčivý a netrombogenní. Je to metabolicky aktivní orgán a má řadu funkcí. Produkuje mnoho chemických substancí a jejich souhra a rovnováha je důležitá pro správnou funkci endotelu. (6, 7, 8) Řídí prostup látek z plasmy do cévní stěny, řídí cévní tonus uvolňováním vazoaktivních látek, ovlivňuje hemostázu, fibrinolýzu, účastní se při zánětu a aterogenezi. (9)

2.2.1 Specifické funkce endotelu

Endotel odpovídá za propustnost pro buněčné i nebuněčné elementy, buňky cestují přes cévní stěnu pomocí adhezních molekul, které endotel produkuje (selektiny, intercellular adhesion molecules, vascular cellular adhesion molecules), nebuněčné pomocí transportních systémů. (6)

Vazoaktivními látkami endotel ovlivňuje krevní průtok. Endotel produkuje hlavně oxid dusnatý (NO, totožný s endoteliálním relaxačním faktorem), prostacyklin (PGI_2) a endoteliální hyperpolarizující faktor (EDHF). Produkci NO zajišťuje NO-

syntáza z prekursoru L-argininu. NO je hlavním vazodilatátorem endoteliálního původu, zabraňuje také adhezi a agregaci krevních destiček a proliferaci v cévní stěně a její hypertrofii. Prostacyklin potencuje účinek NO a jeho působení je závislé na cyklooxygenáze a EDHF. (9) Endoteliální hyperpolarizující faktor působí pravděpodobně hlavně v koronárních cévách. K vazodilataci vede např. hypoxie, smykové tření proudu krve působící na endotel – shear stress nebo stimulace receptorů acetylcholinem, serotoninem, endotelinem-1, adenosindifosfátem, trombinem, bradykininem. (6, 9, 10, 11)

V endotelu vznikají i látky vazokonstrikční např. endotelin-1, tromboxan, prostaglandin. Endotelin-1 odpovídá za kontrakci a proliferaci buněk hladkých svalů v cévě a jeho syntézu stimulují např. trombin nebo oxidované LDL (low-density lipoprotein) částice. V neporušených cévách jeho vazokonstrikční účinky snižuje působení NO a prostacyklinu. Součástí endotelu je i angiotenzin-konvertující enzym a endotel změnou aktivity enzymu ovlivňuje hladinu angiotenzinu II a bradykininu. Vazokonstrikci mohou vyvolat angiotenzin II, trombin, acetylcholin, serotonin a některé růstové faktory (např. transformující růstový faktor β). (6, 9, 10, 11)

Pokud je porušena integrita cévy, spouští se ihned celá kaskáda dějů hemostázy, do které zasahuje i endotel. Endotel váže antitrombin III a ten tvoří inaktivní komplex s trombinem. Další produkt endotelu trombomodulin, omezuje štěpení fibrinogenu trombinem a pomocí proteinu C a S inaktivuje srážecí faktory Va a VIIa. Buňky endotelu uvolňují jak tkáňový aktivátor plasminogenu (který tvoří z plasminogenu plasmin a podílí se na fibrinolýze), tak jeho inhibitor. Tvoří se zde i Von Willebrandův faktor, který při poranění váže hlavně faktor VIII a usnadňuje adhezi a agregaci trombocytů. (6, 10, 11, 12)

Na obnově nebo novotvorbě cév se endotel také může podílet. Produkuje růstové faktory a cytokiny (transformující růstový faktor β , fibroblastový a destičkový růstový faktor, interleukin-1 a endotelin-1). Tyto látky podporují růst myocytů a jejich přesun do subendoteliální oblasti. (6, 10, 11, 12)

2.2.2 Dysfunkce endotelu

Je to poškození funkcí endotelu předcházející vzniku aterosklerotických lézí. Ztrácí se rovnováha mezi faktory vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferačními. Endotel se stává propustnější a má tendenci k vývoji trombózy, proliferaci a

vazospasmu. (9, 13) Endotelová dysfunkce může být označena jako počáteční fáze aterosklerózy, ale uplatňuje se i při dalším rozvoji aterosklerotických změn. (14)

Na vznik dysfunkce endotelu má vliv řada faktorů. Patří mezi ně arteriální hypertenze (mechanický vliv proudu krve na endotel), hypercholesterolemie a zvýšená hladina LDL částic, hyperglykémie, hyperinzulinémie, zvýšený oxidační stres, hyperhomocysteinémie, škodliviny z cigaretového kouře, stárnutí, poškození imunokomplexy a infekcí, ionizující záření. (6, 7, 9, 15)

Do dysfunkčního endotelu mohou snáze pronikat aterogenní lipidy. Zvláště nebezpečné jsou oxidované nebo glykované LDL částice. Snížená produkce antiproliferačního NO vede ke zvýšené stimulaci myocytů pomocí růstových faktorů, k jejich proliferaci a přesunu do subendoteliálního prostoru a k tvorbě extracelulární matrix. Endotel také exprimuje více adhezních molekul, díky kterým do cévní stěny vcestují monocyty. Ty se zde hromadí, mění se na makrofágy a pěnové buňky, které svými působky narušují fibrózní čepičku postupně se formujícího plátu. Nízká tvorba NO a prostacyklinu, zvýšená tvorba von Willebrandova faktoru a snížená schopnost fibrinolýzy podporují protrombogenní stav dysfunkčního endotelu. Ateroklerotický plát, pokud je nestabilní, může prasknout. Následná trombóza i zvýšená náchylnost k vazospasmům vede k rychlému uzavření cevy. (6, 7, 15)

V časně fázi nemá ještě endoteliální dysfunkce klinické projevy, ale dá se detekovat. (16) Snížená biologická dostupnost NO zhoršuje vazodilatační kapacitu cév. V koronárním řečišti lze kvantitativně koronarografií nebo intrakoronární dopplerovskou ultrasonografií vyšetřit schopnost dilatace cév po podání acetylcholinu, bradykininu nebo např. nitrátů. Mezi neinvazivní metody patří měření dilatace tepny zprostředkované průtokem, změny průtoku krve během reaktivní hyperémie a okluzní pletysmografie. (6, 10, 11, 17) Další možností je stanovení koncentrace látek, které endotel produkuje. Vyšetřuje se krev získaná přímo z postiženého místa, např. při koronarografii, nebo žilní krev. NO se stanovuje těžko kvůli svojí nestabilitě, snáze se stanovuje např. angiotenzin II, trombomodulin, tkáňový aktivátor plasminogenu a jeho inhibitor, adhezní molekuly, endotelin. (6, 11) Zatím se však většina těchto metod používá jen pro klinický výzkum a nejsou zahrnuty do standardních algoritmů hodnotících kardiovaskulární riziko. (16)

2.3 Ateroskleróza

Ateroskleróza je chronické multifaktoriální zánětlivé onemocnění, které postihuje cévní stěnu a mění její strukturu. V rozvoji aterosklerózy figuruje endotel v interakci s řadou faktorů, které se na jejím vzniku také podílejí. Rizikové faktory mohou nejen vyvolat vznik aterosklerózy, ale i její rychlejší progresi. Čím více rizikových faktorů se u jedné osoby vyskytuje, tím je u ní riziko aterosklerózy vyšší. Ateroskleróza má za následek některé orgánové změny, které se klinicky manifestují jako ischemická choroba srdeční (ICHS), ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) a cévní mozková příhoda (CMP). (9)

2.3.1 Epidemiologie

Podle Světové zdravotnické organizace umírá ročně nejvíce lidí po celém světě právě na kardiovaskulární onemocnění. V roce 2008 to bylo odhadem 17,3 milionů lidí, z toho 7,3 milionů úmrtí bylo způsobeno ischemickou chorobou srdeční a 6,2 milionů cévní mozkovou příhodou. (18)

Také v Evropě jsou podle výsledků velkých mezinárodních studií (např. MONICA) onemocnění kardiovaskulárního systému hlavní příčinou úmrtí. U osob do 65 let je to nejčastější příčina smrti (u mužů 30%, u žen 29%). V České republice (podle statistik z roku 2003) mají kardiovaskulární onemocnění na svědomí 51% ze všech úmrtí, z toho hlavní příčinou byla ICHS. Dobrou zprávou však je, že díky zlepšení zdravotní péče, ekonomických a sociálních faktorů a životního stylu kardiovaskulární morbidita a mortalita klesá jak v České republice, tak v celé Evropě. (19)

2.3.2 Metabolismus lipidů

Při zpracovávání lipidů v těle se tvoří částice, které hrají velkou roli při vzniku aterosklerózy. Metabolismus lipidů můžeme dělit na exogenní a endogenní. (20)

Exogenní cesta začíná přijetím lipidů ve stravě. Ty se štěpí v trávicím traktu a pomocí lipáz a žluči se vstřebávají. Vstřebané triacylglyceroly (TAG) a cholesterol tvoří v tenkém střevě chylomikrony obsahující asi 90% TAG, dále cholesterol, fosfolipidy a apolipoproteiny – bílkovinná složka (apolipoprotein E obsahují chylomikrony, VLDL a HDL; apolipoprotein B 100 VLDL, IDL a LDL). Chylomikrony pronikají do oběhu, jsou štěpena lipoproteinovou lipázou a vznikají z nich chylomikronové zbytky, které jsou vychytávány apoE receptorem v játrech a přeměněny na další lipoproteiny. (20)

Endogenní cesta zprostředkuje přenos cholesterolu a TAG z jater do periferie a cholesterol jako HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol) z periferie zpět do jater. HDL-C jsou malé sférické částice tvořené fosfolipidy, cholesterolem a jeho estery, triacylglyceroly a proteiny. Jsou syntetizovány v játrech a tenkém střevě. HDL částice jsou schopné transportovat volný cholesterol z periferie do jater (cholesterol vstupuje do HDL částic, esterifikuje se a přesunuje do jádra částice). Podle některých studií HDL částice i odstraňují cholesterol z makrofágů, brání oxidaci LDL a adhezi monocytů k endotelu. (20)

V játrech se tvoří VLDL (very low-density lipoprotein) obsahující také TAG, fosfolipidy, estery cholesterolu, volný cholesterol a apolipoprotein B100 (apoB). Lipoproteinová lipáza z VLDL uvolňuje volné mastné kyseliny, vznikají částice IDL (intermediate-density lipoprotein). Část IDL je metabolizována v játrech pomocí apoE receptoru a z části se tvoří LDL (low-density lipoprotein). LDL částice jsou aterogenní, transportují až 3/4 celkového cholesterolu a z oběhu je vychytává receptor pro apoB. Asi 1/5 cholesterolu se odbourává přes tzv. scavengerovou cestou, která je také aterogenní. (20)

Cholesterol se vylučuje do žluči a reabsorbuje se v enterohepatálním oběhu. Mastné kyseliny uvolněné lipoproteinovou lipázou se ukládají v tukové tkáni nebo svalech. (20)

2.3.3 Rizikové faktory

Aby byl určitý faktor považován za rizikový, musí být v těsném spojení s určitou nemocí a musí přímo zvyšovat riziko výskytu nemoci. Rizikové faktory spojené s aterosklerózou můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. (20)

Mezi faktory, které nemůžeme ovlivnit, patří:

Věk - ateroskleróza se vyvíjí postupně a dlouhodobě a může vzniknout v každém věku. S přibývajícím věkem, ale pravděpodobnost jejího výskytu stoupá. U mužů je riziková hranice 45 let a výše a u žen věk nad 55 let (postmenopauzální). (20)

Pohlaví – u mužů do 50 let věku je výskyt aterosklerózy častější než u stejně starých žen (ženy chrání vyšší hladiny HDL cholesterolu a estrogenu). Po menopauze u žen se rozdíl mezi pohlavími vyrovnávají. V poslední době se zvyšuje výskyt kardiovaskulárních onemocnění i u mladších žen, pravděpodobně kvůli tomu, že více žen je kuřáček a užívají perorální antikoncepci. (20)

