

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Barbora Matějková

Sledování exprese adhezních molekul v aortě u myšního
modelu nealkoholické steatohepatitidy

The Evaluation of Cell Adhesion Molecules Expression in Mice Aorta in
Animal Model of Non-alcoholic Steatohepatitis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D

Hradec Králové 2019

Prohlášení

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

Dne:

Podpis

Poděkování

Děkuji prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D za odborné vedení, velmi vstřícný přístup, cenné rady a čas věnovaný během přípravy a kompletace této diplomové práce. Další díky patří paním laborantkám Pavlíně Lukešové a Renátě Zdanovcové za pečlivé proškolení v rámci imunohistochemických metod a za trpělivou pomoc při práci na experimentální části práce. Poděkovat chci i zaměstnancům Katedry biologických a lékařských věd FaF UK za vytvoření příjemné a profesionální atmosféry během studia. Poděkování patří i mé rodině a blízkým za oporu a shovívavost.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Školitel: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D

Kandidát: Barbora Matějková

Název diplomové práce:

Sledování exprese adhezních molekul v aortě u myšního modelu nealkoholické steatohepatitidy

Cíl práce:

Záměrem této práce bylo sledovat změny v expresi ICAM-1 a VCAM-1 na endotelu aorty myší kmene C57BL/6. Ve studii jsou srovnávány výsledky skupiny myší krmené NASH indukující dietou a kontrolní skupiny krmené běžnou dietou.

Metoda:

Pro experiment byly použity dvě skupiny myší kmene C57BL/6. V deseti týdnech věku byla experimentální skupina myší převedena na NASH indukující dietu obsahující 40 % kalorií pocházejících z tuku a 0,2 % z cholesterolu, která byla dále doplněna o glukózu a fruktózu přidávanou do vody k pití v koncentraci 42 g/l (tzv. „FFC-type diet“ – high saturated fat, high saturated fructose, high saturated cholesterol). Dieta trvala po dobu 25 týdnů. Kontrolní skupina byla krmena standardním krmivem pro hlodavce (tzv. „chow-type diet“). Získané vzorky byly analyzovány imunohistochemickými metodami. Pro ICAM-1 byla použita nepřímá trojstupňová metoda avidin-biotin komplexu. Molekuly VCAM-1 byly detekovány metodou ImmPressTM. Hladiny celkového cholesterolu byly získány biochemickou analýzou krve.

Výsledky:

Imunohistochemické metody poskytly dobře patrnou expresi molekul ICAM-1 i VCAM-1 na endotelu aorty. Ačkoli výsledky biochemické analýzy krve ukázaly značný nárůst hladin celkového cholesterolu u skupiny krmené NASH indukující dietou, detekce molekul ICAM-1 byla při srovnání experimentální a kontrolní skupiny bez významných změn. Ani analýza vzorků s označenými VCAM-1 molekulami neukázala signifikantní rozdíly v expresi.

Závěr:

Přestože nastavení diety s obsahem 40 % kalorií z tuku a 0,2 % z cholesterolu doplněné glukózou a fruktózou rozpuštěnou ve vodě k pití v koncentraci 42 g/l způsobilo nárůst celkových hladin krevních lipoproteinů, tato dieta neukázala při trvání 25 týdnů změny endoteliální exprese adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1. Dle výsledků této práce lze soudit, že použití myšního kmene C57BL/6 a aplikace výše zmíněné diety v tomto časovém rozvrhu nevedou ke změnám endotelu detekovatelným imunohistochemickými metodami.

Klíčová slova: endotel, ICAM-1, VCAM-1, imunohistochemie

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Consultant: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Candidate: Barbora Matějková

Title of Thesis:

Evaluation of Cell Adhesion Molecules Expression in Mice Aorta in Animal Model of Non-alcoholic Steatohepatitis

Background:

The purpose of the thesis was to observe changes in the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in mice aorta endothelium. The study compares results of a group of mice after the administration of a NASH inducing diet and a group of mice fed by a chow diet.

Method:

Two groups of C57BL/6 mice were used for this experiment. At the age of ten weeks the experimental group was transferred to a NASH inducing diet which contains 40 % of calories from fat and 0.2 % from cholesterol. In addition to this diet, the experimental group was fed by fructose and glucose dissolved in drinking water with the concentration of 42 g/l (called “FFC-type diet” – high saturated fat, high saturated fructose, high saturated cholesterol). This diet lasted for 25 weeks. The control group was fed by a standard diet for rodents (called “chow-type diet”). The obtained samples were analysed by immunohistochemical methods. For ICAM-1, the indirect three-step avidin-biotin complex method was used. VCAM-1 molecules were detected by the ImmPressTM method. Total blood cholesterol level was determined by a biochemical analysis.

Results:

Immunohistochemical methods provided a well evident ICAM-1 and VCAM-1 endothelial expression in aorta. Although a biochemical analysis demonstrated an important increase in total blood cholesterol level in the group of mice fed by a NASH inducing diet, when comparing the detection of ICAM-1 molecules, no significant differences between the experimental and the control group were found. The analysis of samples with marked VCAM-1 molecules also did not reveal any obvious changes in the expression.

Conclusion:

In spite of the fact that the administration of a diet containing 40 % calories from fat and 0.2 % from cholesterol supplemented by glucose and fructose dissolved in drinking water with the concentration of 42 g/l caused an elevation of total blood lipoproteins, this type of diet lasting for 25 weeks did not demonstrate any significant differences in an endothelial expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. Based on the results of this study, it is possible to conclude that using C57BL/6 mice and the application of a described diet in this time course do not lead to endothelial changes detectable by immunohistochemical methods.

Key words: endothelium, ICAM-1, VCAM-1, immunohistochemistry

Obsah

ÚVOD	10
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1. Histologie cév	11
1.2. Obecná struktura cév	11
1.3. Specifická struktura cév	14
1.3.1. Artérie	14
1.3.2. Vény.....	16
1.3.3. Kapiláry.....	17
1.4. Endotel a jeho fyziologická funkce	20
1.5. Endotelová dysfunkce.....	23
1.6. Adhezní molekuly.....	26
1.6.1. Integriny	27
1.6.2. Kadheriny	28
1.6.3. Selektiny.....	28
1.6.4. Adhezní proteiny podobné imunoglobulinům.....	28
1.6.4.1. ICAM-1	30
1.6.4.2. VCAM-1	32
1.7. Nealkoholická steatohepatitida (NASH).....	35
1.7.1. Příčiny NASH.....	35
1.7.2. Patofyziologie NASH.....	36
1.7.3. Klinické důsledky NASH.....	38
1.8. Myší modely aterosklerózy	40
1.8.1. Experimentální diety myších modelů	40
1.8.1.1. Diety indukující aterosklerózu	40
1.8.1.2. Diety indukující NASH nebo poškození jater.....	42
1.9. Imunohistochemické metody	46

1.9.1.	Protilátky	46
1.9.2.	Přímá a nepřímá imunohistochemie	46
1.9.3.	EnVision® metodika	48
1.9.4.	ImmPress™ metodika.....	49
1.9.5.	ABC (Avidin-Biotin Complex) metodika.....	49
2.	CÍL PRÁCE.....	51
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
3.1.	Použité myší modely.....	52
3.2.	Příprava vzorků	53
3.3.	Použité metody	54
3.3.1.	Imunohistochemie.....	54
3.3.1.1.	Pracovní postup – ICAM-1 (ABC metoda)	55
3.3.1.2.	Pracovní postup – VCAM-1(ImmPress™ metoda).....	58
3.3.2.	Biochemická analýza krevních vzorků myší C57BL/6	61
4.	VÝSLEDKY	62
4.1.	Imunohistochemie ICAM-1	62
4.2.	Imunohistochemie VCAM-1.....	67
4.3.	Biochemická analýza	72
5.	DISKUSE	73
6.	ZÁVĚR	76
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	77
8.	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	79
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	81

ÚVOD

Zdaleka nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích Evropy a Severní Ameriky je ateroskleróza. Má na svědomí více než 50 % úmrtí. Podobné statistické výsledky platí i pro Českou republiku. [1]

Ateroskleróza patří mezi kardiovaskulární onemocnění, konkrétně onemocnění tepen, ve kterých způsobuje vznik vazivových plátů ve vnitřní vrstvě cévní stěny zvané tunica intima. Název plyne z vnitřního obsahu těchto plátů, který je hojně prostoupen tukovými buňkami a tvoří kašovitou hmotu. Z řeckého slova athera = kaše vzniklo pojmenování ateroskleróza. [3]

Mezi nejvýznamnější důsledky manifestované aterosklerózy patří ischemická choroba srdeční, akutní infarkt myokardu, angina pectoris, cévní mozková příhoda nebo postižení cév zásobujících jiné orgány a jejich následná ischemie (např. ledviny, dolní končetiny). Právě tyto důsledky často bývají prvními klinickými projevy již rozvinuté aterosklerózy, jelikož v počátcích se ateroskleróza sama o sobě nemusí projevit.

Zásadním pro případný rozvoj aterosklerózy je stav endotelu. Za fyziologických podmínek endotel produkuje antitrombogenní a vazodilatační mediátory a udržuje je v rovnováze s lokálními vazokonstrikčními a prokoagulačními působky. Endotel dále exprimuje specifické adhezní molekuly a tvoří bariéru pro vstup složek krevní plasmy do cévní stěny. Rozvoj endotelové dysfunkce může být způsoben širokou škálou faktorů, z nichž některé jsou ovlivnitelné a jiné nikoli.

Právě mediátory, které endotel exprimuje, je možno použít ke zhodnocení jeho stavu. Pro tuto práci byly ke stanovení vybrány adhezní molekuly ICAM-1 (intracelulární adhezní molekula-1) a VCAM-1 (vaskulární adhezní molekula 1). Oba markery se účastní iniciační fáze zánětlivých procesů v endotelu a za fyziologického stavu exprimovány nejsou.

Stanovení adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 bylo provedeno v aortách myší kmene C57BL/6 imunohistochemickými metodami. Ve studii jsou porovnány výsledky experimentální skupiny krmené NASH indukující dietou a kontrolní skupiny krmené standardní dietou.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Histologie cév

Cévní stěna se skládá ze tří vrstev. Vnitřní se nazývá tunica intima (interna), střední je tunica media a vnější je pojmenována tunica adventitia (externa). Dle typu cévy se liší vzájemný poměr jednotlivých složek, tloušťka cévní stěny i velikost lumen. Cévy je možno dělit na krevní a lymfatické. Mezi krevní cévy řadíme tepny (arterie), žíly (vény) a kapiláry [4].

1.2. Obecná struktura cév

Tunica intima

Tunica intima se nachází na vnitřní straně cévní stěny. Lumen cévy je pokryté jednou vrstvou endotelových buněk protáhlých ve směru cévní osy, které přímo nasedají na bazální membránu a subendotelovou vrstvu. Subendotelová vrstva je složena z kolagenních vláken a elastických blanek. Dále může obsahovat i hladké svalové buňky.

V případě muskulárních arterií nalézáme ještě elastickou blanku zvanou membrana elastica interna, která tvoří hranici mezi vrstvami tunica intima a tunica media. Tato membrána je fenestrovaná, aby byl zajištěn průchod živin do dalších vrstev stěny [2, 4, 5].

Tunica media

Střední vrstvou cévní stěny je tunica media. Největší zastoupení v této vrstvě mají hladké svalové buňky, které umožňují konstriktci a dilataci cévy. Jsou uspořádané spirálovitě koncentricky a mohou být uloženy až ve čtyřiceti vrstvách nad sebou. Buňky hladké svaloviny mají vřetenovitý tvar a jsou jednojaderné. V tunice medii produkují mezibuněčnou hmotu bohatou na proteoglykany a elastická vlákna.

Elastická vlákna se mohou spojovat a tvořit opět koncentricky uložené fenestrované elastické blanky prostupující hladkou svalovinu.

U muskulárních arterií můžeme dále pozorovat fenestrovanou elastickou blanku tvořící hranici mezi vrstvami tunica media a tunica adventitia. Nazývá se membrana elastica externa.

Arterie elastického typu obsahují hladkou svalovinu tak hojně prostoupenou elastickými blankami, že se membrány oddělující jednotlivé vrstvy cévní stěny nerozlišují [2, 4, 5].

Tunica adventitia

Svrchní vrstvu cévní stěny tvoří kolagenní vazivo. Kolagenní a elastická vlákna jsou na rozdíl od uspořádání tuniky medie uspořádána longitudinálně. Dále jsou přítomné fibroblasty a adipocyty, u větších cév je možné pozorovat menší množství buněk hladké svaloviny. Na povrchu tunica adventitia volně přechází ve vazivo, jež cévu pružně fixuje k okolní tkáni.

Jedná-li se o cévy s průměrem větším než 1 mm, je zásobení cévní stěny živinami a kyslíkem pouhou difuzí z lumen vlastní cévy nedostatečné. Takové cévy mají vytvořenou síť vlastních cév, která pochází buďto z cévy samotné, případně sousední, a je pojmenována vasa vasorum (cévy cév). Tyto cévy jsou uloženy podélně a vyživují zejména tuniku adventicii, případně také vnější vrstvy tuniky medie. Z důvodu nižší koncentrace kyslíku je možné je pozorovat častěji ve stěnách vén.

