Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Hodnocení exprese a koexprese endoglinu a VCAM-1 v aortě apoE-deficientních myší

Diplomová práce

Lucie Minaříková

Vedoucí práce: Mgr. Jana Rathouská

Cíl práce: Záměrem této práce bylo sledovat expresi a koexpresi endoglinu (TGF-β receptoru III) a molekuly VCAM-1 v endotelu myší aorty. Jako experimentální model jsme použili myší kmen C57BL/6J, který byl geneticky upraven a vyznačoval se deficitem apolipoproteinu E.

Metody: Při studii jsme se zaměřili na testování myšího kmene C57BL/6J s knockoutovaným genem pro apolipoprotein E v různých fázích aterosklerotického procesu. Deset týdnů staré myší samice byly rozděleny do tří skupin a krmeny dietami s různým obsahem cholesterolu. Jedna experimentální skupina byla krmena standardní dietou pro hlodavce (tzv. „chow type diet“) po dobu dvou měsíců. Zbylé dvě skupiny byly krmeny dietou s obsahem 21 % tuku (tzv. „Western type diet“) po dobu dvou a čtyř měsíců. Pro zjištění hladin celkového cholesterolu byla provedena biochemická analýza krve. Získané vzorky vzestupné části aorty byly analyzovány imunohistochemickou metodou ImmPRESS™ s detekčním činidlem DAB. Sledovanými markery byly endoglin (ENG) a VCAM-1.

Výsledky: Biochemická analýza prokázala hodnoty cholesterolu při standardní laboratorní dietě pohybující se okolo 10mmol/l. V této skupině také nebyly pozorovány žádné aterosklerotické pláty v oblasti ascendentní aorty. Naopak vyšších hladin cholesterolu (a tvorby plátů) bylo dosaženo při užití diety západního typu („Western type diet“) po dobu dvou měsíců, kdy se hladiny lipidů v krvi pohybovaly okolo 30mmol/l. Množství cholesterolu při „Western type diet“ trvající čtyři měsíce dosáhlo hodnot v průměru 25mmol/l (bez signifikantního rozdílu vzhledem ke skupině předchozí) a byla opět patrná tvorba plátů.

Pomocí imunohistochemických metod jsme sledovali expresi endoglinu a VCAM-1 v aterosklerotických lézích ascendentní části aorty. Exprese endoglinu byla detekována výhradně na endotelu cévy. Obecně platí výskyt VCAM-1 uvnitř aterosklerotických lezí a v

médii neaterosklerotických cév. Exprese VCAM-1 byla detekována v endotelu aorty u myší na chow dietě (bez plátů). Molekula endoglinu u této skupiny na endotelu nebyla detekována, což znamená žádnou koexpresi těchto proteinů u myší na chow dietě. Pozitivita endoglinu již byla zjištěna u myší na „Western dietě“ po dobu 2 měsíců (Western 2M), a to výhradně na endotelu pokrývajícím aterosklerotický plát. Pozitivita na VCAM-1 byla v této skupině prokázána uvnitř aterosklerotických lézí a v oblastech endotelu bez aterosklerotických plátů. Žádná výrazná kolokalizace endoglinu a VCAM-1 u skupiny Western 2M nebyla prokázána. Obdobná pozorování byla zaznamenána v aortě myší vystavených Western dietě po dobu 4 měsíců (Western 4M). Endoglin byl lokalizován pouze na endotelu aterosklerotických plátů bez významné koexprese s VCAM-1.

Závěr: Výsledky prezentované v této diplomové práci dokládají vliv diet s vysokým obsahem lipidů na zvýšení hladin lipoproteinů v krvi a progresi aterosklerotických lézí v ascendentní aortě apoE-deficientního modelu myší. Exprese endoglinu se objevila zejména na endotelu aterosklerotických plátů. Je tedy zřejmé, že exprese endoglinu je stimulována vyššími hladinami cholesterolu. Dalším výsledkem práce je patrně neprobíhající koexprese molekuly endoglinu a VCAM-1 v průběhu aterogeneze. Je tedy pravděpodobné, že ENG se nepodílí na aktivaci endotelu společně s adhezními molekulami, které jsou rozhodující pro vznik zánětu a tím pádem aterogeneze u apoE-deficientních myší. Adhezní molekula VCAM-1 byla detekována i na endotelu nepostiženého aterosklerózou a představuje marker poškozující výstelku cév.