Genetické faktory – některé rodiny jsou zatíženy vyšším výskytem kardiovaskulárních onemocnění. Rizikový je výskyt ICHS u mužů mladších 55 let a u žen mladších 65 let nebo klinická manifestace aterosklerózy u příbuzného 1. stupně. Mezi geneticky podmíněné choroby, které mohou ovlivnit vznik aterosklerózy, patří vrozené poruchy metabolismu lipidů (např. familiární hypercholesterolemie – vysoký celkový a LDL cholesterol, familiární kombinovaná hyperlipoproteinemie – zvýšená hladina cholesterolu, triglyceridů a apolipoproteinu B 100). Genetický podklad má i obezita a inzulinová rezistence a metabolický syndrom (zahrnuje hypertenzi, hyperlipoproteinemii, diabetes mellitus, obezitu). (20)

Ovlivnit také dost dobře nemůžeme vznik některých dalších nemocí, které vedou ke změnám koncentrací lipidů a lipoproteinů v krvi a to např. hypothyreóza, onemocnění nadledvin, ledvin, jater, hypofýzy a různé infekce. Dyslipidemi může být i poléková, můžou ji způsobit např. glukokortikoidy, imunosupresiva, thiazidová diuretika, betablokátory neselektivní s ISA, androgeny. (20)

Rizikové faktory, které můžeme určitými opatřeními ovlivnit:

Hypercholesterolemie - Snížení koncentrace celkového cholesterolu o 1% vede ke snížení rizika ICHS o 2%. Celkový cholesterol by neměl přesáhnout koncentraci 5mmol/l. (20)

Nízká koncentrace HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol) – Hodnoty HDL cholesterolu by neměly klesnout pod 1 mmol/l. Každé zvýšení HDL-C o 0,02mmol/l snižuje riziko ICHS o 2-3%. (20)

Hypertriglyceridemie – Při hypertriglyceridemii vznikají lipoproteiny bohaté na triacylglyceroly a to zvyšuje jejich aterogenitu. Zároveň se snižuje hladina HDL. Hladiny triacylglycerolů (TAG) by neměly překročit 2 mmol/l. (20)

LDL₃ (small dense LDL) – jsou to subfrakce LDL cholesterolu, vysoce aterogenní a mohou snadno vcestovat do subendoteliální oblasti, dokážou se rychle oxidovat a špatně se vážou na LDL receptory. Vliv na velikost LDL mají hladiny TAG v plasmě (při hypertriacylglycerolemii se tvoří atypicky velké VLDL částice a z nich vznikají LDL₃). Převahu LDL₃ částic také vyvolává tzv. fenotyp B. Jeho výskyt je částečně geneticky podmíněn a vyskytuje se hlavně u osob s inzulinovou rezistencí a manifestní ICHS. (20)

Modifikované LDL a HDL – aterogenita LDL částic nezávisí jen na jejich koncentraci, ale i na jejich struktuře. Součástí LDL částic je apolipoprotein B 100, který může při dlouhotrvající hyperglykémii vázat glukózu (glykace). LDL částice se mohou oxidovat působením volných radikálů. Oxidací lipidů vznikají aldehydy a ty modifikují strukturu apoB. Oxidované LDL jsou cytotoxické, snižují produkci NO, mají vyšší afinitu k makrofágům, zvyšují expresi adhezních molekul a produkci vazokonstrikčního endotelinu, podporují přeměnu monocytů na makrofágy a aktivaci a agregaci destiček. Oxidaci podporují UV světlo, myeloperoxidáza, kouření, peroxidy, angiotenzin II, kyselé pH, hladovění, trauma, hyperglykémie. (20)

Obezita – multifaktoriální nemoc, která se projevuje zvýšením hmotnosti z nadměrné tvorby tělesného tuku. Přispívá k vzestupu morbidity i mortality. Nepříznivě působí i v patogenezi dalších onemocnění (kardiovaskulární, metabolické poruchy, hypertenze, diabetes mellitus 2. typu, nádorová, gynekologická onemocnění). Riziko stoupá při hodnotě BMI nad 25,0, ale záleží na rozložení tělesného tuku – nebezpečná je viscerální obezita. Vysoké riziko představuje u mužů obvod pasu větší než 102 cm, u žen větší než 88 cm. (20)

Inzulinová rezistence – je porušena odpověď na endo- a exogenní inzulin. Glukóza působí na endotel snížením jeho relaxace, zvýšením cévní rezistence a zvýšením tlaku krve. Je jednou z příčin vzniku diabetu mellitu 2. typu. (20)

Diabetes mellitus – přítomnost diabetu mellitu násobí riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění. U DM typu 2 se vyskytuje snížená koncentrace HLD-C; koncentrace TAG se zvyšuje a to vede k převaze malých aterogenních LDL částic. Hyperglykémie nepříznivě působí na endotel. Díky ní vznikají modifikované molekuly (např. AGE – advance glycation endproducts), které mají na svědomí zvýšenou produkci cytokinů, vazoaktivních peptidů a prokoagulační stav. (20)

Kouření – snižuje biologickou dostupnost NO, zvyšuje hladiny oxidovaných LDL částic, škodlivý efekt kouření na endotel je závislý na dávce a po ukončení kouření mizí. Cigaretový kouř navozuje oxidativní stres, do těla se z něj uvolňují volné radikály a snižuje hladiny HDL. (20)

Arteriální hypertenze – hodnoty normálního krevního tlaku jsou pod 140/90 mm Hg. Silnější pulzace krve mechanicky poškozuje endotel. Vysoký tlak často poškozuje srdce a ledviny. Pokud se tlak krve sníží o 5-6 mm Hg, sníží se riziko infarktu myokardu o 14% a cévní mozkové příhody o 42%. (20, 21)

Lipoprotein (a) – je lipoprotein o nízké hustotě. Spolu s glykoproteinem tvoří apolipoprotein (a), jehož část je strukturně podobná plazminogenu. Apolipoprotein (a) tak může snižovat fibrinolýzu (riziková je koncentrace Lp (a) větší než 30 mg/dl). (20)

Trombogenní faktory (20)

C-reaktivní protein (20)

Leptin – zvýšení hladina leptinu ukazuje na neadekvátní ukládání energie a je přítomna u většiny obézních osob. (20)

Hyperhomocysteinemie – homocystein zvyšuje trombogenitu, snižuje tvorbu NO, zvyšuje proliferaci hladkých svalových buněk cévní stěny a oxidaci LDL. (20, 22)

Infekční faktory – infekce může vyvolat zánět a ten vyvolává rozvoj aterosklerózy. Některá infekční agens mohou poškodit výstelku koronárních cév. K rizikovým se řadí Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, herpes simplex virus. (20)

2.3.4 Vznik aterosklerotického plátu

Aterosklerotický plát se vyvíjí postupně v několika fázích (viz obr. č. 3). Na počátku je dysfunkční endotel. LDL částice vstupují do intimy cévy. V počátečních fázích endotel produkuje adhezní molekuly (E-selektin, VCAM-1, ICAM-1), které napomáhají průniku monocytů a T-lymfocytů do cévní stěny. Monocyty se zde přemění na makrofágy a pohlcují jen určité množství LDL. Vstup LDL částic do makrofágů se zvýší, pokud jsou částice oxidované. Oxidované LDL zvyšují expresi tzv. scavengerových receptorů na makrofázích. Aktivitu scavengerových receptorů neovlivňuje obsah cholesterolu v buňce a proto se cholesterol intracelulárně nekontrolovatelně hromadí. Z makrofágů se pak stávají pěnové buňky a ty jsou hlavní složkou počáteční léze. (9)

Monocyty a makrofágy se dál kumulují. Endotel tvoří glykoproteiny, díky kterým k jeho povrchu adherují monocyty. Oxidované LDL podporují v endotelu produkci chemotaktického faktoru pro monocyty. Monocyty cestují do intimy, mění se na makrofágy. Postupně vznikají lipidové proužky, které ještě nijak nezasahují do průsvitu cévy a nemusí se dále vyvíjet do aterosklerotického plátu. Makrofágy tvoří cytokiny (díky kterým se v endotelu tvoří více glykoproteinů a to přitahuje další monocyty) a růstové faktory (zapřičiňují proliferaci hladkých svalových buněk). Buňky hladkých svalů migrují, díky cytokinům se mění jejich vlastnosti z kontrakčních na sekreční a tvoří extracelulární matrix a vazivo. (9)

Hypercholesterolemie a hypertenze mají imunoaktivační účinky a podporují průnik leukocytů do stěny cévy. Modifikované LDL mohou navázat imunokomplexy a tyto vzniklé částice nejvíce podporují vznik pěnových buněk a uvolňování cytokinů. LDL-C a oxidované LDL částice se stávají antigenem, který vyvolává zánět ve stěně cévy a aktivuje tvorbu makrofágů. Buňky hladkých svalů dále proliferují a tvoří extracelulární matrix. Vzniká fibrózní ateromový plát plný krystalků cholesterolu uvolněných po rozpadu makrofágů. Tento plát už je schopen omezit krevní průtok v cévě a může hrozit rupturou. (9)

2.3.5 Stabilita plátu

To, zda je plát stabilní, závisí mimo jiné na obsahu lipidů v jeho jádře a na síle fibrózní čepičky. Zánětlivá reakce ovlivňuje endotel, složení plátu, jeho náchylnost k prasknutí a případnou trombózu (ovlivňuje i hladiny fibrinogenu, trombomodulinu, tromboxanu a inhibitoru tkáňového aktivátoru plasminogenu). Zánět a imunitní reakce se podílí na vzniku a dalším růstu plátu. Díky probíhajícímu zánětu v aterosklerotickém ložisku se aktivují makrofágy, endotel, proliferují buňky hladkých svalů. Struktura plátu, mechanické a rheologické vlivy ovlivňují stabilitu plátu. (9)

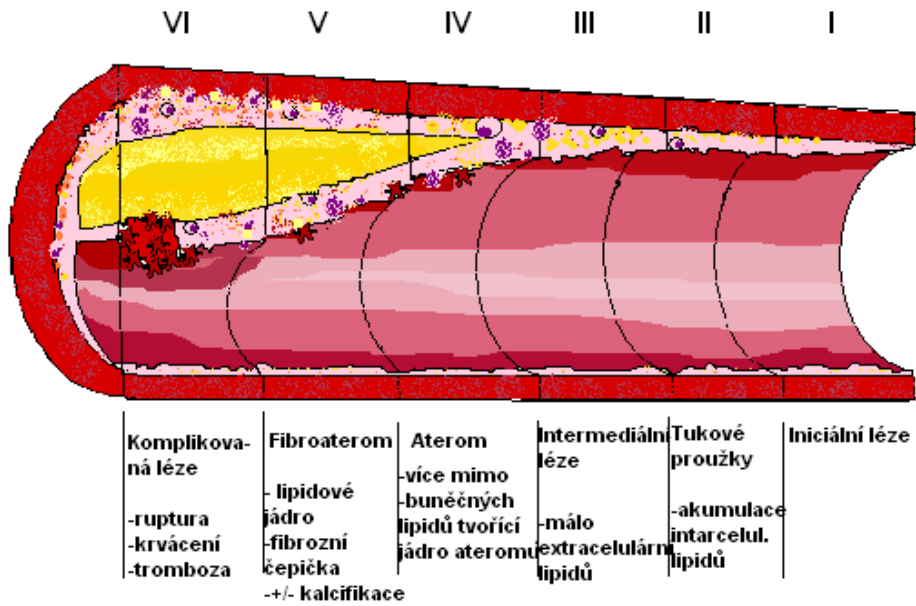
Stabilní aterosklerotický plát obsahuje málo lipidů a je kryt pevnou vrstvou z myocytů a extracelulární matrix. Má nesmáčivý povrch. (9)

Nestabilní plát obsahuje hodně lipidů, leukocytů a má tenký kryt (viz obr. č. 3). Může být snadno mechanicky poškozen buď prasknutím krytu, nebo hemoragií v plátu. Největší mechanický stres působí na místo, kde plát dosedá na normální intimu. Styk jádra plátu s krví aktivuje koagulaci a vzniká destičkový trombus. Trombocyty se shlukují, uvolňují obsah svých granul a to aktivuje další destičky a dojde k lokální vazokonstrikci. Trombóza částečně nebo úplně uzavírá tepnu. (9)