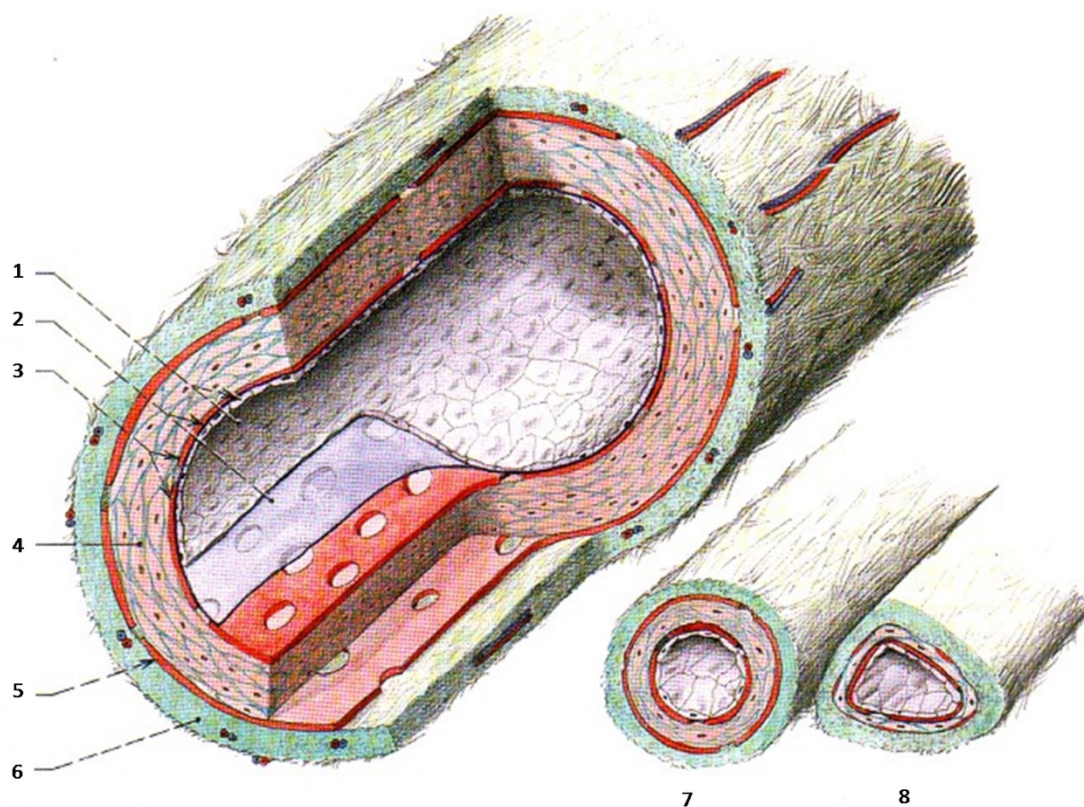
Tunika adventicia je dále místem počátku lymfatické kapilární sítě. U vén je někdy možné pozorovat lymfatické cévy již v tunice medii.

Autonomní nervová síť je uložena v tunice adventicii a inervuje hladkou svalovinu tuniky medie, čímž reguluje napětí cévní stěny. Pro arterie platí, že nervové pleteně neprobíhají až do tuniky medie, mediátor noradrenalin musí pro dosažení hladké svaloviny několik mikrometrů difundovat. Ve stěně vén nervová zakončení dosahují až do tuniky medie, jejich počet je však v porovnání s arteriemi menší [2, 4, 5].

Obrázek 1. Schéma obecné stavby cévní stěny, převzato, upraveno [2]

1. endotel, 2. bazální membrána a subendotelová vrstva vaziva, 3. membrana elastica interna, 4. hladká svalovina, 5. membrana elastica externa, 6. vazivo tuniky adventicie

7. a 8. – znázornění proporcí jednotlivých vrstev stěny u tepny (7.) a u přibližně stejně silné žíly (8.)



1.3. Specifická struktura cév

Cévy dělíme na lymfatické a krevní. V rámci krevních cév dále rozlišujeme arterie, vény a kapiláry.

1.3.1. Artérie

Arterie jsou cévy vedoucí krev od srdce. V porovnání s vénami mají silnější cévní stěnu a užší vnitřní průsvit. Dle kalibru a histologické stavby popisujeme arterie velké (elastického typu), střední a malé (muskulárního typu) a arterioly [3, 5].

Arterie elastického typu

Mezi arterie elastického typu patří aorta a začátky jejích hlavních větví a truncus pulmonalis.

Histologická stavba elastických arterií je uzpůsobena pro vyrovnávání pulzních pohybů srdce a zajištění kontinuálního průtoku krve.

Tunica intima obsahuje endotel a silnou subendotelovou vrstvu. Intimou prochází množství longitudinálně orientovaných vazivových vláken. Obsahuje i buňky hladké svaloviny.

Nejsilnější vrstva cévní stěny – tunica media – je hojně prostoupena fenestrovanými elastickými blankami (membranae fenestrae). Membrana elastica interna a externa nejsou rozlišovány. Koncentricky situované membranae fenestrae jsou uloženy ve tkáni složené z množství hladkých svalových buněk, vazivové tkáně bohaté na proteoglykany a kolagenních vláken.

Jelikož se jedná velké arterie, tunika adventicia tvořená zejména podélně orientovanými vazivovými vlákny je protkána sítí cév (vasa vasorum) a nervů (nervi vasorum).

V závislosti na věku se elasticita cévní stěny postupně ztrácí, naopak vazivová složka nabývá. Cévy se postupně zvětšují do šířky i do délky [3, 4, 6, 7].

Arterie muskulárního typu

Do kategorie arterií svalového typu spadá většina tepen periferního oběhu. Jednotlivé vrstvy cévní stěny jsou dobře patrné.

Tunica intima je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk a subendotelovou vrstvou řídkého kolagenního vaziva. Zejména v místech větvení arterií můžeme pozorovat hladké svalové buňky s podélnou orientací. Tuniku intimu je od tuniky medie odděluje fenestrovaná elastická blanka – membrana elastica interna. Z důvodu kontrakce je membrana elastica interna společně s tunikou intimou na preparátech pozorována jako zvlněná.

Střední vrstva – tunica media – je zároveň nejsilnější složkou cévní stěny. Sestává z mnoha vrstev cirkulárně a spirálovitě uspořádaných buněk hladké svaloviny. V závislosti na kalibru muskulární arterie se počet vrstev hladkých svalových buněk mění. Může jich být až 40. Hladké svalové buňky jsou prostoupeny elastickými vlákny uskupenými do lamel, na jejichž produkci se samy značně podílí.

Hranici mezi tunikou medií a tunikou adventicií tvoří další elastická blanka – membrana elastica externa. Tunica adventitia kotví cévu do okolní tkáně a je složena z hustě nakupených podélných vazivových vláken.

Přítomnost elastických membrán oddělujících jednotlivé vrstvy cévní stěny není u všech muskulárních arterií konstantní. Se zmenšujícími se arteriemi se postupně ztrácí nejprve membrana elastica externa, následně i membrana elastica interna [3, 4, 7].

Arterioly

Mezi arterioly počítáme malé tepénky, jejichž průměr je menší než 0,5 mm. Arterioly přecházejí na jednom konci v muskulární arterie, na straně druhé potom v prekapiláry.

Je možné pozorovat tuniku intimu, která sestává z endotelových buněk a tenké subendotelové vrstvy. U arterioli dále popisujeme tzv. Weibel-Paladeho granula uložená v cytoplazmě endotelových buněk. Tato tělíčka obsahují krevní koagulační faktor VIII (von Willebrandův faktor), který se v případě poranění cévy účastní hemokoagulace.

Membrana elastica interna je pozorovatelná pouze u větších arterioli, u menších je diskontinuální nebo není vůbec patrná.

Tuniku medii tvoří hladké svalové buňky uložené v jedné až pěti vrstvách. V případě nejmenších arterioli může být i tunica media nesouvislá.

Hraniční membrana elastica externa není vytvořena.

Tunica adventitia je vyvinuta pouze jako tenká vazivová vrstvička [3, 8].

1.3.2. Vény

Jako vény jsou označovány cévy vedoucí krev od tkání směrem k srdci. V závislosti na lokalizaci se stavba venózní stěny může lišit. Stěna žil umístěných v končetinách bývá silnější, než stěna žil probíhajících trupem. Dělíme je na velké vény (žilní kmeny), vény středního a malého kalibru a venuly.

Při srovnání vény s arterií podobného kalibru pozorujeme u vény cévní stěnu vždy slabší a vnitřní průsvit větší.

Nejsilnější vrstvou žilní stěny je tunica adventitia. Jednotlivé vrstvy jsou hůře rozeznatelné než v případě arterií [4, 8, 9].

Žilní kmeny

Zpravidla dobře vyvinutou tuniku intimu tvoří endotel a subendotelová vrstva. Dále můžeme pozorovat buňky hladké svaloviny, které jsou podélně orientované.

Tunika media je značně redukována. Jen několik vrstviček koncentrické hladké svaloviny je doplněno silněji zastoupenou vazivovou tkání.

Nejsilnější vrstva stěny – tunika adventicia – je složena z kolagenních vláken. I zde pozorujeme longitudinálně uložené hladké svalové buňky. V případě velkých vén jsou uspořádány do svazků, posilují žilní stěnu a brání jejímu roztažení [4, 8, 9].

Střední a malé vény

Střední a malé vény se vyznačují průměrem v rozmezí 1 – 9 mm.

V rámci tuniky intimy je přítomen endotel nasedající na velmi tenkou vrstvu subendotelového vaziva. Zejména u žil dolních končetin pozorujeme žilní chlopně. Jsou to deriváty tuniky intimy vytvořené řasou endotelu, která je vyztužena elastickým vazivem. Zabraňují zpětnému toku krve vlivem gravitace.

Velmi tenkou tuniku medii tvoří ploché snopce buněk hladkého svalstva, které netvoří kontinuální vrstvu. Mezi nimi probíhají svazky retikulárních a kolagenních vláken.

Tunica adventitia je složena z longitudinálních kolagenních vláken a sítě vláken elastických. Elastická složka je doplněna podélně orientovanými svazky buněk hladké

svaloviny, které jsou také nápomocné při překonávání hydrostatického tlaku sloupce krve v dolní polovině těla [4, 8, 9].

Venuly

Do skupiny venul jsou zařazeny žíly o průměru 0,2 – 1 mm.

Endotel podložený jen velmi tenkou vrstvičkou řídkého vaziva, která je často nekontinuální, tvoří tuniku intimu.

Tunika media je složena z 1 – 3 vrstev buněk hladké svaloviny. U nejmenších venul nemusí být vrstvy hladké svaloviny patrné vůbec.

Z longitudinálně uspořádaných vláken kolagenního vaziva vzniká tunika adventicia, která je nejsilnější vrstvou stěny venul [8].

1.3.3. Kapiláry

Kapiláry jsou cévy nejmenšího průměru, který se pohybuje v rozmezí 6 - 30 μm , nejčastěji však bývá kolem 8 μm . Tvoří velmi jemnou síť, jejíž hustota je v lidském těle rozmanitá a závislá na aktivitě orgánu, jež protkává. Vzhledem k malé rychlosti průtoku krve a velmi tenké cévní stěně jsou místem výměny látek mezi krví a periferními tkáněmi.

Stěna kapiláry je tvořena endotelovými buňkami protáhlými v ose cévy, které nasedají na souvislou bazální membránu. V rámci příčného průřezu obvykle stačí 1 – 2 endotelové buňky k vystlání celého lumina kapiláry.

V různých místech pozorujeme v těsné blízkosti kapilár buňky s dlouhými výběžky, jimiž lumen kapiláry vystlaný endotelem obemykají. Jsou to tzv. pericyty (Rougetovy buňky). Bazální membrána pericytů z vnějšku těsně doléhá k bazální membráně endotelových buněk a může s ní také splývat. Jelikož jsou v cytoplasmě pericytů přítomné mediátory aktin, myosin a tropomyosin, soudí se, že jsou tyto buňky schopné určité kontrakce. Funkce pericytů může připomínat první náznaky funkce tuniky medie přítomné ve větších cévách.

Podél kapilár dále pozorujeme tenkou vrstvu longitudinálně orientovaných kolagenních fibril, která zastupují funkci tuniky adventicie popisované u cév většího kalibru.