Ateroskleróza je generalizované postižení tepen, přesto postihuje více proximální úseky a bifurkace tepen (kde je krev více náchylná k turbulentnímu proudění). Aterosklerotické poškození cévní stěny může způsobit její rozšíření, rupturu, zmenšení nebo úplně uzavření jejího průsvitu. K zužování lumen cévy nejčastěji dochází v koronárním řečišti, tepnách mozku a dolních končetin. Aneurysmata nejčastěji vznikají v abdominální oblasti. (9)

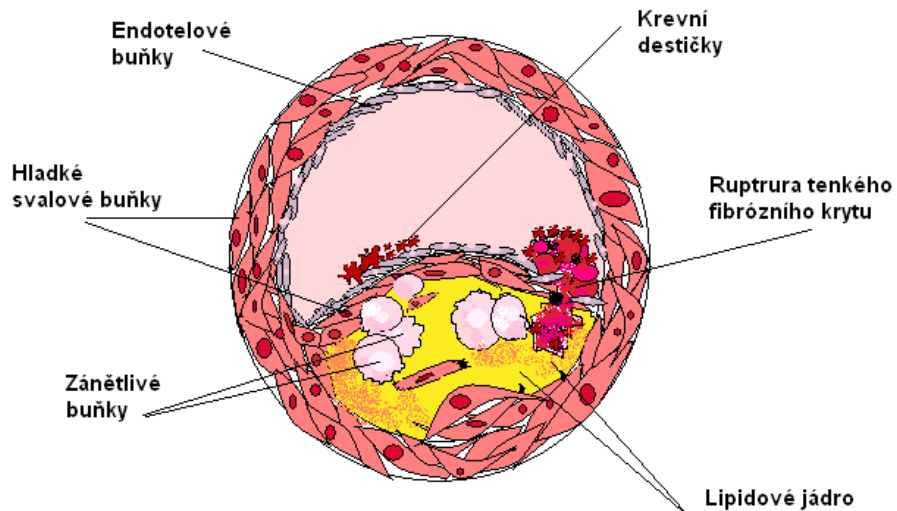
Obrázek č. 2: Postupný vývoj aterosklerotického plátu

(cit. 2014-03-10), (23)



Obrázek č. 3: Ruptura nestabilního aterosklerotického plátu

(cit. 2014-03-10), (24)



2.4 Adhezní molekuly

Buňky v organismu spolu komunikují pomocí mezibuněčných kontaktů. Kontakt mezi buňkami je zprostředkován páry adhezních molekul (jedna je jako receptor na jedné buňce, druhá jako ligand na jiné buňce). Adhezní molekuly nejen umožní kontakt, ale přenášejí do buňky různé signály. Některé adhezní molekuly mohou být exprimovány stále, jiné se objeví až po aktivaci buňky. Aktivátorem jsou např. cytokiny nebo signál z jiného povrchového receptoru. Afinita adhezních molekul se mění podle situace v buňce. (25)

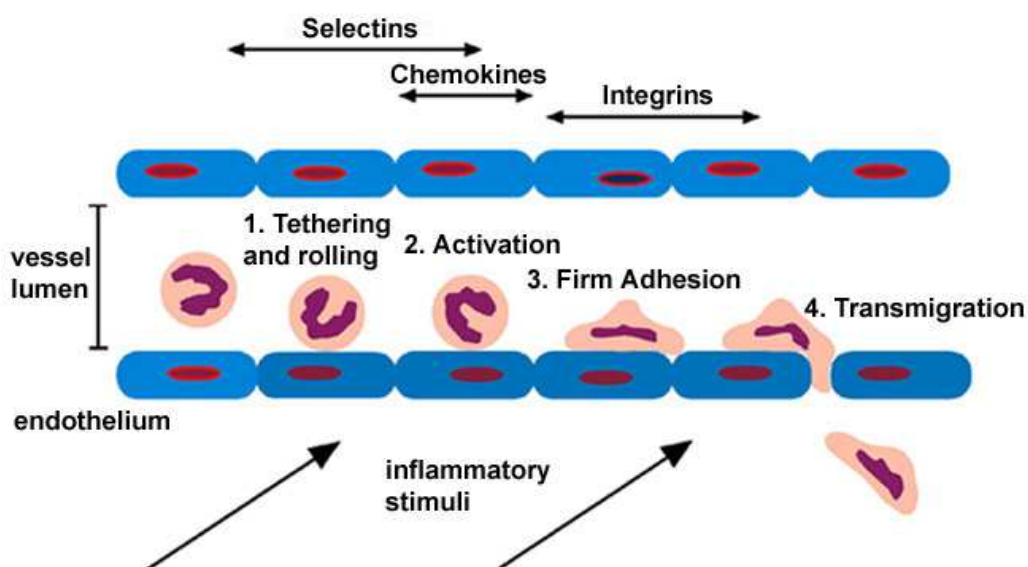
Tyto molekuly jsou využívány např. buňkami imunitního systému, při diferenciaci buněk, embryogenezi, regeneraci, hematopoeze, ale i při metastazování nádorů. Pokud chtějí buňky využít komunikaci pomocí adhezních molekul, musí mezi nimi dojít k přímému kontaktu. Tím se liší od cytokinů nebo hormonů, díky kterým mohou buňky komunikovat na větší vzdálenost. Některé adhezní molekuly ale existují i v solubilní formě a mohou tak působit i na buňky v určité vzdálenosti. (25)

Adhezní molekuly můžeme podle struktury dělit do skupin na integriny, adhezní molekuly imunoglobulinové skupiny, selektiny a jiné lektiny, muciny a jiné adhezní molekuly. (25)

Adhezní molekuly např. umožňují leukocytům dostat se z krevního proudu přes endotel do tkáně. To se děje v několika krocích za účasti několika druhů adhezních molekul. První je kontakt buňky a adhezní molekuly (tethering), následuje zpomalení pohybu leukocytu vzhledem k endotelu (tzv. rolling – rolování nebo kutálení), po aktivaci buňka adheruje na endotel (firm adhesion) a pomocí diapedézy (transmigration) jím prostoupí, jak ukazuje obrázek č. 4. (25)

Obrázek č. 4: Prostup buňky přes endotel

(cit. 2014-03-15), (26)



2.4.1 Selektiny

V současné době rozlišujeme tři základní typy selektinů, které mají podobnou strukturu. Jejich označení vychází z typů buněk, které je exprimují: L – leukocytární, E – endoteliální, P – platelet (trombocytární). (25)

Každý ze tří typů selektinů obsahuje NH₂-terminální Ca²⁺-dependentní lektinovou doménu, díky které rozeznává specifické sacharidové struktury jiných buněk. Na ní navazuje epidermálnímu růstovému faktoru podobná doména (EGF-like domain), následuje několik opakujících se úseků (short consensus repeats – SCRs). Tyto struktury také hrají roli v interakci selektinu s ligandem. Následuje transmembránová doména a cytoplasmatický konec. (27, 28, 29) Všechny tři selektinové molekuly se shodují nejvíce ve své terminální lektinové doméně (všechny rozeznávají velmi podobné ligandy). (30) Liší se od sebe hlavně v počtu SCRs (L-selektin má 2, P-selektin 9, E-selektin 6 SCR). (31, 32)

Selektiny jako ligandy rozeznávají 1) oligosacharidové sekvence sialyl-Lewis x a sialyl-Lewis a, 2) fosforylované mono- a polysacharidy, 3) sulfatované polysacharidy. (33)

Pokud buňky zachytí prozáněťové nebo chemotaktické signály z okolí, začnou na svém povrchu exprimovat selektiny. (25) L-selektin exprimovaný na leukocytech se váže na ligandy konstitutivně exprimované na endotelu periferních mizních uzlin a

inducibilně exprimované na endotelu v místě zánětu. E-selektin je přechodně syntetizován a exprimován na endotelu aktivovaném cytokiny. P-selektin exprimuje aktivovaný endotel a krevní destičky. E- i P-selektin můžou vázat myeloidní buňky a lymfocyty. (34)

Na rozdíl od integrinů nebo molekul imunoglobulinové skupiny, které zprostředkovávají interakce mezi buňkami po celém těle, je funkce selektinů omezena jen na cévní systém. (30) Selektiny se uplatňují v první fázi záchytávání buněk na endotelu (viz obr. 4). Tato interakce je reversibilní a zpomaluje pohyb buněk. (25)

2.4.2 P-selektin

P-selektin je tvořen konstitutivně a skladován v endotelových buňkách ve Weibel-Paladeho granulech a v α -granulech krevních destiček, (35, 36) odkud se dokáže v případě potřeby rychle uvolnit na povrch buněk. Expresi P-selektinu vyvolávají trombogenní a zánětlivé mediátory (trombin, histamin, fragmenty komplementu, kyslíkové volné radikály, cytokiny). Jeho přítomnost na povrchu buněk je jen krátkodobá (několik minut) pak se dostává buď do lysosomů, kde je rozložen nebo se vrací zpět do granul. Díky jeho rychlé expresi po aktivaci buňky je schopen zprostředkovat počáteční interakci leukocyt – endotelová buňka. (37)

P-selektin se účastní také při vazbě destička-leukocyt (P-selektin na adherovaných destičkách při vzniku trombu umožňuje kumulaci leukocytů a to je důležité pro ukládání fibrinu; také způsobuje aktivaci a adhezi leukocytu na endotel) a vazbě destička-endotel (při poškození endotelu). (38, 39, 40)

2.4.3 P-selektin a ateroskleróza

Oxidované LDL částice se podílejí na zánětlivých procesech v endotelu a vyvolávají expresi P-selektinu a adhezi monocytů k endotelu. (41, 42) *In vivo* najdeme P-selektin na endotelu poškozeném aterosklerózou, ale ne na normálním endotelu. (43)

V pokusu na králících bylo zjištěno, že P-selektin se na endotelu exprimoval po jednom týdnu podávání aterogenní diety, ale k prostupu makrofágů do cévy došlo až po dvou týdnech. (44) Vzestup exprese P-selektinu je možná prvotním dějem při vzniku aterosklerózy. (45)

Také bylo dokázáno na *ex vivo* modelu izolované cévy, že blokací P-selektinu nebo jeho ligandu se omezí adheze monocytů. (45)

V dalším pokusu byly použity tři modely myši se schopností rozvoje aterosklerózy, všechny P-selektin-deficientní. U všech tří modelů byly menší lipidové proužky v počáteční fázi a snížený počet makrofágů v plátech. (46, 47)

P-selektin můžeme najít i na aktivovaných krevních destičkách. Studie naznačují, že cirkulující aktivované destičky jsou znakem kardiovaskulárního onemocnění. Pomocí transplantace kostní dřeně u myši bylo dokázáno, že myši, které dostaly P-selektin-deficientní destičky, tvoří menší aterosklerotické léze, než myši s normálními krevními destičkami. (47)

Solubilní P-selektin, který se uvolňuje z aktivovaných destiček a endotelu, stimuluje leukocyty k produkci tkáňového faktoru (součást koagulační kaskády) a k adhezi. Myši se zvýšenou expresí solubilního P-selektinu vykazovaly protrombotický stav a chronický zánět. (48, 49, 50)

Destičky se vážou na aktivovaný endotel interakcí mezi P-selektinem destiček a endotelovým ligandem. V průběhu interakce aktivované destičky působí na endotel pomocí CCL5 (= RANTES, prozánětlivý chemokin), který zvyšuje adhezi monocytů. (51)

V posledních letech bylo zjištěno, že adhezní molekuly hrají důležitou roli ve vzniku a progresi aterosklerózy a stále jsou předmětem výzkumu. Pokud porozumíme mechanismům, které regulují expresi selektinů, budeme moci ovlivnit např. vstup buněk imunitního systému do cév a kontrolovat tak proces zánětu. (52, 53)

2.5 Myší modely aterosklerózy

Ateroskleróza a její komplikace představuje hlavní příčinu úmrtnosti ve vyspělých zemích. Proto je důležité odhalit přesně mechanismy jejího vzniku, abychom jí mohli předcházet nebo jí léčit. (54) Už přes sto let se ateroskleróza zkoumá na zvířecích modelech. (55) Kvůli mnohým rozdílům mezi lidmi a zvířaty se nedá vytvořit na zvířecích modelech přesná kopie nemoci tak, jak probíhá u lidí. Dobrý zvířecí model aterosklerózy nám ale umožňuje pozorování různých změn v průběhu onemocnění a může tvořit pláty podobné těm u lidí. (56)

Využití myši má oproti jiným druhům několik výhod. (57) Je poměrně snadné a nenákladné si myši pořídit a chovat. Dokážou se rychle množit – tři týdny trvá březost a nově narozená myš se sama může rozmnožovat už po 6 týdnech. (58) Důležitá je také znalost myšího genomu. Myš je nejběžněji používané zvíře pro různé genetické manipulace. Pomocí genomového inženýrství se dají určité geny vkládat do genomu nebo

se dají naopak inaktivovat. Výhodou je, že u myši se můžou vyvíjet různé druhy aterosklerotických plátů od pěnových buněk až k pokročilým lézím s lipidovým jádrem a fibrózním krytem v krátkém časovém období. (57) To, že myši jsou malé, dovoluje využít při výzkumu větší skupiny zvířat a díky tomu získat statisticky významnější data. (58) Naopak je kvůli malé velikosti myši obtížnější získat dostatečné množství krve, tkání pro vyhodnocení a provádět na myších chirurgické zákroky. (59)

2.5.1 Inbrední kmeny

Ve výzkumu se využívají zejména inbrední kmeny myši vzniklé pářením příbuzných zvířat, až vzniká kmen genotypově identických jedinců. U inbredních myši se spontánně nevyvíjí ateroskleróza, ale lze toho docílit speciální dietou obsahující nasycené tuky, cholesterol a cholát (cholát způsoboval zánětlivé reakce). (60, 61) Tato dieta zvyšuje plasmatickou frakci VLDL částic (u myši krmených normální dietou prakticky přenáší cholesterol jen HDL částice). (62)

Nejnáchylnější k dietou indukované ateroskleróze je z inbredních kmenů kmen C57BL/6. I po dlouhodobém krmení dietou s vysokým obsahem tuků se pláty u myši formují jen v kořeni aorty, jsou velmi malé a rozdílné ve srovnání s aterosklerózou u lidí. Pláty obsahují cholesterol a makrofágy a obvykle zůstávají jen ve fázi tukových proužků. (62)

Využití kmene C57BL/6 je přesto vysoké, tento kmen tvoří základ pro genetické manipulace sloužící pro výzkum aterosklerózy. (63)

2.5.2 „Genově cílené“ modely

Existují další myši modely, u kterých se funkce některých genů vyřadí – tzv. knockout.

LDL receptor-/-

Nedostatek LDL receptorů u lidí vede k výrazné hypercholesterolemii. (64) U myši bez LDL receptoru se nevyvíjí tak výrazná hypercholesterolemie pokud nejsou krmeny dietou s nasycenými tuky, cholesterolem a cholátem. (65) Pak se u nich objevují pláty v celé aortě a hlavně v kořenu aorty a koronárním řečišti. (66) Po delší době se vyvíjí i pláty s lipidovým jádrem a kalcifikací. (67, 68, 69)

ApoE-/-

Deficit apoE vede k hyperlipidémii a zvýšení počtu VLDL. U tohoto modelu myši se pláty tvoří i při normální dietě. (67, 68, 69) Strava obsahující nasycené tuky ještě urychlí tvorbu plátů. Pláty se tvoří v několika místech aorty - v ascendentní části a

v oblouku, dále v ledvinách a koronárních cévách. (70, 71, 72) V některých plátech byla pozorována hemoragie, ale nedošlo ke spontánní ruptuře. (70)

Největším nedostatkem tohoto myšího modelu je to, že lipoproteinový profil je jiný než u lidí. U myši nejvíce cholesterolu přenáší VLDL částice a ne LDL, jak je tomu u lidí. Ale aterosklerotické pláty u těchto apoE^{-/-} myši jsou nejpodobnější těm, které se tvoří u člověka. (73)

Existují i myší modely kombinující genetické modifikace. Např. ApoB transgenní x LDL receptor^{-/-}. Oba modely vyžadují k tvorbě větších plátů speciální dietu. V kombinaci ale vykazují vyšší hypercholesterolemii i na normální dietě. (74)

U myši nedochází obvykle ke spontánním rupturám plátů a bylo zaznamenáno jen pár případů, kdy u myši došlo k infarktu myokardu nebo CMP v důsledku aterosklerózy, přestože u nich byly vyvinuty pláty podobné nestabilním plátům u lidí. Naopak u lidí dochází k rupturám plátů a k následným závažným komplikacím (uzavření cévy trombem buď v místě ruptury plátu, nebo embolizace cévy v jiném místě) mnohem častěji. (75, 76)

2.5.2 Myší modely spontánní ruptury plátu

Arteria brachiocephalica je velmi krátká a úzká céva (u myši kolem 2mm dlouhá a 0,5mm široká), vycházející z vršku aortálního oblouku. Dál se větví na arteria carotis communis dextra a arteria subclavia dextra. (77)

Studie na apoE^{-/-} 42 až 54 týdnů starých myších krmených normální stravou ukázala, že se právě v arteria brachiocephalica tvoří komplexní fibrózní pláty s tenkou čepičkou zatím bez spontánní ruptury. (77) K té došlo až po krmení těchto myši dietou s vysokým obsahem tuků po dobu 14 měsíců. (78) Ruptury se objevují v proximální části cévy a jsou dlouhé asi 60 μ m a jsou spojené s tvorbou trombu. (79, 80)

Díky tomuto myšímu modelu můžeme pozorovat vývoj plátu, objasnit mechanismy předcházející jeho ruptuře a výborně se hodí pro výzkum terapií, které by zabránily ruptuře aterosklerotického plátu. (81)

2.6 Imunohistochemie

Do imunohistochemie můžeme zahrnout techniky využívající mono- nebo polyklonální značené protilátky, které se vážou na tkáňové antigeny a tím je možné antigeny lokalizovat a vizualizovat. (82) V praxi se nejčastěji detekují intermediární filamenta, mikrofilamenta, CD antigeny, hormony, estrogenové a progesteronové

receptory, ale dají se detekovat i další antigeny typické pro některé tkáně nebo buňky. (82, 83)

2.6.1 Imunohistochemické metody se dají rozdělit na:

Přímé – primární protilátka je přímo značená, metoda se využívá při dostatečné koncentraci antigenu ve tkáni. (82, 83)

Nepřímé dvojstupňové – v první fázi se aplikuje neznačená primární protilátka a v druhé fázi sekundární protilátka, která se naváže na primární a je značená; metoda je složitější, zato více citlivá. (82, 83)

Nepřímé trojstupňové - metoda je amplifikační a dokáže zesílit signál, i když je ve tkáni malé množství antigenu; v první fázi začínáme neznačenou primární protilátkou, v druhé fázi reaguje primární protilátka s neznačenou sekundární protilátkou – tvoří „můstek“, nakonec přidáváme značený komplex (např. peroxidáza-anti-peroxidázový komplex, komplex alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza, komplex avidin-biotin). (82, 83)

Metoda avidin-biotin komplexu (ABC metoda) - avidin je protein z vaječného bílku, biotin je vitamin. Vzniká mezi nimi prakticky ireverzibilní vazba, která je druhově nespecifická a neimunologická. Avidin dokáže navázat čtyři molekuly biotinu. Některá vazebná místa molekuly avidinu jsou obsazena komplexem z biotinu a peroxidázy. Na neobsazená místa se pak váže biotinylovaná sekundární protilátka (která byla předtím navázána na primární protilátku) a tvoří tak můstek mezi primární protilátkou a komplexem. (viz obrázek č. 4), (82)

2.6.2 Provedení metody

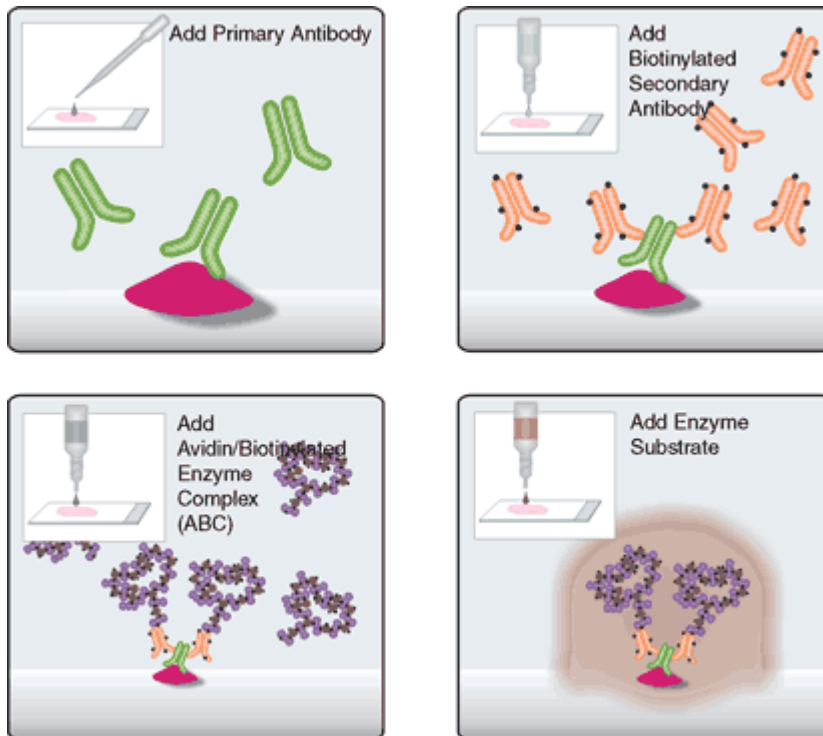
Aby nevznikaly falešně pozitivní reakce, musíme blokovat endogenní aktivity enzymů (u ABC metody blok peroxidázy ve tkáni) a pozadí (endogenní aktivity avidinu a biotinu, biotin je v játrech, tukové tkáni a mléčné žláze). Řez také během zpracování nesmí vyschnout. Tkáň lze předem nasytit bílkovinami např. z mléka a zabránit nespecifické vazbě specifické protilátky. Pak následuje navázání protilátek dle použité metody nejlépe při neutrálním pH. (82)

Ve výsledku máme chromogenem označené místo, kde došlo k vazbě protilátka-antigen. Chromogeny se používají imunofluorescenční, imunometalické, radioimunohistochemické nebo imunoenzymové (u ABC křenová peroxidáza). Pokud použijeme enzym, musíme provést ještě jeden krok k vizualizaci reakce. Peroxidáza

většinou svojí činností tvoří nějaký nerozpustný pigment. U peroxidázy použijeme 3,3'-diaminobenzidin (DAB). DAB se účastní reakce mezi peroxidázou a jejím substrátem peroxidem vodíku jako donor elektronů a vzniká z něj hnědý v alkoholu nerozpustný produkt. Nakonec se pro lepší orientaci v preparátu dobarvují jádra buněk. (82)

Obrázek č. 5: Provedení ABC metody

(cit. 2014-03-18), (84)



3 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo popsat expresi P-selektinu v arteria brachiocephalica u apoE/LDL-receptor deficientních myší po podávání diety s vysokým obsahem proteinů a nízkým obsahem cukrů pomocí imunohistochemických metod.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu

4.1.1 Zvířata, experimentální dieta

Pro tuto práci byly použity 16-18 týdnů staré apoE/ LDLR^{-/-} myši samice. Tyto myši mají deficientní apoE i LDL-receptor a jsou tak predisponované k rozvoji aterosklerózy. Myši byly umístěny v klecích s řízenou teplotou (22-25 °C) a cyklem dvanáctihodinového střídání světla a tmy. Měly volný přístup k potravě a vodě.

Veškeré zacházení se zvířaty bylo v souladu se směrnicemi Evropské unie pro chov a léčbu zvířat a byly schváleny místní Etickou komisí pro zvířata.

Do věku 16-18 týdnů byly všechny myši krmeny stejnou komerční granulovanou stravou bez obsahu cholesterolu (Sniff M-Z Spezialdiäten GmbH; Soest, Germany). Ve věku 16-18 týdnů byly myši podle hmotnosti rozděleny do dvou skupin po 6 zvířatech. Jedna skupina (kontrolní) byla krmena standardní stravou (AIN-93G), druhá skupina byla následujících 8 týdnů krmena stravou s nízkým obsahem cukrů a vysokým obsahem proteinů (LCHP - low-carbohydrate, high-protein).