Dle stavby cévní stěny dělíme kapiláry do těchto kategorií:

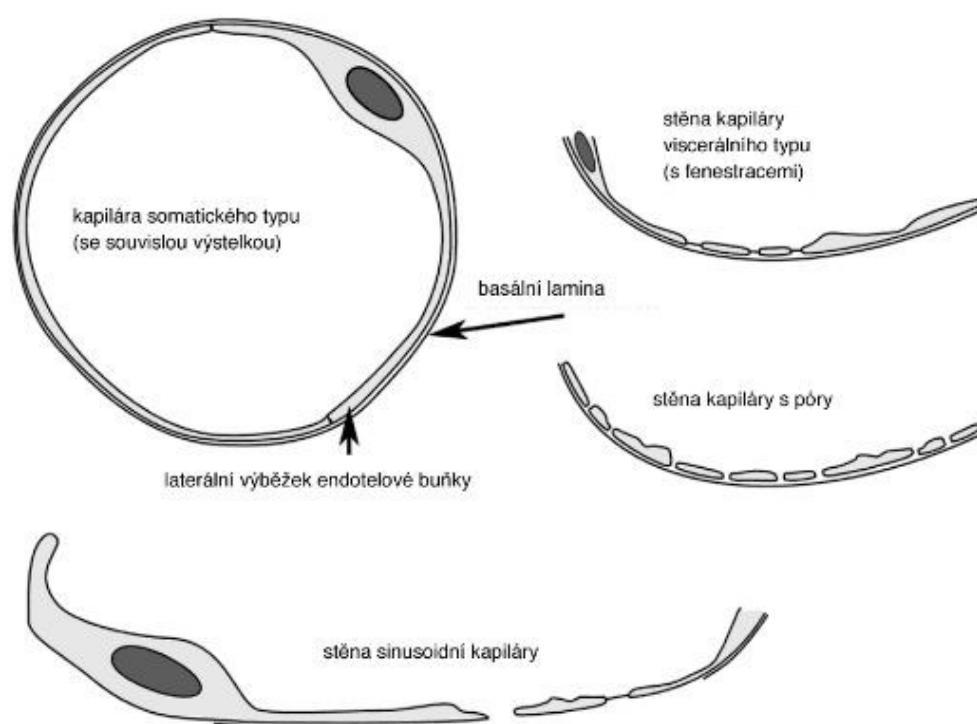
Kapiláry somatického typu jsou vystlány kontinuální vrstvou endotelových buněk ležících na souvislé bazální membráně. Nepozorujeme fenestrace ani póry. Jsou přítomné ve většině tkání např. v mozku, svalech a v srdci.

Kapiláry viscerálního typu se vyznačují endotelovými buňkami, které mají mezi svými výběžky vytvořené fenestrace překryté diafragmou. Bazální membrána zůstává kontinuální. Nachází se v orgánech s potřebou rychlé výměny látek, např. ve střevě a v endokrinních žlázách.

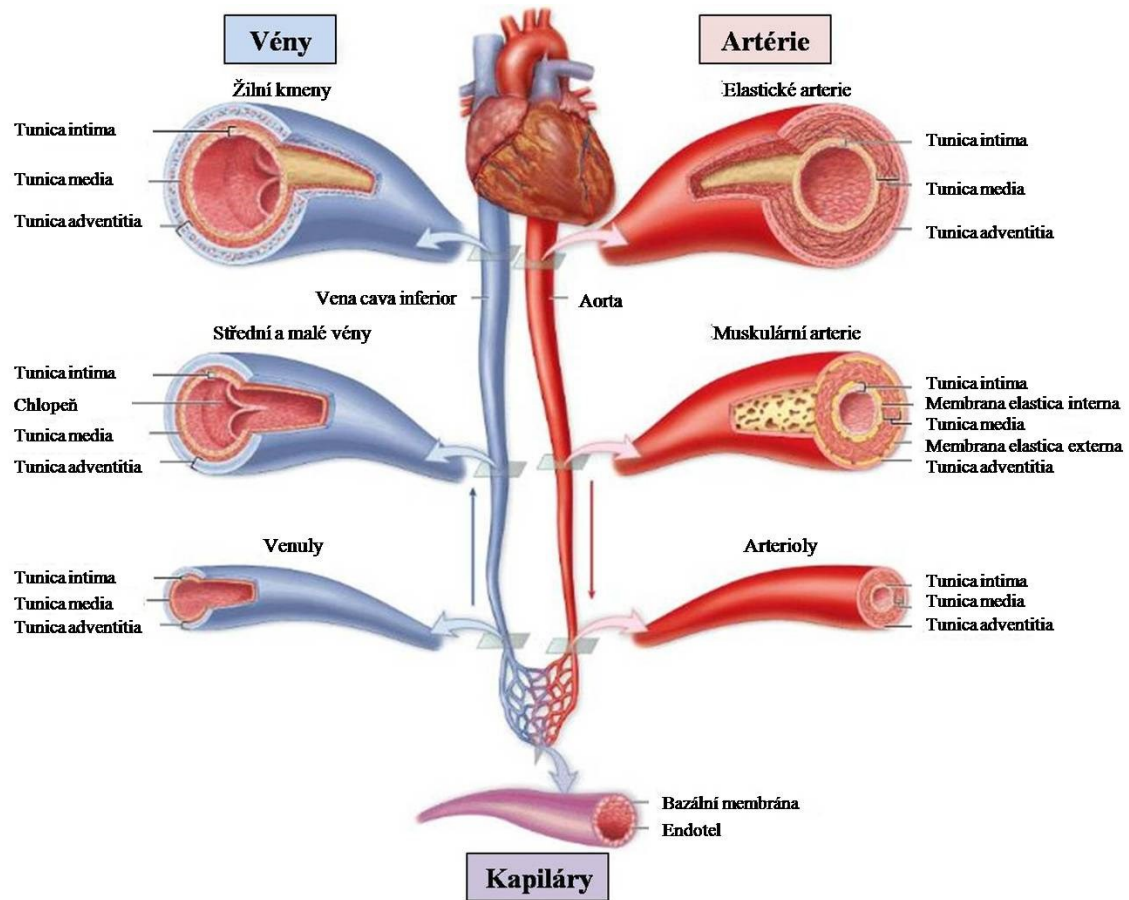
Kapiláry s póry mají stále souvislou bazální membránu, diafragma překrývající póry mezi výběžky endotelových buněk však chybí a otvory jsou tedy považovány za pravé. Tento typ kapilár je popsán pouze v glomerulech ledvin.

Sinusoidní kapiláry se od ostatních liší nepravidelným lumenem jehož průměr značně kolísá (8 - 40 μm). Mezi endotelovými buňkami nacházíme četné štěrby, fenestrace a póry bez překrytí. Bazální membrána je diskontinuální. Sinusoidy je možné pozorovat v kostní dřeni, slezině či játrech [3, 4, 8]

Obrázek 2. Typy kapilár, převzato [8]



Obrázek 3. Cévy kardiiovaskulárního systému, převzato, upraveno [10]



Source: Mescher AL: Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition: <http://www.accessmedicine.com>
 Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

1.4. Endotel a jeho fyziologická funkce

Endotel je tvořen jednou vrstvou endotelových buněk, které vystylají cévní lumen, kryjí srdeční chlopně a řadu tělesných dutin. Kromě funkce bariérové plní též funkci sekreční. Endotel je největším sekrečním orgánem lidského těla.

Endotel svými metabolickými schopnostmi ovlivňuje nejen lumen cévy, ale také cévní stěnu samotnou. Ačkoli se jedná o bariéru, je endotel zároveň tkáň, která zajišťuje integraci a spolupráci obou prostředí. Endotelové buňky se podílejí na regulaci tonu buněk hladké svaloviny cévní stěny a zajišťují její antikoagulační, fibrinolytické a antitrombotické vlastnosti. Dále udržují nesmáčivost lumen cévy a podílí se na řízení zánětlivých a imunologických reakcí cévní stěny. Mezi další funkce endotelu můžeme zařadit i podíl na regulaci proliferace buněk [12].

Mezi hlavní funkce endotelu patří moderace semipermeability cévní stěny. Cévní stěnou mohou procházet buněčné i nebuněčné elementy. Přenos buněčných částic krve (leukocytů, monocytů) je realizován pomocí adhezních molekul např. ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 a E-selektinu. Tyto adhezní mediátory jsou exprimovány přímo endotelovými buňkami. Nebuněčné partikule využívají cestu paracelulární (malé molekuly a voda), případně i transcelulární přenos (velké molekuly) [12, 13].

Další zásadní schopností endotelu je zajišťování nesmáčivosti a udržování rovnováhy mezi antiagregačními mediátory a lokálně působícími koagulačními mechanismy. Řízení hemostázy a fibrinolýzy se účastní pomocí von Willebrandova faktoru (vWf), fibrinogenu, trombomodulinu, tkáňového faktoru (TF), tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA) a inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI-1).

Trombomodulin se nachází na povrchu endotelu a vykazuje vysokou afinitu pro trombin, který je v případě aktivace koagulační kaskády hojně přítomen v blízkém okolí. Ve chvíli navázání trombinu na trombomodulin se mění jeho funkce. Trombin ztrácí schopnost další účasti v koagulační kaskádě, kde štěpil fibrinogen na fibrin a dále působil na agregaci destiček. Naproti tomu se mění v aktivátor proteinu C, který je významným antikoagulačním faktorem. Trombinem aktivovaný protein C následně ve spolupráci se svým kofaktorem proteinem S blokuje koagulační faktor V a VIII. Dalším elementem zodpovědným za tvorbu proteinu C a S je vitamin K. Aktivita proteinu C je po aktivaci komplexem trombomodulin-trombin zvýšena více než 1000x [11, 12].

O inhibitoru tkáňového faktoru se soudí, že je jedním z hlavních fyziologických antikoagulačních činitelů. Inhibici uplatňuje ve 2 různých procesech: je schopen inhibice komplexu faktor VIIa-TF a také inhibuje faktor Xa. Inhibitor TF je produktem endotelu a působí v místě počátku tvorby trombu [12].

Zásadní roli má endotel také při fibrinolýze. Endotelové buňky jsou producenty tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA) a inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI-1), které mohou v různém poměru uvolňovat. Plasminogen cirkulující krví se prostřednictvím tPA mění na plasmin, který má schopnost štěpit vznikající fibrinová vlákna na fibrinové degradační produkty. Produkci tPA potencuje trombin, histamin a některé cytokiny. Naopak regulaci rychlosti a stupně vaskulární trombolýzy zajišťuje PAI-1 [11, 12, 13].

Mezi další důležité úkoly endoteliální tkáně patří regulace cévního tonu. Tu endotel realizuje pomocí uvolňování vazodilatačních a vazokonstrikčních mediátorů.

Mezi vazodilatační mediátory řadíme oxid dusnatý (NO, dříve nazývaný endotelový relaxační faktor EDRF). Prekurzorem NO je aminokyselina L-arginin a enzymem zajišťujícím reakci je endotelová NO-syntáza (e-NOS). Aktivace e-NOS může být zapříčiněna chemicky (acetylcholin, bradykinin, endotelin, angiotensin II, katecholaminy, hypoxie aj.), přílišnou lineární rychlostí krevního proudu a dalšími vlivy. Nadměrná rychlost proudění krve, tzv. shear-stress, by mohla způsobit změnu lineárního proudu v turbulentní a následné odtržení endotelie od bazální membrány. V takovém případě by mohlo dojít ke kontaktu krve a vysoce trombogenního kolagenu [12, 14, 15].

Po syntéze difunduje NO do okolí a dilataci cév vyvolává prostřednictvím aktivace cytoplasmatické guanylátcyklázy a následného vzniku druhého posla – cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) [11].

Kromě vazodilatace se oxid dusnatý podílí i na inhibici exprese adhezivních molekul. Tlumí také adhezi a agregaci trombocytů a brzdí apoptózu buněk endotelu. Dále brání přesunu buněk hladké svaloviny z tuniky medie a jejich transformaci v buňky sekreční [13].

Endotelová NO-syntáza patří mezi konstitutivní NO syntázy, tedy ty, které produkují prakticky trvale NO v množství potřebném pro běžný fyziologický stav. Inhibici eNOS způsobuje endotelin-1, můžeme ji inhibovat i podáním inhibitorů

cyklooxygenázy, dále také samotný NO může působit na tento enzym inhibičně mechanismem zpětné vazby [12].

Dalším mediátorem cévní dilatace je prostacyklin (PGI₂). Vlivy podporující syntézu PGI₂ jsou podobné jako u tvorby NO. Prostacyklin působí zvýšením koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v myocytech, navíc se jeho účinky projevují i snížením patologické aktivity destiček. Vztah PGI₂ a NO je synergický, vzájemné se svými účinky potencují [13, 14].

Pro vyrovnání vlivu vazodilatačních působků produkuje endotel také elementy s vlastnostmi vazokonstrikčními.

Nejdůležitějším je endotelin-1. Jedná se o peptid tvořený výhradně v endotelu, jehož účinky jsou silně vazokonstrikční a prozánětlivé. Projevuje se dále stimulací proliferace myocytů tuniky medie. Syntéza endotelinu-1 je podporována např. trombinem či oxidovaným LDL. Za fyziologického stavu je jeho účinek tlumen současnou stimulací produkce NO a PGI₂. Totální vazokonstrikce nastává pouze v případě endotelové dysfunkce [13, 14].

Dalším elementem působícím antagonisticky vůči NO je tromboxan A₂ a prostaglandin H₂, které se vyznačují stimulací krevních destiček a myocytů cévní stěny [14].