4 hodiny před usmrcením myši byly z levé srdeční komory odebrány vzorky krve, ze kterých bylo získáno sérum. Vzorky séra byly hluboce zmrazeny (- 80°C) a následně využity pro další analýzy prováděné s využitím komerčně dostupných souprav pro stanovení celkového cholesterolu, LDL a HDL frakcí a triacylglycerolů (Horiba). Výsledky byly vyjádřeny v mmol/l.

Tabulka 1: Složení použité stravy (%)

| | Kontrolní skupina | LCHP |
|--------------------------|--------------------------|-------------|
| Kukuřičný škrob | 53 | 5 |
| Kasein | 20 | 52 |
| Sacharóza | 10 | 12 |
| Sojový olej | 7 | - |
| Máslo | - | 21 |
| Celulózový prášek | 5 | 5 |
| Směs minerálů | 4 | 4 |
| Směs vitaminů | 1 | 1 |
| Cholin | 0,25 | 0.25 |

4.2 Imunohistochemie

Imunohistochemická detekce P-selektinu byla realizována pomocí Avidin-biotin metody (ABC) s detekčním činidlem diaminobenzidinem (DAB), který v případě pozitivity dává barevnou reakci.

4.2.1 Použité protilátky

Primární polyklonální protilátka - goat anti-mouse P-selektin (B Santa Cruz Biotechnology, USA), ředění v BSA (bovine serum albumin; Vector Laboratories; USA) 1:50

Sekundární polyklonální protilátka - biotinylated horse anti-goat IgG (Vector Laboratories; USA), ředění v BSA 1:400 + 8 μ l mouse serum

4.2.2 Příprava roztoků a činidel

PBS (phosphate buffered saline) pufr: 80,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nebo 10,21 g Na_2HPO_4 , 2,0 g KH_2PO_4 ad 1000 ml Aqua bidestilata, upravení pH na 6,8. Tento roztok se před použitím na imunohistochemickou analýzu ředí 1:10 destilovanou vodou (pH 7,4)

BSA (bovine serum albumin): 5 g BSA + 95 g ředěný PBS; rozpustí se, rozdělí do zkumavek po 1ml a zmrazí.

4.2.3 Postup

1. Nejprve se tkáňové řezy fixovaly 30 minut v acetonu při -20°C v mrazicím boxu.
2. Poté se řezy nechaly 15 minut na vzduchu oschnout.
3. Dále bylo použito olejové pero (PAP pen), kterým se několikrát řezy obkroužily. Tím vznikla hydrofobní bariéra, která udržovala nanášené roztoky a činidla v místě tkáňových řezů.
4. Sklíčka s řezy se na 5 minut ponořila do PBS.
5. Aby se zabránilo nespecifickým vazbám, byl na vzorky na 30 minut nanesen roztok sušeného odtučněného mléka v PBS (0,5g sušeného odtučněného mléka do 10g ředěného PBS).
6. Sklíčka se opět opláchla v PBS.
7. Blokace avidinu přirozeně přítomného ve tkáních se provedla 15 minutovou inkubací vzorků s roztokem anti-avidinu. (Vector Laboratories; USA).
8. Sklíčka se vzorky se opět opláchla v PBS na 2x5 minut.
9. V tomto kroku se blokoval tentokrát biotin, který je také přirozeně přítomný ve tkáni. Vzorky se inkubovaly 15 minut s roztokem anti-biotinu.
10. Vzorky byly opláchnuty v PBS.
11. Na sklíčka se na 1 hodinu nanasla primární protilátka.
12. Následovalo opláchnutí v PBS na 2x5 minut.
13. Na 30 minut se na sklíčka nanasla sekundární protilátka.
14. Zopakoval se krok 4.
15. Sklíčka se ponořila do 3% roztoku H_2O_2 (8 ml H_2O_2 + 70 ml ředěného PBS). Blokovala se peroxidáza přítomná ve tkáni.
16. Dále se postupovalo dle kroku 8.
17. Na vzorky se nanasla roztok ABC (8 μl činidla A + 8 μl činidla B do 400 μl ředěného PBS; Vector Laboratories; USA), který byl připraven po kroku 13. Roztok musel před použitím stát 30 minut.
18. Zopakoval se krok 8.
19. Dále byl přidán roztok diaminobenzidinu – DAB (8 μl DAB do 400 μl buffer; Dako; Dánsko) na 50 vteřin. Umožnil vytvořit hnědé zbarvení.
20. Vzorky se opláchly v PBS a následně v destilované vodě.
21. Následovalo jaderné barvení vzorků pomocí bazického barviva hematoxylinu po dobu 5 vteřin.

22. Proplachování vzorků od přebytečného barviva pod tekoucí vodou z kohoutku 1 minutu.
23. Následovalo opláchnutí řezů v acetonu.
24. Vzorky se projasňovaly a odvodňovaly v aceton-xylenu (10:1, 3 minuty), v aceton-xylenu (1:10, 3 minuty), a v xylenu (3x2 minuty).
25. Na vzorky se pomocí montovacího media Eukitu připevnila krycí sklíčka a vytvořily se trvalé preparáty.
26. Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu byla realizována pomocí digitální kamery Pixelink PL-A642 (Vitana Corp.; Ottawa, Kanada) a softwaru NIS (Laboratory Imaging; Česká republika).

4.4 Statistická analýza

Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro osm myší v každé skupině. Statistická významnost rozdílů ve skupinách se hodnotila t-testem za použití softwaru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., Kalifornie). *P* hodnoty 0, 05 nebo menší byly považovány za statisticky významné.

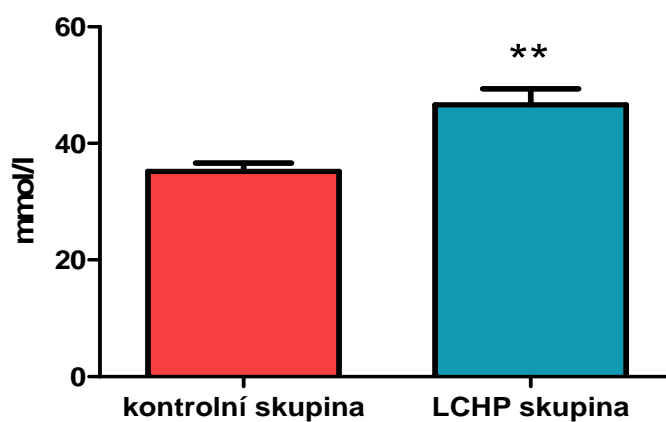
5 VÝSLEDKY

5.1 Biochemická analýza

U všech myší v tomto experimentu byla stanovena hladina cholesterolu. Biochemická analýza odhalila významné zvýšení hladin cholesterolu ve skupině myší krmených LCHP dietou oproti kontrolní skupině. ($35,23 \pm 1,37$ mmol/l vs. $46,61 \pm 2,79$ mmol/l, $p=0,0044$), (viz Graf 1)

Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší

8 týdenní podávání LCHP diety vedlo k signifikantnímu zvýšení hladiny cholesterolu oproti kontrolní skupině ($p=0,0044$)



5.2 Imunohistochemická analýza

5.2.1 Imunohistochemické barvení P-selektinu v arteria brachiocephalica

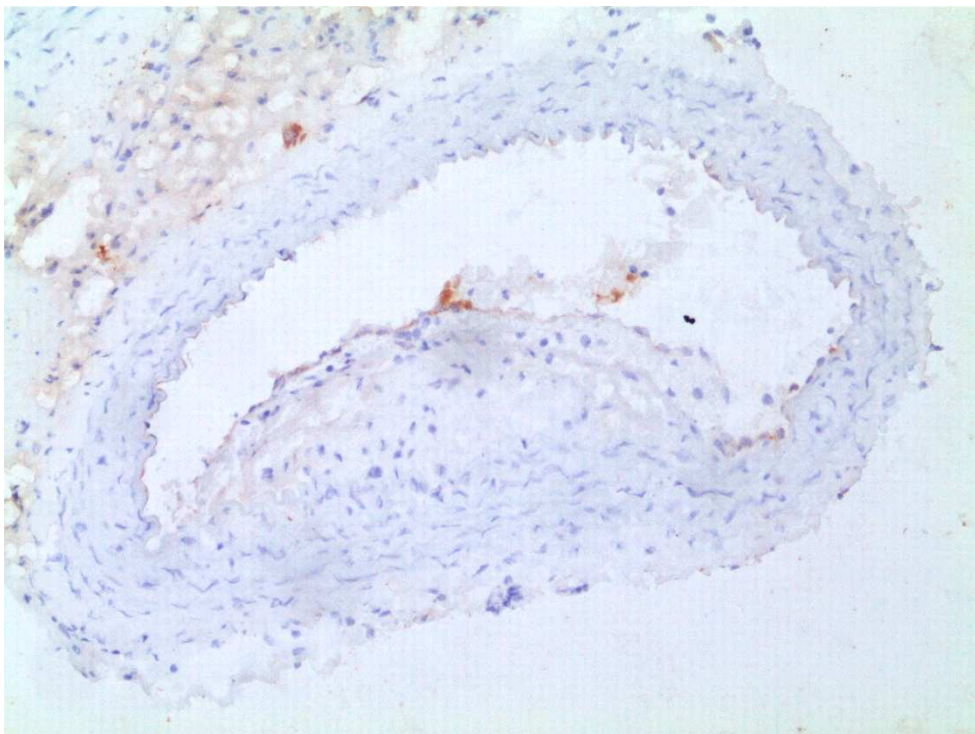
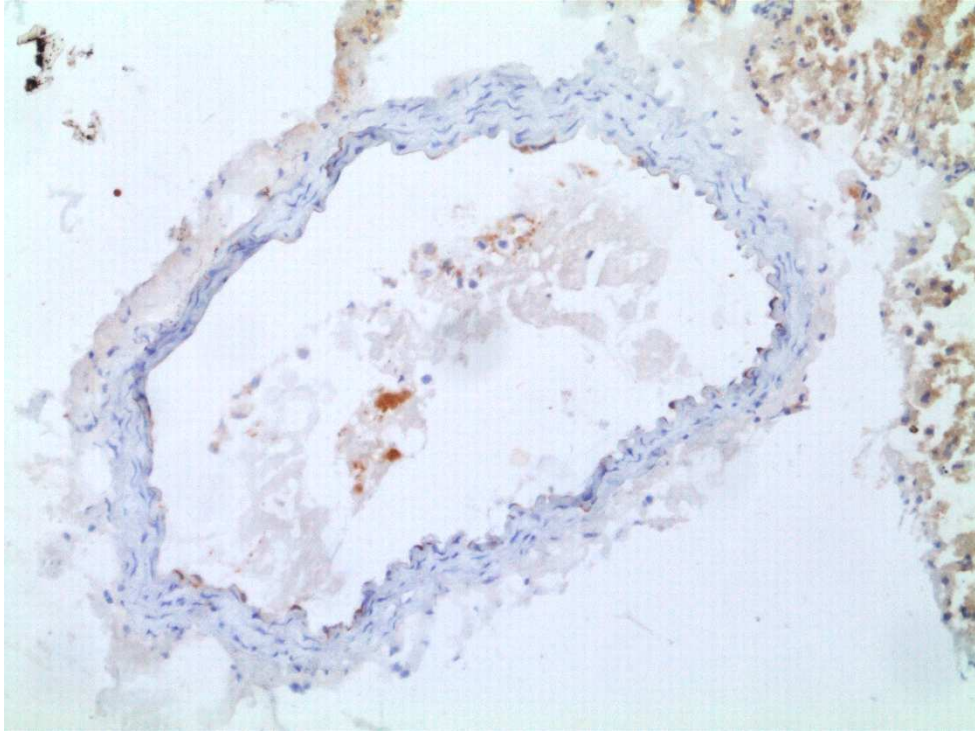
Pro imunohistochemickou analýzu bylo nakrájeno 50 sklíčků. Pro barvení P-selektinu bylo vybráno 5 řezů z každé skupiny, přičemž v každé skupině bylo 6 myší. Obecně lze říct, že exprese P-selektinu byla pozorována pouze na cévním endotelu u všech sledovaných myší. Ve skupině, která byla krmena standardní dietou, jsme pozorovali sklíčka, kde nebyly přítomny aterosklerotické pláty. Zde byla exprese P-selektinu velmi slabá a pouze na cévním endotelu (obr. 6). U cév, kde byly pláty, jsme pozorovali intenzivnější expresi na cévním endotelu plátu i na endotelu mimo pláty (obr. 6).