Endotel má vliv i na proliferaci a angiogenezi. Stimulace za patologických podmínek má za následek proliferaci myocytů tuniky medie a jejich přesun do subendotelu. Následně dochází ke ztluštění tuniky intimy a hyperplazii cévní stěny. Do skupiny růstových faktorů s vlivem na endotel patří příkladem vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), destičkový růstový faktor (PDGF) a transformující růstový faktor β (TGF- β). Podobné účinky pozorujeme také u endotelinu-1, angiotenzinu a interleukinu-1. Naproti tomu antiproliferační chování vykazuje oxid dusnatý a PGI₂. Za fyziologických podmínek převažují antiproliferační a antimigrační schopnosti endotelových buněk, růstové faktory se podílejí na případné reparaci stěny cév a dochází ke stabilizaci cévní stěny [11, 12, 13].

1.5. Endotelová dysfunkce

Endotelovou dysfunkci popisujeme jako narušení homeostázy mezi produkty endotelových buněk. Konkrétně jde o rozvrat rovnováhy vazoaktivních mediátorů, dále vlivů ovlivňujících hemokoagulaci, mechanismů protizánětlivých a zánět indukujících a v neposlední řadě o narušení rovnovážného stavu činitelů regulujících proliferaci buněk. Chování dysfunkčního endotelu se tedy příklání vlastnostem vazokonstrikčním, aterogenním a protrombogenním. [12,13].

Poškození endotelu může být různého původu jako například poškození chemické (hypercholesterolemie, diabetes mellitus, kouření), mechanické (hypertenze), případně zánětové.

Ve vztahu k ateroskleróze má největší dopad narušení semipermeability endotelu a v jeho důsledku zvýšení propustnosti pro plazmatické lipoproteiny. Tento stav je doprovázen expresí adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1, selektiny) a následnou chemotaxí monocytů a trombocytů. Kromě lipoproteinů (zejména oxidovaných LDL) a monocytů migrují do subendotelové vrstvy také hladké svalové buňky z tuniky medie. Monocyty se v cévní stěně mění v makrofágy, ze kterých se následně stávají pěnové buňky. Snížená produkce NO vede k posílení vlivu růstových hormonů, které indukují nejen migraci hladkých svalových buněk, ale také podporují buňky hladké svaloviny v tvorbě extracelulární vazivové tkáně. Výsledkem je vznik základu aterosklerotického plátu [12, 13, 16].

Mimo úvodní fázi aterosklerotického procesu má endotelová dysfunkce vliv i na její pozdější průběh. Kumulované makrofágy a pěnové buňky produkují metaloproteinázy, které mají vliv na stabilitu fibromuskulární čepičky aterosklerotického plátu. Mohou ji rozrušovat, čím se stává plát nebezpečnějším [13].

Jak bylo zmíněno výše, v poškozeném endotelu nalézáme sníženou tvorbu NO, který má kromě inhibičního vlivu na růstové hormony a vazodilatačních schopností také schopnost tlumit agregaci trombocytů a adhezi leukocytů. Nedostatek NO se tedy projevuje vazokonstrikčně, promitoticky a protromboticky [12].

Podpora protrombogenního stavu má funkční podklad i v poklesu hladin PGI₂ a ve zvýšení tvorby von Willebrandova a tkáňového faktoru [12].

Zvýšená prokoagulační aktivita dysfunkčního endotelu je dále podpořena poklesem produkce aktivátoru plazminogenu a nárůstem tvorby inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI-1) [12].

V poškozeném endotelu se hojně shlukují oxidované LDL, které indukují apoptózu makrofágů, ale také endoteliálních buněk [12].

Kromě aterosklerózy je endotelová dysfunkce součástí raných i chronických fází patogeneze hypertenze, srdečního a renálního selhání, ischemické choroby dolních končetin, septických atak, komplikací diabetu mellitu II typu a mnoha dalších. Jedná se však o preklinickou fázi, která se může vyvíjet léta bez vědomí pacienta.

Zásadní vlastností dysfunkce endotelu je její reverzibilita. Jsou-li potlačeny vlivy, které k její manifestaci vedly, je možné fyziologickou funkci endotelu obnovit. Je třeba, aby k potlačení těchto vlivů došlo co nejdříve. Nedojde-li k obnovení funkce endotelu, nastane poškození cévní stěny, které vede zpravidla k zánětu a následným morfologickým a posléze fyziologickým nevratným změnám [11].

Příčinou endoteliální dysfunkce je většinou hned několik rizikových faktorů, čímž se manifestace poškození zrychluje.

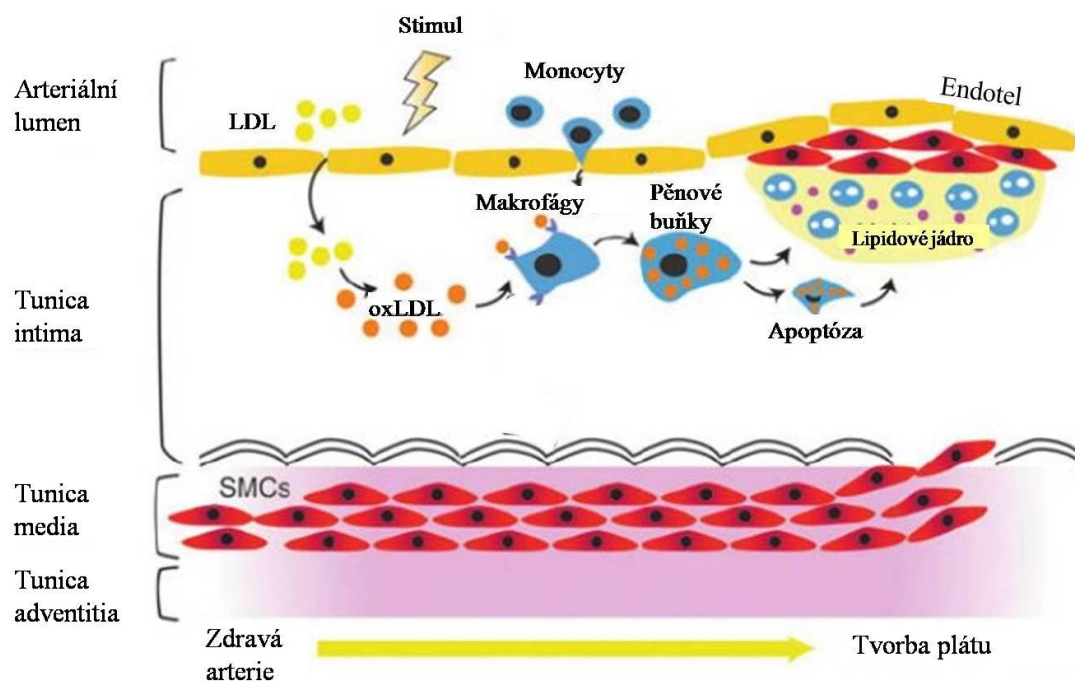
Faktory indukující endotelovou dysfunkci:

Neovlivitelné: věk
mužské pohlaví
vrozené poruchy metabolismu lipoproteinů

Ovlivnitelné: dietou či farmakologicky ovlivnitelná hyperlipoproteinémie (především vysoké hladiny LDL)
hypoxie
kouření
arteriální hypertenze
diabetes mellitus II, hyperglykémie
zánět, infekce
obezita
nízká fyzická aktivita

Obrázek 4. Endotelová dysfunkce, převzato, upraveno [17]

Chronické endotelové poškození stimuluje adhezi monocytů a jejich migraci z lumen cévy do oblasti tuniky intimy. Molekuly LDL jsou oxidovány. Modifikované formy LDL se hromadí v makrofázích, čímž dochází ke vzniku pěnových buněk. Zánětlivé mediátory iniciují přesun hladkých svalových buněk (SMCs - smooth muscle cells) do subendotelu a společně s dalšími imunitními buňkami přispívají k tvorbě aterosklerotického plátu.



1.6. Adhezní molekuly

Adhezní molekuly jsou glykoproteiny ukotvené v membráně buněk, které mají schopnost rozpoznávat a specificky vázat své ligandy. Je-li ligandem totožný adhezní protein, jedná se o vazbu homotypickou. V případě, že jako ligand působí jiný adhezní protein, jde o vazbu heterotypickou. V závislosti na působení patogenních vlivů se může exprese jednotlivých adhezních molekul měnit. Zvýšení exprese adhezních proteinů a přechod transendoteliálního přenosu v nekontrolovaný značí zánětlivé ložisko, oblast endotelové dysfunkce a potažmo aterosklerózy [19].

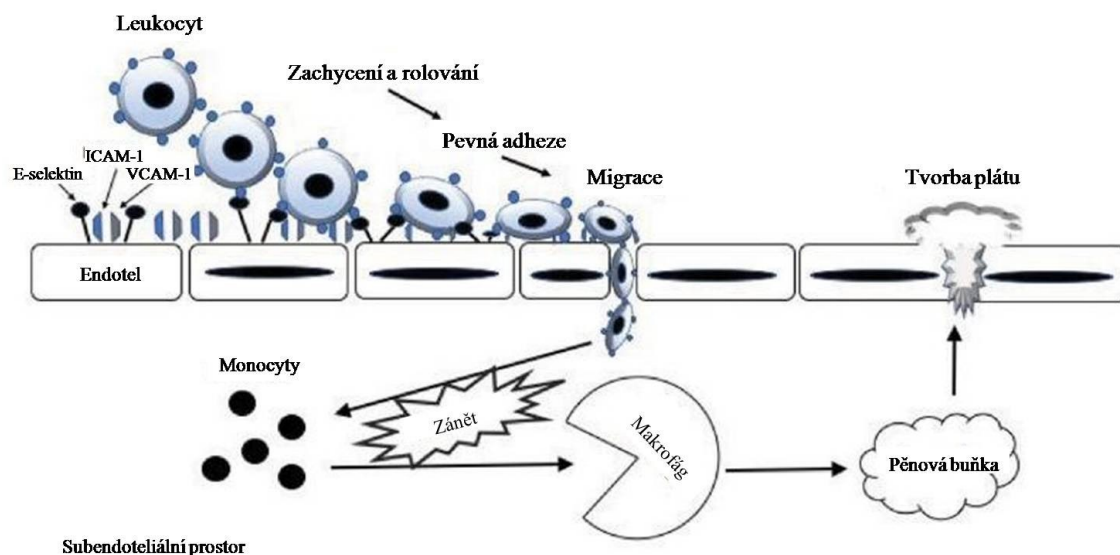
V současné době dělíme adhezní molekuly dle struktury do 4 skupin:

- integriny
- kadheriny
- selektiny
- adhezní proteiny podobné imunoglobulinům

V rámci aterosklerózy hrají zásadní roli v pečlivě regulovaném procesu vychytávání monocytů z cirkulace a následné transendotelové migrace do oblasti vznikajícího nebo již progredujícího aterosklerotického plátu [18, 20].

Selektiny a jejich ligandy se účastní rolování a zachytávání monocytů na cévní stěně. Adhezní molekuly ze skupiny imunoglobulinům podobných proteinů (zejména ICAM-1 a VCAM-1) společně s některými z integrinů poskytují pevnou adhezi zánětlivých buněk na povrchu cévního lumen, zatímco další z imunoglobulinové skupiny – PECAM-1 – je zodpovědný za extravazaci buněk z krevního kompartmentu a jejich transendotelový přesun [20].

Obrázek 5. Role adhezních molekul při transendotelové migraci leukocytů, převzato, upraveno [21]



1.6.1. Integriny

Integriny jsou povrchové buněčné heterodimerní receptory tvořené α a β řetězcem. Jsou schopny promptně změnit konformaci své extracelulární části a v případě potřeby tvoří shluky. Během aktivace se účastní signální kaskády přenášející informace z extracelulárního do cytoplazmatického prostoru. Integriny samotné mají mnoho podskupin, z nichž pro vychytávání leukocytů jsou nejvýznamnější β_2 a α_4 . Leukocyty průběžně exprimují molekuly tzv. lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), integrin patřící do skupiny β_2 , který se následně váže na 2 molekuly intracelulárních adhezních molekul (ICAM-1 a ICAM-2). Tzv. very late antigen 4 (VLA-4), integrin se skupiny α_4 , je vystavován monocyty a lymfocyty a je schopen vazby na další adhezní molekulu imunoglobulinového typu – vaskulární adhezní molekulu VCAM-1. Napojení integrinů vystavovaných imunitními buňkami na adhezivní molekuly imunoglobulinového typu znamená další stupeň aktivace endotelu [18, 22].

1.6.2. Kadheriny

Kadheriny se vyznačují závislostí na Ca^{2+} iontech. Patří mezi transmembránové glykoproteiny poskytující homotypické vazby. Svou funkci uplatňují jako laterální adhezivní proteiny endoteliálních buněk. Mají významnou roli v udržování souvislé jednovrstevné endoteliální tkáně a předcházení agregaci krevních destiček [19, 22].

1.6.3. Selektiny

Selektiny jsou zodpovědné za mobilizaci a adhezi leukocytů v případě poranění či zánětlivé ataky. K povrchu jiných buněk se váží prostřednictvím cukerných složek. Podle jejich výskytu se dělí na L-selektin, který pozorujeme na všech typech leukocytů, P-selektin přítomný na trombocytech a buňkách endotelu a dále E-selektin produkovaný výhradně endotelem. E-selektin se nevyskytuje v buňkách běžně, ale je exprimován v oblastech aktivovaných zánětlivými cytokiny (IL-1, TNF- α , INF- γ) nebo v místech aterosklerotických lézí, kde se účastní adheze monocytů, leukocytů a neutrofilů [18, 19].

P-selektin je uložen ve Weibel-Paladeho intracelulárních tělískách a v případě aktivace kyslíkovými radikály, cytokiny či trombinem může být během sekund až minut přesunut do plazmatické membrány [19, 22].

Selektiny E a P exprimované v akutně či chronicky aktivovaných tkáních způsobují reversibilní rolování imunitních buněk po endotelu, po kterém následuje jejich průnik do extravazálního prostoru [18, 22].

1.6.4. Adhezní proteiny podobné imunoglobulinům

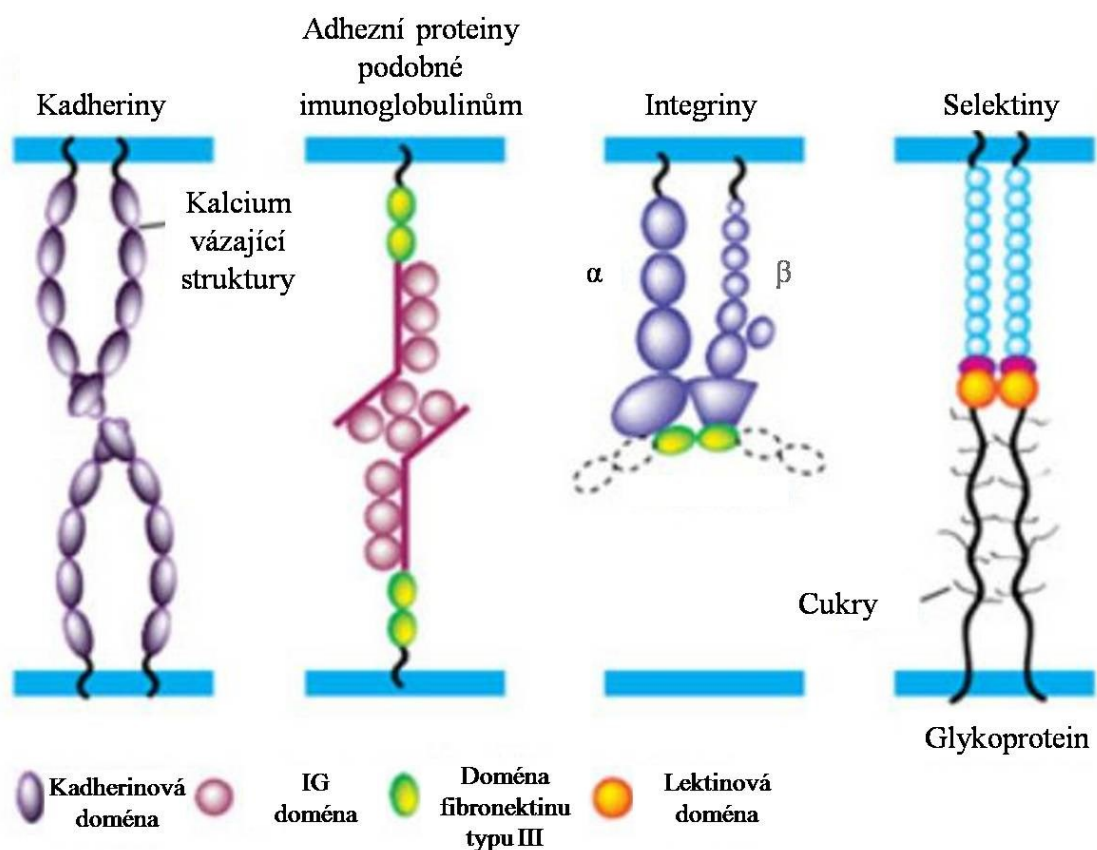
Do této skupiny patří molekuly situované na povrchu buněk, jejichž součástí je imunoglobulinová podjednotka. Řadíme mezi ně i část lymfocytárních receptorů (CD4, CD8, TCR), v této práci se však zaměřujeme na adhezní molekuly exprimované endoteliemi, které se účastní pochodů při rozpoznávání antigenu a dále se podílí na vychytávání leukocytů z cirkulace a jejich následného hromadění v místě defektu cévní tkáně. Adhezní proteiny imunoglobulinového typu jsou klíčovými regulátory interakce leukocyty-endotel. Mezi takové adhezní molekuly patří ICAM-1, VCAM-1 a PECAM-1, NCAM-1 a další [19, 22, 24].

Adhezní proteiny imunoglobulinového typu mají C-konec orientovaný cytoplazmaticky, N-konec směřuje extracelulárně [22].

Rámcové shrnutí průběhu adheze leukocytů

Adheze leukocytů je multifaktoriální proces začínající rolováním (kulátením) leukocytů po endotelu, které je umožněno prostřednictvím selektinů. Následné zpevnění vazby závisí na interakci mezi adhezními molekulami imunoglobulinového typu vystavovanými endotelovými buňkami (ICAM-1, VCAM-1, a další) a integriny exprimovanými na povrchu leukocytů [26].

Obrázek 6. Adhezní molekuly, převzato, upraveno [28]



1.6.4.1. ICAM-1

Intracelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1) je transmembránovým proteinem obsahujícím pět imunoglobulinových domén vzájemně provázaných disulfidickými můstky. Imunoglobulinová doména ICAM-1 je orientována extracelulárně, následuje transmembránová doména a c-konec uložený cytoplasmaticky. Kromě toho, že se podílí na adhezi a migraci leukocytů, je také endotelovým signálním přenašečem. Endotelové buňky zajišťují trvalou expresi proteinu potřebného pro zajištění běžných fyziologických funkcí, avšak v případě raných i pokročilých fází aterosklerotického procesu, při stimulaci zánětlivými faktory (IL-1, TNF- α , INF- γ) nebo v případě detekce bakteriálního endotoxinu dochází k dramatickému vzestupu jeho exprese na aktivovaném endotelu [19, 22].

Zvýšená exprese ICAM-1 je charakteristickým znakem a promotorem aterosklerózy. Zajišťuje kontakt mezi leukocyty a endotelovými buňkami, napomáhá rolování leukocytů po endotelu, účastní se stabilizace interakce leukocyt-endotel a migrace do subendotelové oblasti. Ligandy pro ICAM-1 jsou dva typy integrinů. S lymfocyty ale i dalšími typy leukocytů se ICAM-1 váže pomocí integrinu $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1). Integrin $\alpha_M\beta_2$ se nachází v buněčné membráně monocytů [19, 22].

Význam a regulace exprese ICAM-1 ve vztahu k endotelu a endotelové dysfunkci

Expres ICAM-1 je zvýšená v aterosklerózou ohrožených oblastech arteriální stěny a je regulována zánětlivými faktory.

Aktivace ICAM-1 vede ke zvýšení migrace leukocytů do subendotelové oblasti, zvýšení permeability endoteliální vrstvy a posléze i její degradaci. Dalším následkem stimulace exprese ICAM-1 je přestavba aktinového cytoskeletu a uzpůsobení morfologické struktury pro transendotelový přenos. ICAM-1 tedy působí i jako signální přenašeč. Přestavba aktinového cytoskeletu souvisí s nárůstem hladin cytoplasmatického Ca^{2+} , přesný průběh však není dosud zcela znám [24, 25].

Následkem zvýšení aktivity ICAM-1 je dále také snížení exprese VE-kadherinu, který zodpovídá za udržení integrity endoteliálních buněk ve spojích zvaných adherens junctions, a také downregulace proteinů zonula-occludens 1 (ZO-1, TJP-1 – tight junction

protein 1) a zonula occludens 2 (TJP -2), které nacházíme v buněčných spojích tzv. tight junction. Těmito vlivy se ICAM-1 podílí na rozrušení souvislosti a nesmáčivosti endoteliální tkáně a na patologickém zvýšení její permeability [24].

Během studií bylo zjištěno, že v průběhu aktivace ICAM-1 molekul zodpovídají za následné procesy obě domény, tedy jako cytoplasmatická, tak extracelulární. Při podání protilátek blokujících extracelulární část došlo k redukci adheze leukocytů a vaskulární permeability, které ICAM-1 jinak podporuje. Studie pracující s knock-outovanou cytoplasmatickou doménou ICAM-1 prokázaly, že tato složka se podílí na transendotelové migraci leukocytů, nemá však vliv na jejich endoteliální adhezi [24].

Absence ICAM-1 (kódováno na ICAM-1 genu myši) ukázala částečnou redukci velikosti aterosklerotické léze. Je tedy pravděpodobné, že ICAM-1 participuje i na ukládání monocytů v místě tuniky intimy [18].

Nárůst exprese ICAM-1 zapříčiňují oxidované ale také i nativní formy LDL, které svou přítomností v cirkulaci opět podněcují aktivaci endotelií a zvýšení leukocytární adheze [18].

Indukce exprese molekul ICAM-1 v endoteliích je způsobována cestou signálních cytokinů. Je však také prokázáno, že vliv na ni má i hemodynamický stres. Již výše zmiňovaný tzv. shear stress je tedy dalším promotorem exprese ICAM-1. To vysvětluje nálezy aterosklerotických lézí v místech aorty, která jsou vystavena prudkým změnám a přílišné lineární rychlosti krevního proudu. Můžeme tedy odvodit, že narušená stabilita krevního proudu při arteriální hypertenzi se také podílí na zvyšování exprese adhezní molekuly ICAM-1 [26, 30].

Při zvýšení koncentrace VEGF nebo TNF- α pozorujeme prudký nárůst počtu exprimovaných ICAM-1 molekul, který může nastat již pouhé 4 hodiny po detekci těchto faktorů endoteliemi. Mimo zvýšení exprese po detekci TNF- α také probíhá redistribuce molekul ICAM-1, které tak definují oblast leukocytární adheze [24].

Ze zmíněných poznatků je možno vyvodit, že hypercholesterolemie a arteriální hypertenze, dva hlavní rizikové faktory endoteliální dysfunkce a aterosklerózy, jsou klíčovými faktory podporujícími expresi ICAM-1 a vychytávání leukocytů endotelovými buňkami arterií [26].

1.6.4.2. VCAM-1

Vaskulární adhezní molekulu 1 (VCAM-1) pozorujeme zejména na buňkách aktivovaného endotelu. Jedná se o transmembránový protein obsahující 7 imunoglobulinových podjednotek vázaných disulfidickými můstky v extracelulární části, část transmembránovou a část cytoplasmatickou složenou z 19 aminokyselin. Na rozdíl od adhezní molekuly ICAM-1 nevytvářejí endoteliální buňky rezervní zásobu VCAM-1, společnou je ale výrazně narůstající endoteliální exprese VCAM-1 po detekci cytokinové stimulace [25, 27].

Mezi ligandy VCAM-1 řadíme integriny s doménou α , konkrétně $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) a $\alpha_4\beta_7$, vystavované lymfocyty, monocyty a eozinofilními granulocyty [19].

Exprese VCAM-1 je zásadní pro rolování a následnou pevnou adhezi leukocytů na aktivovaném endotelu. Dále je prokázán jistý vliv na leukocytární extravazaci. Při procesu leukocytární adheze a transmigrace je zcela klíčová součinnost VCAM-1 s ligandem VLA-4. Mimo tyto vlastnosti má VCAM-1 podobně jako molekula ICAM-1 schopnost membránové transdukce signálu [24, 25, 27].

V případě silných chronických zánětů nebo jiných závažných diagnóz (např. revmatoidní artritida, astma, rejekce transplantátu, rakovinové bujení) se mohou VCAM-1 molekuly vyskytovat i na povrchu jiných buněk, příkladem na dendritických buňkách, makrofázích, fibroblastech kostní dřeně, myoblastech nebo na maligních buňkách [27].

Funkční odlišnost VCAM-1 od molekul E-selektinu a ICAM-1 tkví v tom, že zatímco E-selektin a ICAM-1 váží leukocyty včetně monocytů, molekuly VCAM-1 mají schopnost specificky vázat jen monocyty a lymfocyty [22].

Význam a regulace exprese VCAM-1 ve vztahu k endotelu a endotelové dysfunkci

Zvýšená exprese VCAM-1 aktivovaným endotelem je významným znakem aterosklerózy, na které se podílí poskytováním pevné vazby imunitních buněk na endotelových buňkách. Po adhezi lymfocytů a monocytů na endotelu následuje jejich migrace do subendotelové oblasti, na které se molekula VCAM-1 také podílí. Po přesunu do subendotelu se lymfocyty a monocyty mění v makrofágy a pěnové buňky a stávají se součástí vznikajícího nebo rostoucího aterosklerotického plátu.