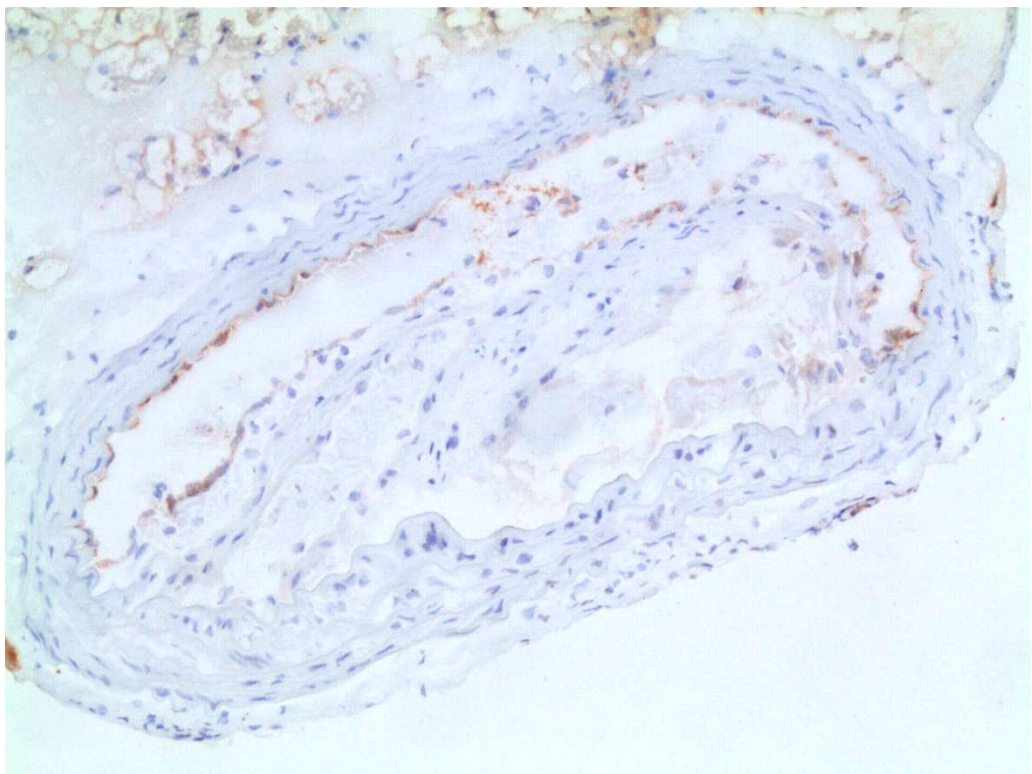
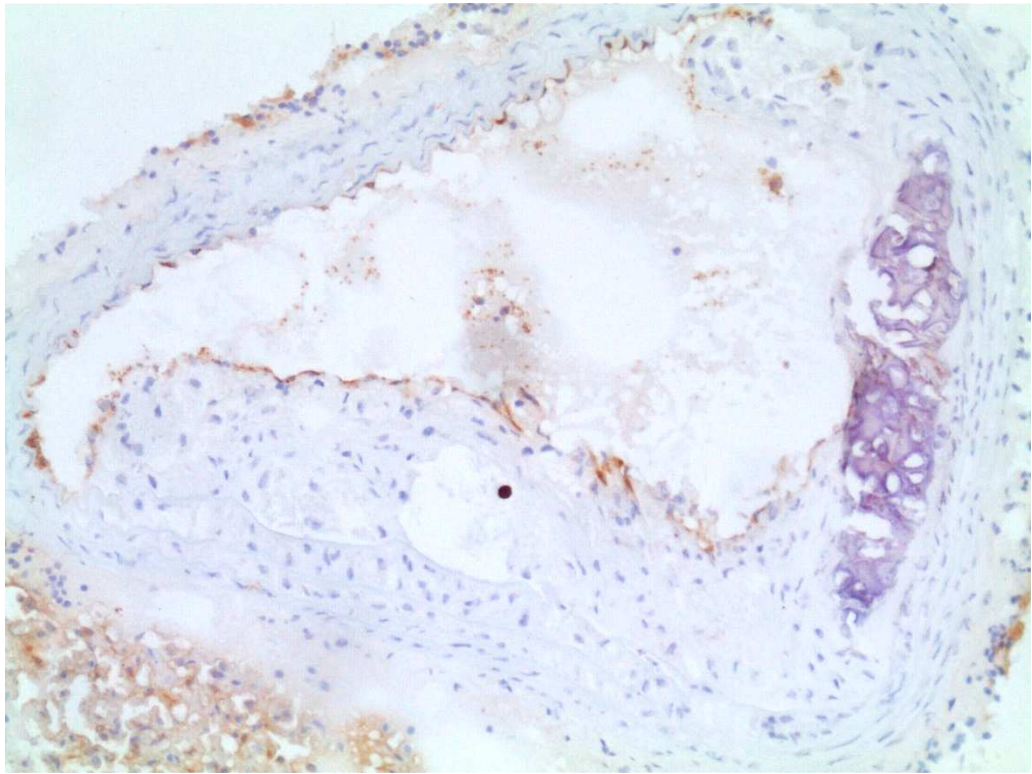
Podobnou expresi P-selektinu jsme pozorovali také u skupiny myší krmených LCHP dietou. Zde jsme pozorovali aterosklerotické pláty téměř u všech myší ve skupině, což tedy poukazuje na to, že velikost plátů byla zvětšena po LCHP dietě. Nicméně i zde byla exprese P-selektinu pozorována pouze na cévním endotelu na povrchu plátů a na intaktním endotelu (kde nebyly pláty). (obr. 7)

Pozorováním všech 30 sklíčků jsme usoudili, že exprese P-selektinu je téměř stejná (ve smyslu plocha a intenzita barvení) pokud srovnáme myši krmené standardní dietou a myši krmené LCHP dietou, i když se zdá, že exprese P-selektinu byla na povrchu plátu u LCHP myší snížena. Touto metodikou ovšem nejsme schopni potvrdit signifikantní rozdíly mezi oběma skupinami.

Obrázek 6: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení P-selektinu u kontrolní skupiny zvířat.

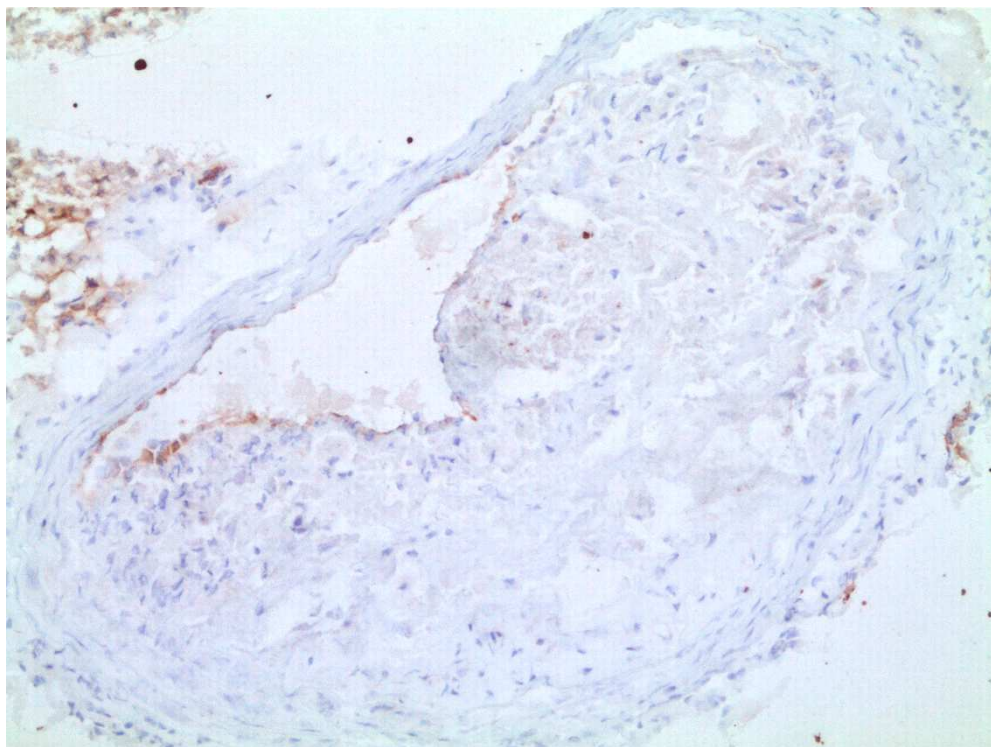
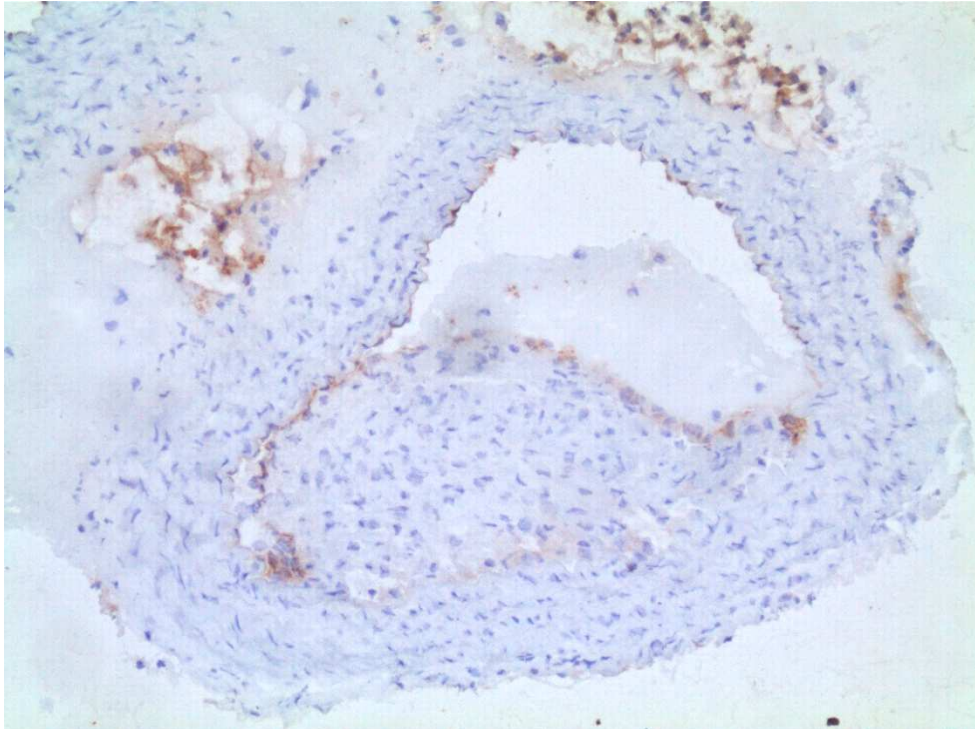
Slabá exprese P-selektinu na cévním endotelu je viditelná jako hnědá barva. Silnější exprese je viditelná na povrchu plátů. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

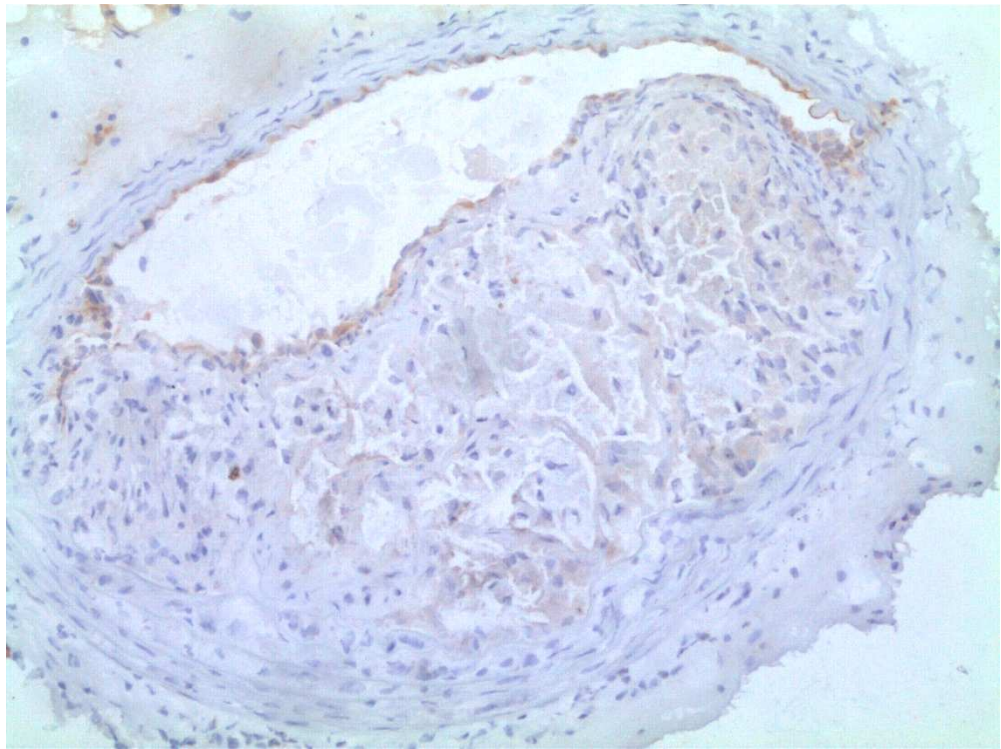
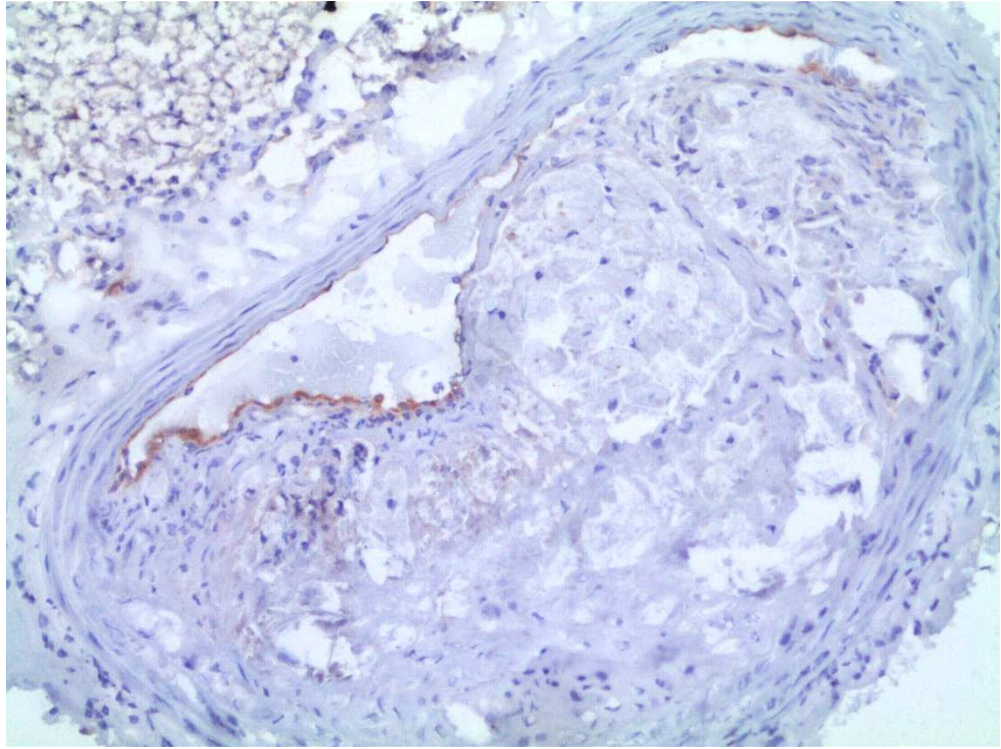




Obrázek 7: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení P-selektinu u LCHP skupiny zvířat.

Podobná intenzita a lokalizace exprese P-selektinu jako u kontrolní skupiny. Exprese je viditelná opět na endotelu na povrchu a plátnu a také na endotelu mimo plátnu. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.





6 DISKUSE

V této diplomové práci jsme se zaměřili na pozorování exprese P-selektinu v arteria brachiocephalica u apoE/LDL-receptor deficientních myší krmených standardní stravou (AIN-93G) a stravou s nízkým obsahem cukrů a vysokým obsahem proteinů (LCHP - low-carbohydrate, high-protein). (85)

P-selektin patří do rodiny selektinů, což jsou adhezní molekuly. Je exprimován aktivovaným endotelem a krevními destičkami. (85) Váže monocyty, neutrofile, lymfocyty a krevní destičky a umožňuje zprostředkovat první krok (rolling) při přestupu leukocytů přes endotel. P-selektin je umístěn v membránách α -granul krevních destiček a ve Weibel-Paladeho tělískách v buňkách endotelu. Při stimulaci je P-selektin rychle uvolněn na povrch buňky, kde zprostředkuje adhezi na sacharidové ligandy leukocytů. (86)

Pro studium aterosklerózy se s výhodou používají myší modely. Můžou se u nich vyvíjet různé druhy aterosklerotických plátů od pěnových buněk až k pokročilým lézím s lipidovým jádrem a fibrózním krytem v krátkém časovém období a dají se využít pro genové manipulace. (57) V této práci byl použit geneticky upravený kmen myší, které mají vyřazený jak gen pro apolipoprotein E, tak pro LDL receptor. Jsou tedy náchylnější k ateroskleróze a pláty se u nich tvoří rychleji, než kdyby měly vyřazen jen jeden gen. (74)

P-selektin byl objeven na povrchu endotelu ve všech fázích vývoje aterosklerotických lézí u lidí i u zvířecích modelů aterosklerózy. Jeho exprese byla studována hlavně v aortě a krčních tepnách, ale ne v menších větvích, jako je například arteria brachiocephalica. (87) Předchozí studie ukázaly expresi P-selektinu pouze na cévním endotelu. To odpovídá výsledkům této diplomové práce. Exprese P-selektinu byla také pozorována v endotelu arteria brachiocephalica. Exprese byla viditelná jak na endotelu bez plátů, tak na povrchu aterosklerotických lézí. Tyto výsledky potvrzují, že exprese P-selektinu je podobná v arteria brachiocephalica, v aortě i v krční tepně. (88)

V další části této práce jsme se zaměřili na expresi P-selektinu po LCHP dietě. Strava s nízkým obsahem cukrů a vysokým obsahem proteinů je v současné době velmi populární jako prostředek pro hubnutí. (88) Tato strava obsahuje srovnatelné množství tuků, cholesterolu a kalorií jako „západní“ strava (obsahuje 21% másla). Strava s nízkým obsahem cukrů byla poprvé popsána v 60. letech 19. století Williamem Bantingem, ale tomuto typu diety se v současnosti dostalo velké pozornosti díky tzv.

„New Diet Revolution“ doktora Atkinse. Během počátečního omezení cukrů tělo využívá k získání energie ketózu. Ketony se vylučují močí. Rychlý počáteční úbytek váhy může být výsledkem tohoto diuretického efektu, který může psychicky povzbudit člověka na této dietě. (89) Nové studie naznačují, že takovéto diety můžou mít pozitivní efekt zejména na redukování tělesné hmotnosti a další rizikové faktory pro srdeční onemocnění. Bylo navrženo několik mechanismů objasňujících efekt LCHP stravy na hladinu plazmatických lipidů a aterosklerózu u laboratorních zvířat. (88) Bylo vška také prokázáno, že LCHP dieta může podporovat aterosklerózu zvyšováním hladiny homocysteinu, který je rizikovým faktorem pro aterosklerózu. Nedávno se ukázalo, že LCHP dieta významně zvyšuje rozsah pokročilé aterosklerózy ve kmeni aorty a arteria brachiocephalica u apoE/LDL-receptor deficientních myší. U myší krmených LCHP dietou se vyvinula rozsáhlejší ateroskleróza, než u myší krmených cholesterolovou dietou, i když obě diety obsahovaly stejné množství tuků a cholesterolu. (88)

Protože bylo také dokázáno, že exprese P-selektinu je vyvolaná různými podněty včetně prozánětlivého ox-LDL a jiných aterogenních faktorů, chtěli jsme zhodnotit, jestli LCHP strava ovlivňuje expresi P-selektinu. (90, 91) Po barvení vzorků z myší krmených LCHP dietou bylo vidět, že P-selektin se exprimuje na endotelu, který je na povrchu aterosklerotických plátů stejně jako tomu bylo u kontrolní skupiny. Stejně tak intenzita barvení byla velmi podobná jako u myší s kontrolní dietou. I přes to, že LCHP dieta měla vyvolat větší prozánětlivý efekt, nezaznamenali jsme v této práci žádné změny v expresi P-selektinu po LCHP dietě. Toto však nevylučuje možnost, že LCHP dieta může ovlivňovat jiné adhezní molekuly.

7 ZÁVĚR

Pomocí imunohistochemické analýzy jsme vyhodnotili expresi P-selektinu v arteria brachiocephalica u apoE/LDL-receptor deficientních myší na kontrolní a LCHP dietě.

U myší krměných LCHP dietou prokázala biochemická analýza významné zvýšení hladin cholesterolu oproti myším krměným kontrolní dietou.

Imunohistochemické barvení odhalilo, že P-selektin se exprimuje u všech pozorovaných myší jen na cévním endotelu, intenzivnější zbarvení pak bylo na endotelu aterosklerotických plátů.

Aterosklerotické pláty byly téměř u všech myší v LCHP skupině oproti kontrolní skupině, kde u některých myší pláty chyběly.

Plocha a intenzita barvení se ovšem se mezi skupinami ovšem nelišily, a tudíž lze konstatovat, že exprese P-selektinu je stejná u kontrolní skupiny zvířat tak také u zvířat krměných LCHP dietou.

8 SEZNAM ZKRATEK

NO – oxid dusnatý

PGI₂ – prostacyklin

EDHF – endoteliální hyperpolarizující faktor

LDL – low-density lipoprotein

ICHS – ischemická choroba srdeční

ICHDK – ischemická choroba dolních končetin

CMP – cévní mozková příhoda

TAG – triacylglycerol

VLDL – very low-density lipoprotein

HDL – high-density lipoprotein

IDL – intermediate-density lipoprotein

HDL-C – high-density lipoprotein cholesterol

ISA - intrinsic sympathomimetic activity

LDL₃ - small dense LDL

apoB – apolipoprotein B

apoE – apolipoprotein E

BMI – body mass index

DM – diabetes mellitus

AGE – advance glycation endproducts

VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule 1

ICAM-1 - intercellular adhesion molecule 1

EGF-like domain - epidermálnímu růstovému faktoru podobná doména

SCRs - short consensus repeats

CD - cluster of differentiation

ABC – avidin-biotin komplex

DAB - 3,3'-diaminobenzidin

PBS - phosphate buffered saline

BSA - bovine serum albumin

LCHP - low-carbohydrate, high-protein

SEM – střední chyba průměru

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie: Překlad 3. vydání*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012, s. 211-222. ISBN 978-80-247-3729-4.
- (2) KÜNZEL, Dolf. *Lidský organismus ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., 1990, s. 75, 101. ISBN 80-201-0000-8.
- (3) KEANEY, J. F. Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier, 2000, roč. 21, č. 4-5, s. 104.
- (4) KÜNZEL, Dolf. *Lidský organismus ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., 1990, s. 107-112. ISBN 80-201-0000-8.
- (5) <http://antranik.org/wp-content/uploads/2011/12/blood-vessels-tunica-intima-endothelium-subendothelial-layer-internal-or-external-elastic-membrane-tunica-media-externa-basement-membrane-artery-vein-capillary-bed.jpg?473d22> (cit. 2014-03-05)
- (6) BULTAS J, CÍFKOVÁ R, ČEŠKA R, et al. *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční*. Praha: Galén, 1999, 127 s.
- (7) ČEŠKA R. Cholesterol a ateroskleróza. *Léčba hyperlipidemií*. Praha: Maxdorf 1999, 226 s.
- (8) HANSSON GK, JONASSON L, SEIFERT PS, STEMME S. Imunne mechanisms in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1989, 9, 567–578.
- (9) HROMADOVÁ, D. *Kardiovaskulární onemocnění*. Brno: NEPTUN, 2004, s. 21-25. ISBN 80-902896-8-1.
- (10) CELERMAJER DS. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 1997, 30, 325–333.
- (11) PÍTHA J, ROZTOČIL K, CÍFKOVÁ R, et al. Endoteliální dysfunkce a její hodnocení. *Cor Vasa*. 2001, 43, 452–456.
- (12) GALAJDA P, MOKÁŇ M, et al. *Poruchy hemostázy při diabetes mellitus*. Vrútky: Prokonzult 2001, 255 s.
- (13) MALIK J, MELENOVSKY V, WICHTERLE D. Funkce a dysfunkce endotelu. *Cas Lek Ces*. 2000, 139(7), 197–202.