V rámci extracelulární složky molekuly VCAM-1 rozlišujeme 7 imunoglobulinových domén. Domény 1 a 4, 2 a 5 a dále i 3 a 6 tvoří vysoce homologní dvojice. Při vazbě s $\alpha_4\beta_1$ integrinem (VLA-4) hrají zásadní roli domény 1 a 4, které se tak podílí na adhezi lymfocytů a monocytů na endotelu. Uskutečněné studie dokládají, že při použití protilátek blokujících domény 1 a 4 adhezí molekuly VCAM-1 dochází redukci specifické interakce integrinu $\alpha_4\beta_1$ exprimovaného B-lymfocyty a buněk se zvýšenou expresí VCAM-1 aktivovaných TNF- α [27, 28].

V nedávné době byla vyvinuta také králičí/lidská chimérická monoklonální protilátka specifická pro VCAM-1 imunoglobulinovou doménu 6. Při použití této protilátky bylo zjištěno, že doména 6 se podílí na transendotelové migraci, ale neúčastní se procesu adheze lymfocytů a monocytů na cévním endotelu [27].

Aktivace exprese VCAM-1 má negativní vliv i na VE-kadherin, který je přítomný v tzv. adherens junctions. Adherens junctions se podílí na udržení endotelové tkáně souvislé, semipermeabilní a intaktní. Snížení exprese VE-kadherinu vlivem VCAM-1 tedy působí rozvrat těchto základních vlastností endotelu [29].

Přichycení imunitních buněk k endotelu molekulou VCAM-1 do tzv. docking structures (místo buněčné membrány připravené pro pevné zachycení lymfocytu či monocytu endotelem a následnou transendotelovou migraci) dává automaticky i signál pro cytozomální oblast k přestavbě aktinového cytoskeletu buňky, který se začne formovat okolo adherovaného lymfocytu. Jako přenašeč signálu slouží právě molekula VCAM-1, ale přesný průběh změn ještě nebyl popsán [29].

K up-regulaci exprese VCAM-1 dochází působením mnoha zánětlivých faktorů, jako jsou příkladem TNF- α , VEGF, IL-1, ROS, vysoká koncentrace glukózy v krvi a mikrobiální stimuly [28].

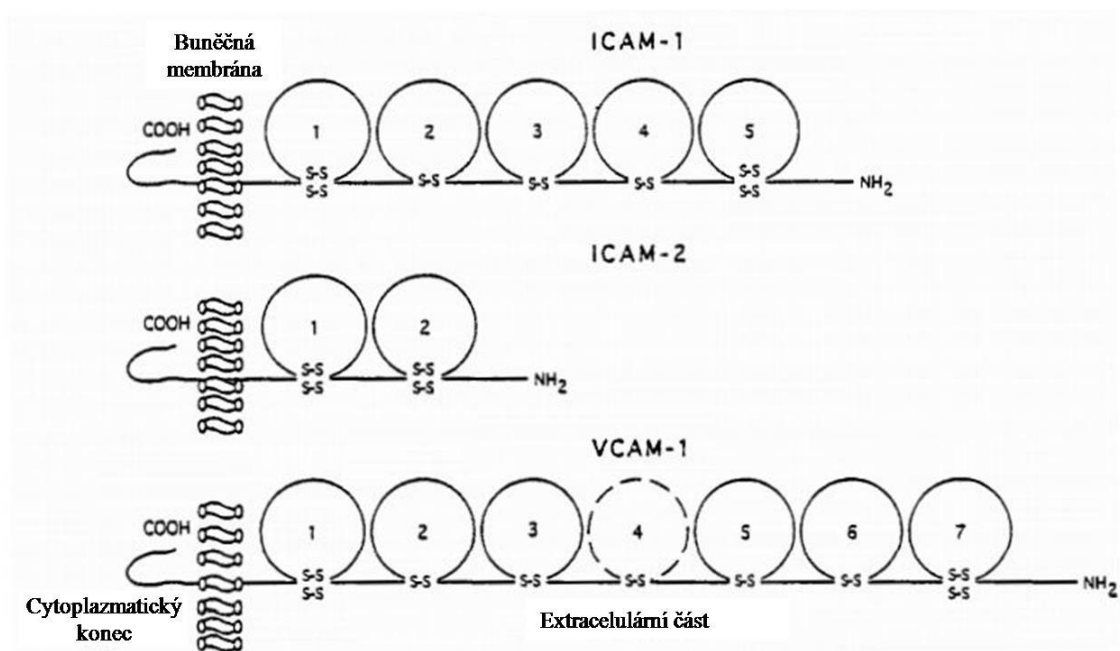
Patologická hladina krevního cholesterolu, jeho oxidace a akumulace v oblasti tuniky intimy je též důležitým regulátorem vystavování VCAM-1 arteriálními endoteliemi [18].

Ateroskleróza se projevuje jako ložiskové onemocnění, které se nejčastěji rozvíjí v cévních záhybech a bifurkacích. Narušení lineárního proudu krve a jeho zvrát v turbulentní je také faktorem působícím nárůst exprese VCAM-1 endoteliální tkání. Nepravidelnosti krevního proudu (způsobené příkladem arytmiemi) nebo arteriální

hypertenze, u které pozorujeme přílišný lineární tlak krevního proudu, jsou považovány za predispoziční faktory indukce exprese adhezní molekuly VCAM-1 [18, 28, 30].

Dle popsaných vlastností molekuly VCAM-1 je patrné, že je v mnohém podobná molekule ICAM-1. I pro molekulu VCAM-1 platí, že její exprese a následná adheze imunitních buněk na endotelu artérií jsou silně podněcovány hypercholesterolémií a vysokým krevním tlakem, které řadíme do kategorie hlavních rizikových faktorů dysfunkce endotelu.

Obrázek 7. Schéma struktury adhezních molekul imunoglobulinového typu – ICAM-1 a VCAM-1, převzato, upraveno [22]



1.7. Nealkoholická steatohepatitida (NASH)

Nealkoholická steatohepatitida je zánětlivé onemocnění jater, u kterého není prokázán podklad v abúzu alkoholu. Jedná se o hepatální manifestaci metabolického syndromu, jež je a s největší pravděpodobností i bude stále častější diagnózou. Prevalence NASH se dle literatury pohybuje ve vyspělých zemích okolo 3 %. Dalšími složkami MS jsou obezita, hypercholesterolemie a insulinová rezistence. Nebezpečí NASH tkví v možném rozvoji jaterního selhání, fibrózy, cirhózy či hepatocelulárního karcinomu [31, 33, 35, 36].

NASH je považována za podjednotku NAFLD (non alcoholic fatty liver disease, nealkoholické ztukovatění jater), která je definována akumulací tuků v jaterních buňkách přesahující 5 - 10 % hmotnosti jater (u pacientů bez abúzu alkoholu, tj. méně než 20 g etanolu/den). NAFLD s prevalencí 20 - 30 % je tedy fenoménem, který zahrnuje jak prostou steatózu jater, tak i pokročilou fázi - steatohepatitidu [31, 33].

Diagnostikovaná NASH patří do kategorie závažných až letálních onemocnění. Rozvoj v jaterní cirhózu pozorujeme u 9 - 25 % pacientů trpících NASH. Smrt v důsledku komplikací onemocnění jater v rámci vyvinuté jaterní cirhózy ve spojitosti s NASH nastane u 30 - 40 % pacientů do 10 let [33].

1.7.1. Příčiny NASH

Mezi příčiny NASH patří mnoho faktorů, z nichž většina je v úzké spojitosti s nadměrným kalorickým příjmem, nevhodným složením potravy a sníženou fyzickou aktivitou [31].

Mezi nejčastěji popisované rizikové faktory rozvoje NASH patří nepochybně inzulinová rezistence, která podněcuje lipolýzu a přesun volných mastných kyselin do jater, dále podporuje glukoneogenezi a snižuje tvorbu glykogenu. Dalším následkem je inhibice β -oxidace mastných kyselin v mitochondriích, a tedy snížení možnosti jejich využití, které je plynule následováno stimulací k novotvorbě triglyceridů. Všechny tyto pochody ústí v další akumulaci triglyceridů v jaterní tkáni. Steatózou postižené hepatocyty zpětně podporují inzulinovou rezistenci jaterní i periferní tkáně a vzniká tak začarovaný kruh [31, 33, 35].

Obezita a zvýšený energetický příjem jsou dalšími příčinami rozvoje NASH. V rámci obezity jako takové se ve spojitosti s NASH nejčastěji hovoří o obezitě viscerální, pro kterou je specifické ukládání tuku v abdominální krajíně a okolo orgánů. Pacienty jsou nejčastěji lidé, jejichž hmotnost se pohybuje v rozmezí 10 - 40 % nad jejich ideální hmotností. U pacientů trpících morbidní obezitou (BMI nad 40) pozorujeme NAFLD vždy, NASH potom v 58 % případů. Kromě patologicky vysoké hmotnosti patří mezi rizikové faktory i náhlé změny hmotnosti včetně hubnutí nebo stav vyžadující dlouhodobou parenterální výživu, která má nevhodně nastavené spektrum živin. Zmnožená tuková tkáň působí jako zdroj a aktivátor zánětových cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF- α), které indukují zánět jaterní tkáně a její přestavbu [32, 33, 35].

Za další rizikový faktor je považováno mužské pohlaví, a to zejména ve spojitosti s abdominální obezitou, která je považována za androgenní typ. Pro ženy působí jako ochranný faktor estrogen, který podporuje využívání tuku (včetně abdominálního) jako zdroje energie. Zlomovým obdobím pro ženy se potom stává menopauza, kdy hladiny estrogenu klesají [32, 36].

S tím souvisí další rizikový faktor, kterým je věková hranice stanovená na 50 let. Pacienti ve věku 50 – 60 let věku tvoří 70 % nově diagnostikovaných [31, 32, 36].

Již výše zmíněný metabolický syndrom je nejen následkem NASH, může být také jeho příčinou v případě, že je diagnóza MS stanovena v době, kdy se NASH ještě neprojevila. V takovém případě působí MS akceleraci její manifestace [35].

Nález NASH není podmíněn přítomností všech rizikových faktorů najednou, ve většině případů však působí tyto faktory v součinnosti a vzájemně se stimulují.

Vzhledem ke klíčovým rizikovým faktorům směřuje v dlouhodobě doporučovaná terapie NASH zejména k úpravě životního stylu, zvýšení fyzické aktivity a redukci nadváhy. Taková terapie je vhodná jak proto, že je stále nejúčinnější, tak i proto, že se jedná o léčbu kauzální [31, 33].

1.7.2. Patofyziologie NASH

Progrese NASH je indukována zejména zánětovými cytokiny a enzymy, které se podílí na lipolýze a lipogenezi.

Viscerální tuk produkuje mnoho adipokinů s výraznou prozánětlivou aktivitou, které dále prohlubují insulinovou rezistenci (případně i již rozvinutý diabetes mellitus II. typu). Mezi takové adipokiny patří IL-6, MCP-1 (macrophage chemoattractant protein 1), resistin, leptin a další. Současně jsou v úzké vazbě na obezitu i hladiny dalších zánětových cytokinů, které v případě obezity narůstají. Ze zmíněných faktorů je v patogenezi NASH nejdůležitější TNF- α . [36].

Metabolické následky insulinové rezistence vedoucí k akumulaci triglyceridů v hepatocytech jsou popsány výše v rámci rizikových faktorů.

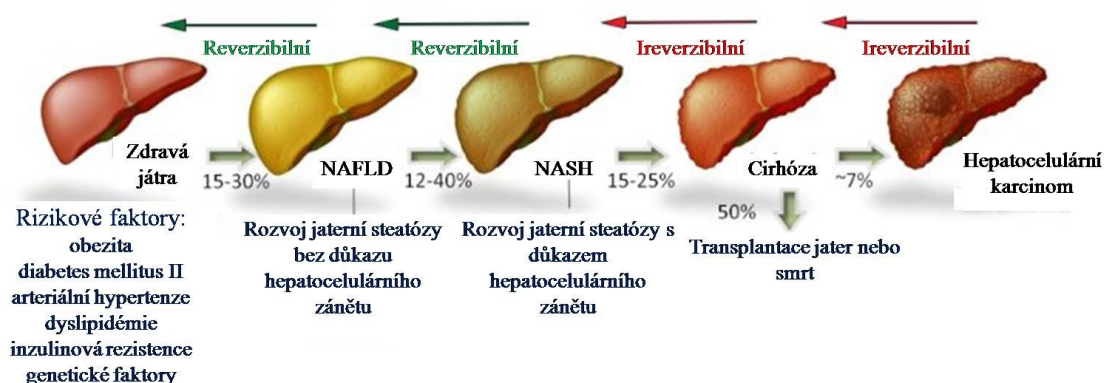
Volné mastné kyseliny vyskytující se v jaterních buňkách cestou přes indukci exprese FAS molekul na povrchu vedou k buněčné smrti. Jejich další schopností je narušení stability lyzozomů a aktivace transkripčního faktoru NF-kB (nukleární faktor kappa B). NF-kB následně způsobí akceleraci produkce zásadního TNF- α , který má na svědomí nekrózu tkáně a další prohlubování insulinové rezistence. Dále také inhibice dýchacího řetězce mitochondrií je zapříčiněna vysokými hladinami volných mastných kyselin v hepatocytech. Jeho inhibice ústí v produkci ROS (reactive oxygen species), klíčového mediátoru oxidačního stresu tkání, a k oxidaci tuků. Výsledkem je narušení mitochondriální genetické informace. Na genetické poškození reagují mitochondrie spuštěním enzymatické kaskády vedoucí jednak ke snížení ROS, dalším výsledkem je ovšem také snížená tvorba ATP. Hepatocyt chrání se před oxidačním stresem si tak může přivodit buněčnou smrt na nedostatek energie [32, 33].