- (14) RIDKER PM. On evolutionary biology, inflammation, infection, and the causes of atherosclerosis, *Circulation*. 2002, 105, 2–4.
- (15) GREGOR P, WIDIMSKÝ P, et al. *Kardiologie*. Praha: Galén 1999, 595 s.
- (16) COHN JN, WILSON DJ, NEUTEL J, et al. Coadministered amlodipine and atorvastatin produces early improvements in arterial wall compliance in hypertensive patients with dyslipidemia. *Am J Hypertens* 2009, 22, 137–144.
- (17) MALÍK J, MELENOVSKÝ V, WICHTERLE D, et al. Both fenofibrate and atorvastatin improve vascular reactivity in combined hyperlipidaemia (fenofibrate versus atorvastatin trial – FAT). *Cardiovasc Res*. 2001, 52, 290–298.
- (18) stránky WHO <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (cit. 2014-03-19)
- (19) HROMADOVÁ, D. *Kardiovaskulární onemocnění*. Brno: NEPTUN, 2004, s. 13-19. ISBN 80-902896-8-1.
- (20) HROMADOVÁ, D. *Kardiovaskulární onemocnění*. Brno: NEPTUN, 2004, s. 49-96. ISBN 80-902896-8-1.
- (21) COLLINS, R., Peto, R., MacMAHON, S., HERBERT, P., et al. Blood pressure, stroke, coronary heart disease Part II, short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet*. 2000, 335, 827 - 838.
- (22) HAYNES, WG. Hyperhomocysteinemia. Vascular function and atherosclerosis: effect of vitamins. *Cardiovasc. Drugs Ther*. 2002, 16, p. 391-399.
- (23) <http://pfyziolfup.upol.cz/castwiki2/wp-content/uploads/2011/12/5.bmp> (cit. 2014-03-10)
- (24) <http://pfyziolfup.upol.cz/castwiki2/wp-content/uploads/2011/12/6.bmp> (cit. 2014-03-10)
- (25) HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R. *Základy imunologie: 5. vydání*. 5. vyd. Praha: TRITON, 2013, 34, 82-88. ISBN 978-80-7387-713-2.
- (26) <http://www.mpi-muenster.mpg.de/nvz/wilde.shtml> (cit. 2014-03-15)
- (27) USHIYAMA, S., LAUE, T. M., MOORE, K. L., et al. *J. Biol. Chem*. 1993, 268, 15229-15237.
- (28) MOORE, K. L., EATON, S. F., LYONS, D. E., et al. *J. Biol. Chem*. 1994, 269, 22318-22327.

- (29) HENSLEY, P., McDEVITT, P. J., BROOKS, I., et al. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 23949-23958.
- (30) GRAVES, B. J., CROWTHER, R. L., CHANDRAN, C., et al. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature.* 1994, 367, 532-538.
- (31) GALLATIN, W. M., WEISSMAN, I. L., BUTCHER, E. C. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature.* 1983, 304, 30-34.
- (32) TEDDER, T. F., PENTA, A. C., et al. Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J. Immunol.* 1990, 144, 532-540.
- (33) LARSEN, E., PALABRICA, T., SAJER, S., et al. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell.* 1990, 63, 467-474.
- (34) McEVER, R. P. *Curr. Opin. Immunol.* 1994, 6, 75-84.
- (35) HSU-LIN, S. C., BERMAN, C. L., FURIE, B. C., et al. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 9121-9126.
- (36) McEVER, R. P., BECKSTEAD, J. H., MOORE, K. L., et al. GMP-140, a platelet alpha granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 1989, 84, 92-99.
- (37) GEARING, A. J., NEWMAN, W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today.* 1994, 14, 506-512.
- (38) GENG, J. G., BEVILACQUA, M. P., MOORE, K. L., et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature.* 1990, 343, 757-760.
- (39) LARSEN, E., CELI, A., GILBERT, G. E., et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell.* 1989, 59, 305-312.
- (40) PALABRICA, T., LOBB, R., FURIE, B. C., et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992, 359, 848-851.

- (41) CHEN H, Li D., SALDEEN T., MEHTA J. L. Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res.* 2001, 89, 1155–1160.
- (42) GEBUHRER, V., MURPHY, J. F., BORDET, J. C., et al. Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells. *Biochem J.* 1995, 306, 293–298.
- (43) JOHNSON-TIDLEY, R. R., MCGREGOR, J. L., TAYLOR P. R., POSTON R. N. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994, 144, 952–961.
- (44) SAKAI, A., KUME, N., NISHI, E., et al. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997, 17, 310–316.
- (45) RAMOS, C. L., HUO, Y., JUNG, U., et al. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res.* 1999, 84, 1237–1244.
- (46) JOHNSON, R. C., CHAPMAN, S. M., DONG, Z.M., et al. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest.* 1997, 99, 1037–1043.
- (47) BURGER, P. C., WAGNER, D. D. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood.* 2003, 101, 2661–2666.
- (48) HRACHOVINOVA, I., CAMBIEN, B., HAFEZI-MOGHADAM, A., et al. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med.* 2003, 9, 1020–1025.
- (49) WOOLLARD, K. J., KLING, D., KULKARNI, S., et al. Raised plasma soluble P-selectin in peripheral arterial occlusive disease enhances leukocyte adhesion. *Circ Res.* 2006, 98, 149–156.
- (50) ANDRE, P., HARTWELL, D., HRACHOVINOVA, I., et al. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2000, 97, 13835–13840.
- (51) HUO, Y., SCHOBER, A., FORLOW, S. B., et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003, 9, 61–67.

- (52) MAFFIA, P., ZINSELMAYER, B. H., IALENTI, A., et al. Images in cardiovascular medicine. Multiphoton microscopy for 3-dimensional imaging of lymphocyte recruitment into apolipoprotein-E-deficient mouse carotid artery. *Circulation*. 2007, 115, 326 – e328.
- (53) GALKINA, E., LEY, K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, 27, 2292-2301.
- (54) BritishHeart Foundation, “BritishHeart Foundation Statistics Website,” 2008, <http://www.heartstats.org>.
- (55) KONSTANTINOV, I. E., MEJEVOI, N., and ANICHKOV, N. M. Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. *Texas Heart Institute Journal*. 2006, vol. 33, no. 4, pp. 417–423.
- (56) KRITCHEVSKY, D. Lipids and human health. Atherosclerosis and cholesterol. *Journal of Dairy Science*. 1967, vol. 50, no. 5, pp. 776–781.
- (57) KRISTENSEN, S. D., RAVN, H. B., FALK, E. Insights into the pathophysiology of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1997, 80, 5–9.
- (58) WATERSON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002, 420, 520-562.
- (59) ZHANG, S. H., REDDICK, R. L., PIEDRAHITA, J. A., MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992, 258, 468-471.
- (60) VIRMANI, R., KOLODGIE, F. D., BURKE, A. P., et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000, 20, 1262–75.
- (61) 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, 181–90.
- (62) PAIGEN, B., HOLMES, P. A., MITCHELL, D., et al. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis*. 1987, 64, 215–21.

- (63) LINTON, M. F., FARESE, R. V., CHIESA, G, et al. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein_a. *J Clin Invest.* 1993, 92, 3029–37.
- (64) GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1974, 249, 5153–62.
- (65) NISHINA, P. M., VERSTUYFT, J., PAIGEN, B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res.* 1990, 31, 859–69.
- (66) ISHIBASHI, S., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S., et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low-density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 1994, 93, 1885–93.
- (67) PIEDRAHITA, J. A., ZHANG, S. H., HAGMAN, J. R., et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein-E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89, 4471–5.
- (68) PLUMP, A. S., SMITH, J. D., HAYEK, T., et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992, 71, 343–53.
- (69) VAN REE, J. H., VAN DEN BROEK, W. J. A. A., DAHLMANS, V. E. H., et al. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 1994, 111, 25–37.
- (70) ROSENFELD, M. E., POLINSKY, P., VIRMANI, R., et al. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000, 20, 2587–92.
- (71) NAKASHIMA, Y., PLUMP, A. S., RAINES, E. W., et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994, 14, 133–40.
- (72) REDDICK, R. L., ZHANG, S. H., MAEDA, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb.* 1994, 14, 141–7.
- (73) BEISIEGEL, U., WEBER, W., IHRKE, G., HERZ, J., et al. The LDLreceptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature.* 1989, 341, 162–4.

- (74) SANAN, D. A., NEWLAND, D. L., TAO, R., et al. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95, 4544–9.
- (75) CALIGIURI, G., LEVY, B., PERNOW, J., et al. Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96, 6920–4.
- (76) MULLER, J. E., ABELA, G. S., NESTO, R. W., et al. Triggers, acute risk factors and vulnerable plaques: the lexicon of a new frontier. *J Am Coll Cardiol*. 1994, 809–13.
- (77) ROSENFELD, M. E., POLINSKY, P., VIRMANI, R., et al. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000, vol. 20, no. 12, pp. 2587–2592.
- (78) JOHNSON, J. L., JACKSON, C. L. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis*. 2001, vol. 154, no. 2, pp. 399–406.
- (79) JACKSON, C. L. Is there life after plaque rupture? *Biochemical Society Transactions*. 2007, vol. 35, no. 5, pp. 887–889.
- (80) JACKSON, C. L., BENNETT, M. R., BIESSEN, E. A., et al. Assessment of unstable atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, vol. 27, no. 4, pp. 714–720.
- (81) BOND, A. R., JACKSON, CH. L. The Fat-Fed Apolipoprotein E Knockout Mouse Brachiocephalic Artery in the Study of Atherosclerotic Plaque Rupture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011, vol. 2011, p. 10.
- (82) BERANOVÁ, M., TONAR, Z. *Principy a příklady imunohistochemie*. 2002, s. 4-16.
- (83) MAŇÁKOVÁ, E., SEICHERTOVÁ, A. *Metody v histologii*. Praha: Karolinum, 2002, s. 27-35. ISBN 80-246-0230-X.
- (84) http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/images/b/b9/Abc_method.gif (cit. 2014-03-18)
- (85) BLANN, A. D., NADAR, S. K., LIP, G. Y. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2003, 24, 2166-2179.

- (86) DONG, Z. M., CHAPMAN, S. M., BROWN, A. A., et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998, 102, 145-152.
- (87) JOHNSON-TIDEY, R. R., MCGREGOR, J. L., TAYLOR, P. R., POSTON, R. N. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994, 144, 952-961.
- (88) KOSTOGRYS, R. B., FRANCZYK-ZAROW, M., MASLAK, E., et al. Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR(-/-)). *Atherosclerosis.* 2012, 223, 327-331.
- (89) RANKIN, J. W., TURPYN, A. D. Low carbohydrate, high fat diet increases C-reactive protein during weight loss. *Journal of the American College of Nutrition.* 2007, 26, 163-169.
- (90) MAYADAS, T. N., JOHNSON, R. C., RAYBURN, H., et al. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell.* 1993, 74, 541-554.
- (91) TEDDER, T. F., STEEBER, D. A., CHEN, A., ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J.* 1995, 9, 866-873.