Mimo rozvoj zánětlivé reakce tkáně, která je iniciována mnoha cytokiny, a případné nekrózy buněk může v rámci NASH docházet také k fibrotizaci (zvázivování) tkáně, a tedy ke ztrátě jejích metabolických schopností. Fibrotizaci tkáně působí opět zánětové cytokiny, kromě nich také adipokiny, zejména leptin. Dalším faktorem stojícím za fibrotizací jaterní tkáně je angiotensin II, jehož hladiny jsou u pacientů s MS vysoké. Angiotensin II má indukční vliv na množení a migraci jaterních hvězdicovitých buněk, které produkují kolagen [33].

V rámci patogeneze NASH není možné určit přesnou posloupnost jednotlivých patologických dějů, jelikož probíhají v součinnosti a vzájemně se indukují. Mnohé z nich svou aktivitou pozitivně stimulují i sebe sama, čím se metabolismus dostává do začarovaného kruhu. Nepochybné je, že obezita a metabolický syndrom podněcují

v organismu zánětlivé procesy, jejichž výsledkem je oxidační stres, produkce reaktivních radikálů, zánětlivých cytokinů (v čele v TNF- α) a oxidace tuků [33].

Obrázek 8. Fáze NAFLD a NASH, převzato, upraveno [34]



1.7.3. Klinické důsledky NASH

Klinické důsledky vycházejí z patogeneze NASH. Rozvíjející se fibrotizace a nekróza zánětem postižené jaterní tkáně vede k rapidnímu poklesu fyziologické funkce jater v metabolických procesech. Výsledkem jsou zvýšené hladiny LDL a triglyceridů, dochází také k nárůstu glykémie. Prohlubuje se insulínová rezistence, diabetes mellitus II. typu a obezita. Hladiny HDL s protektivním vlivem naopak klesají.

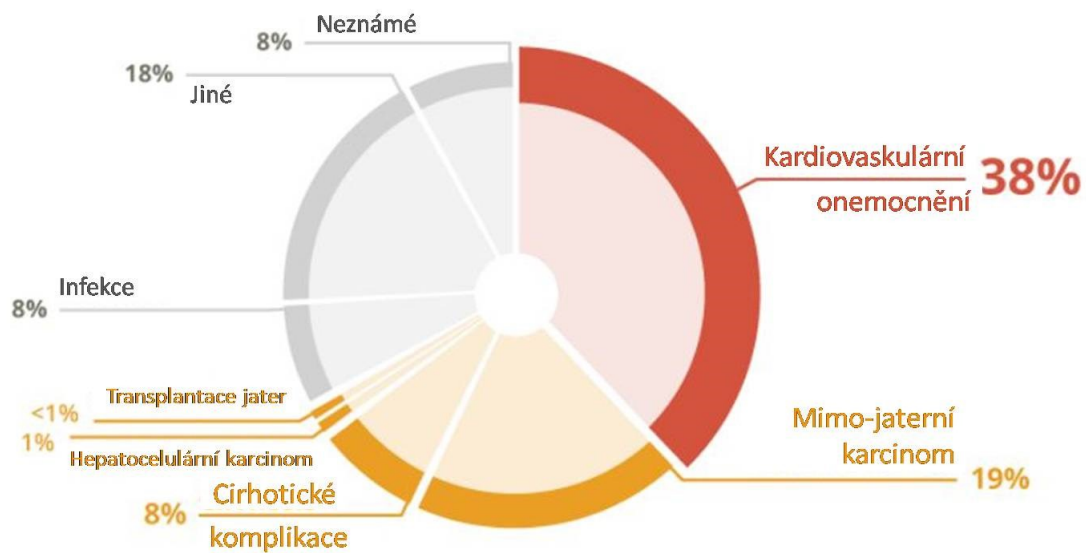
Následky NASH tedy ovlivňují nejen jaterní tkáň, ale patologickým rozvratem metabolických funkcí i periferní tkáň. Komplikací zůstává, že se NASH může dlouhé roky vyvíjet bez příznaků, a tedy bez vědomí pacienta. Podobně jako NASH se mohou léta šířit i klinické následky. V okamžiku diagnózy je potom o to těžší terapeuticky řešit již pokročilá stádia konsekvencí [35, 37]

Diagnóza NASH je silným promotorem manifestace kardiovaskulárních onemocnění, která jsou dokonce nejčastější příčinou smrti u pacientů s NASH. Velmi často dochází k rozvoji masivní endotelové dysfunkce, aterosklerózy, arteriální hypertenze, infarktu myokardu a periferním cévním příhodám [35, 36, 37, 38].

Dlouhodobý vliv NASH na játra se může vyvinout v cirhózu, jaterní selhání nebo hepatální malignity. V některých případech jsou pacienti indikováni k transplantaci jater.

Rakovinové bujení ovšem nemusí být specificky spjata pouze s jaterní tkání. Velmi často také dochází k rozvoji malignit jiných orgánů anebo k tvorbě metastáz [35].

Obrázek 9. Příčiny úmrtí u pacientů s diagnózou NASH, převzato, upraveno [37]



1.8. Myší modely aterosklerózy

Myš jako modelový organismus pro studium aterosklerózy a NASH je vhodná z několika důvodů. Jedná se o savce, což je velmi důležité pro možnost případného použití výsledků studií pro člověka. Velkou výhodou je také možnost aplikace genového inženýrství a úpravy genotypu. U myši je navíc unikátní možnost knock-outování nebo přesunutí endogenních genů, čehož je při experimentálních studiích hojně využíváno. Myš má velmi krátkou generační periodu, což je dalším pozitivem pro pozorování člověkem. V rámci každé generační periody se rodí velké množství potomků. To dává možnost vytvářet studie s velkým množstvím sledovaných objektů. Mezi další výhody patří finanční dostupnost a snadné udržení chovu, malá velikost myši, schopnost vytváření aterosklerotických a NASH indukovaných defektů až do pokročilých fází. Malá velikost myši je výhodná i pro malou spotřebu zkoumaných látek, které jsou v počátcích výzkumu dostupné většinou v omezeném množství. Při následném zkoumání tkání může být malá velikost organismu naopak nevýhodou [39, 40, 41].

Ačkoli je myš vhodným organismem pro experimentální studie, lipidový profil myši se velmi odlišuje od lipidového profilu člověka. U člověka tvoří až 75 % plazmatického cholesterolu LDL, zatím co u myši tvoří většinu ateroprotektivní HDL. Z toho vyplývá, že při použití běžné (tzv. chow-type) diety myš aterosklerózou netrpí. Z toho důvodu se při studiích pracuje a geneticky modifikovanými kmeny myši a s dietami cíleně indukujícími změnu lipidového profilu [40].

Nejpoužívanějšími geneticky modifikovanými myšími modely aterosklerózy jsou apolipoprotein E deficitní (ApoE^{-/-}) myši a LDL receptor deficitní (LDLR^{-/-}) myši [39, 40, 41].

1.8.1. Experimentální diety myších modelů

1.8.1.1. Diety indukující aterosklerózu

Myš je přirozeně silně rezistentní vůči aterosklerotickým procesům. V případě běžné (tzv. chow-type) diety se ateroskleróza neprojeví vůbec, v případě úpravy diety na vysokotukovou se sice ateroskleróza může manifestovat (potvrzená tvorba lézí je zejména

u myšího kmenu C57BL/6), ale nevyvíjí se do všech stádií, která je třeba pozorovat. Také histologický nálezn myších aterosklerotických lézí se liší od nálezů humánních. Podobně nekomplexní aterosklerotické léze se vytvářejí u geneticky modifikovaných kmenů. Z toho důvodu se pro experimentální výzkumy aterosklerózy využívá převážně kombinace těchto metod, tedy ApoE^{-/-} nebo LDLr^{-/-} myši převedených na tzv. western-type dietu [40].

Historický vývoj vysokotukové diety vhodné pro výzkum aterosklerózy na myších modelech se začal psát již v šedesátých letech 20. století. Wisslerova laboratoř připravila dietu sestávající z 30 % tuku, 5 % cholesterolu a 2 % cholových kyselin, která vedla k rozvoji aterosklerózy. Tato dieta byla ovšem nevyhovující a silně toxická. Dalším krokem byl vývoj tzv. Paigenovy diety, která se skládala z 15 % tuku, 1,25 % cholesterolu a 0,5 % cholových kyselin. Ačkoli dávka cholesterolu je i v tomto typu diety extrémní, aterosklerotické léze byly stále malé a histologicky se lišily od lézí pozorovaných u člověka. Hlavní složkou detekovaných ložisek byly makrofágy a nedocházelo k tvorbě fibrózních plátů. Dieta navíc také působila značně toxicky. V dnešní době je uznávána dieta, za kterou stojí Hayek et al. (tzv. western-type diet). Její složení je 20 % tuku, 0,15 % cholesterolu, žádné cholové kyseliny. Krměním nemodifikovaných myší touto dietou dochází ke zdvojnásobení hladin plazmatických lipidů, u ApoE^{-/-} myší se hladiny dostávají až ke 51,7 mmol/l a pozorujeme tvorbu komplexních fibrózních plátů již po 5 týdnech [39, 40].

Apolipoprotein E je strukturální komponentou všech lipoproteinů včetně LDL a je klíčovým ligandem pro LDL receptor, který se podílí na hepatální clearance plazmatických lipoproteinů. Navzdory použití chow-type diety ApoE^{-/-} myši vykazují hypercholesterolémii. Z toho důvodu není zapotřebí toxických diet, které byly používány historicky, a je možné provádět déle trvající studie s možností pozorování vývoje aterosklerotických procesů. U ApoE^{-/-} myší dochází k zásadnímu posunu lipidového spektra směrem k proaterogennímu VLDL a LDL a spontánně vzniklé aterosklerotické defekty jsou výrazně podobnější lidským [39].

Myši s knock-outovaným LDL receptorem (LDLr^{-/-}) jsou modelem familiárních hypercholesterolémií. Změna plazmatických hladin těchto myší je při srovnání s ApoE^{-/-} mírnější a při podávání chow-type diety k rozvoji aterosklerózy nedochází. Vliv této genetické modifikace je však použitou dietou silně ovlivňován. Použití Paigenovy

diety způsobí zvýšení hladin plazmatických lipidů na 38,8 mmol/l a formaci rozsáhlých aterosklerotických ložisek. U studií využívajících méně toxickou tzv. western-type dietu též pozorujeme vznik komplexních aterosklerotických lézí a hladiny krevních lipidů okolo 10,34 mmol/l [39, 40].

Mimo výše zmíněné modifikace jsou v současné době pro výzkum k dispozici i dvojitě knock-outované myši (ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-}) a mnoho dalších geneticky modifikovaných kmenů.

1.8.1.2. Diety indukující NASH nebo poškození jater

Za nejvhodnější myší kmen pro výzkum NASH je shodně jako u aterosklerózy považován kmen s označením C57BL/6 [42, 43].

Složení NASH indukujících diet se liší v závislosti na požadovaném stupni adipozity a dyslipidémie v rozmezí 40 - 70 % tuku a 0,1 - 2 % cholesterolu. Hlavním limitem takových diet je, že bez ohledu na délku diety (zpravidla 20 - 30 týdnů) se většinou rozvíjí dyslipidémie, ztukovatění jater, mírná forma NASH, ale bez znatelné fibrózy. Z toho důvody byly zkoumány další možné komponenty ideální diety, která by indukovala masivní zánět a fibrózu. Vysokotuková dieta je tak často doplněna glukózou či fruktózou. Mimo vysokotukových jsou dnes používány i jinak koncipované diety. (viz Tabulka 1) [42, 43].

Kromě diet postavených na bázi zvýšení dávek určitých živin (tuk, cholesterol, fruktóza) jsou vyvinuty i diety se základem ve snížení či úplné depleci některé ze složek potravy. Příkladem mohou být cholin-deficitní (CD), metionin-deficitní (MD) nebo i dvojitě methionin-cholin deficitní (MCD) typy diet, které jsou také při experimentálních studiích NASH využívány. [42, 43].

Vysokotuková dieta je nejběžnějším modelem pro studium obezity, insulinové rezistence a steatózy jater. Dieta založená na 40 - 60 % tuku je často složená z nasycených tuků pocházejících z vepřových tkání a nenasycených tuků z kukuřičného oleje. Zásadní je délka terapie. Po 10 týdnech můžeme pozorovat obezitu, glukózovou intoleranci a NAFLD. Po více jak 10 týdnech se začíná rozvíjet steatóza a až po více jak 40 týdnech udržování diety se začíná projevovat mírný zánět značící NASH. Vysokotuková dieta u

myši dále indukuje zvýšenou křehkost kostí a redukcí metabolické aktivity hematoencefalické bariéry [42].

Upravená „tzv. western-type“ dieta je vysokotuková dieta doplněná o fruktózu a sacharózu. Příkladem může být ALIOS dieta (American lifestyle-induced obesity syndrome), která poskytuje 45 % energie z tuku a kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktózy přidávaný do vody k pití. Po 24 týdnech krmení byl pozorován limitovaný rozvoj NASH s malým počtem zánětlivých ložisek. V hepatocytech ale dochází k značné indukci exprese TNF- α . Z toho vyplývá, že u upravené „tzv. western-type“ diety je pro studium NASH třeba dodržet trvání minimálně po 4 měsíce [42].

Karbohydráty obohacená dieta je podmíněna vysokými dávkami fruktózy a sacharózy. Studie potvrdily zvýšenou náchylnost myši ke glukózové intoleranci, inzulinové rezistenci a hepatální steatóze. Po 16 týdnech diety se však hladiny zánětlivých faktorů příliš nelišily od skupiny krmené vodou bez aditiv. Chronické podávání vody k pití s 30 % fruktózy způsobuje zvýšení portálního endotoxinu a TNF- α . Tento model diety je vhodný pro studium počátečních fází NAFLD [42].

Methionin a cholin deficitní diety jsou často používané pro studium NASH. Methionin je esenciální aminokyselinou a donorem methyly. Cholin slouží jako prekursor syntézy fosfatidylcholinu a podílí se na exportu triglyceridů z hepatocytů prostřednictvím VLDL. Většinou se tyto diety skládají z tuku (obvykle okolo 20 % kcal) a vysokého obsahu cukru (většinou 45 - 60 % kcal z karbohydrátů). Hlavní výhodou využívání diet zakládajících se na depleci metioninu či cholinu je indukce histologických znaků typických pro NASH, které zahrnují fibrózu, v kratším časovém období než při použití obezitu-indukujících diet. Konkrétně se jedná o 3 - 4 týdny. Do této kategorie řadíme cholin-deficitní (CD), methionin-deficitní (MD) nebo i dvojitě methionin-cholin deficitní (MCD) diety. Patofyziologie MCD diety stojí na narušení β -oxidace a zvýšení produkce ROS vedoucí k oxidačnímu stresu. Nevýhodou jinak vysoce NASH indukujících MCD diet je nástup kachexie a ztráta až 50 % tělesné hmotnosti v průběhu diety [42, 43].

Pro indukci NASH se u myši nevyužívá pouze diet. Podobně jako pro studie aterosklerózy jsou k dispozici i mnohé geneticky upravené myši kmeny se zvýšenou náchylností k manifestaci NASH. Největší význam má leptin-deficitní kmen (značen ob/ob) a kmen s chybějícím leptinovým receptorem (značen db/db). Využíván je také kmen s knock-outovaným receptorem pro LDL, který byl zmíněn u aterosklerotických

myších modelů. Velmi často jsou také v experimentálních studiích aplikovány kombinované metody (tj. použití NASH indukující diety pro geneticky modifikovaný kmen náchylný k NASH [42, 43].

Tabulka 1. Myší modely používané pro studie NAFLD a NASH, převzato [42]

Model	Description	Obesity	Insulin resistance	Steatosis	Hepatocyte ballooning	Inflammation	Fibrosis	Disease phenotype
Genetic	<i>ob/ob</i> mice	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	NAFLD
	<i>db/db</i> mice	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	NAFLD
<i>LDLr^{-/-}</i> mice	'second-hit' for steatohepatitis	Yes	Yes (with high-fat diet)	Yes	Yes	Yes	Minimal	NASH
	High-fat diet feeding >16 weeks	Yes	Yes (with high-fat diet)	Yes	Yes	Yes	Minimal	NASH
Dietary	High-fat diet	Yes	Mild	Yes	Uncommon	No	No	NAFLD
	High-fat diet <10 weeks	Yes	Yes	Yes	Yes	Minimal	Minimal	NASH (mild)
	High-fat diet >20 weeks	Yes	Mild	Yes	Minimal	Minimal	No	NAFLD
	High in fat, cholesterol and supplemented with fructose <10 weeks	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Minimal	NASH
Westernised diet	High in fat, cholesterol and supplemented with fructose >20 weeks	Yes	Yes	Minimal	No	No	No	NAFLD
	High in refined carbohydrates, sucrose or fructose >20 weeks	No	No	Yes	Yes	Yes	Minimal	NASH
Carbohydrate-enriched diet	3 weeks of feeding	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	NASH (mild fibrosis)
Methionine- and choline-deficient diet	>4 weeks of feeding	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	NASH (mild fibrosis)

1.9. Imunohistochemické metody

Hlavním principem imunohistochemických metod je vysoce specifická reakce protilátky (obvykle volné) a tkáňového antigenu (zpravidla pevně vázaného na tkáňové struktury – např. povrchu buňky) prostřednictvím imunologické vazby. Dochází tak ke vzniku stabilního komplexu antigen-protilátka [44, 45].

Imunohistochemické metody jsou využívány pro prokázání specifických antigenních jednotek ve tkáni [44].

1.9.1. Protilátky

Monoklonální protilátky pocházejí z jednoho klonu B-lymfocytů. Jejich vazebná specifita je omezena pouze k jednomu druhu antigenu. Původci monoklonálních protilátek jsou tzv. hybridomy, které vznikají fúzí B-lymfocytů a neoplastických myelomových buněk [44, 47].

Polyklonální protilátky mají původ v mnoha aktivovaných klonech B-lymfocytů, což je příčinou jejich zaměření proti širšímu spektru epitopů jednoho antigenu, případně proti více antigenům. Jejich získávání je levnější, rychlejší a méně technologicky náročné než v případě monoklonálních protilátek. Jako polyklonální protilátky jsou často používána séra antigenem imunizovaných laboratorních zvířat [44, 47].

1.9.2. Přímá a nepřímá imunohistochemie

Při použití **přímé imunohistochemické metody** se označená protilátka navrství na tkáňový řez. Následně dochází ke specifické reakci s detekovaným antigenem a vzniká označený komplex antigen-protilátka. Přímé metody jsou nejjednoduššími imunohistochemickými metodami, pro nízkou citlivost jsou ale použitelné pouze v případech, kdy je v tkáni antigen přítomen v dostatečně vysoké koncentraci. Využití nachází zejména v nativních řezech, pro parafinové řezy je citlivost příliš nízká [44, 45].

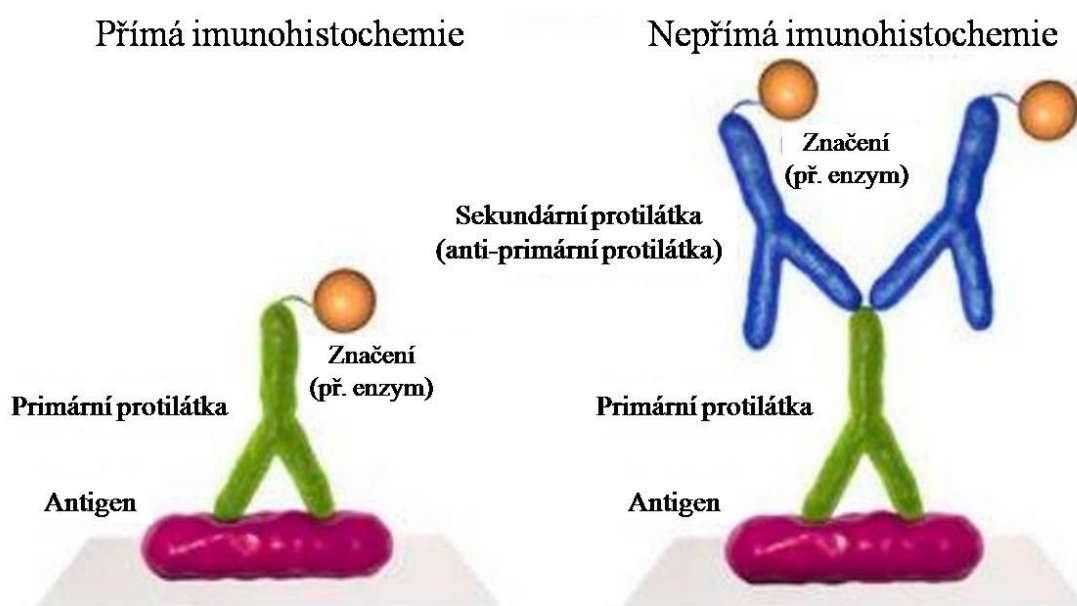
Nepřímé dvojstupňové metody jsou v porovnání s přímými složitější, poskytují ale větší citlivost. V prvním kroku se na vzorky nanáší neznačená primární protilátka (imunoglobulin) nebo sérum specifické proti dokazovanému antigenu. Přebytečná primární protilátka se následně opláchnou. V druhém kroku se aplikuje anti-

imunoglobulinové sérum (sekundární protilátka), která vykazuje schopnost specifické vazby ke konstantním fragmentům imunoglobulinů primární protilátky. I v tomto případě pozorujeme vznik antigen-protilátkových komplexů [44, 45].

Nepřímé trojstupňové metody se využívají v případech, kdy je koncentrace antigenu ve studované tkáni příliš malá a signál je potřeba amplifikovat. První krok zahrnuje reakci primární specifické protilátky s detekovaným antigenem. V druhém kroku se váže neznačená sekundární protilátka specificky na imunoglobuliny primární protilátky a dochází k vytvoření tzv. můstku. Na můstek tvořený sekundární protilátkou se ve třetím kroku váže značený komplex. Trojstupňová metoda přináší ještě větší citlivost, je však pracnější a časově náročnější. Mezi tyto metody patří příkladem PAP metoda nebo metodika využívající ABC komplex [44].

Značení protilátek se v imunohistochemii provádí pomocí různých činidel – tzv. markerů. Standardně se využívají enzymy (nejčastěji např. křenuv peroxidáza nebo alkalická fosfatáza – imunoenzymové metody), fluorochromy (např. fluorescein-isothiokyanát – imunofluorescenční metody), komplexně vázané kovy (např. Fe^{3+} ve feritinu – imunometalické metody) a radioizotopy (např. radioaktivní jód – radioimunohistochemické metody) [45].

Obrázek 10. Schéma přímé a nepřímé imunohistochemie, převzato, upraveno [46]

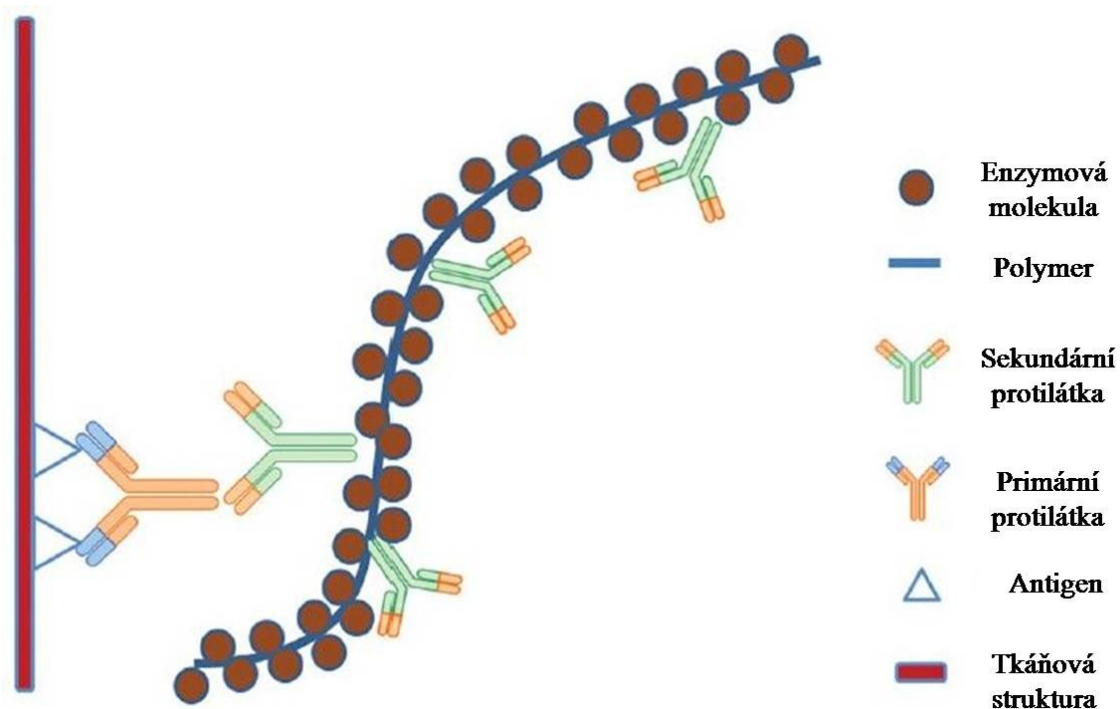


1.9.3. EnVision® metodika

Jedná se o nepřímou dvoustepňovou metodiku, kde důležitou roli sehrávají dextranové polymery. Na primární protilátka aplikovanou v prvním kroku se v druhém kroku váže sekundární protilátka, která je společně s molekulami křenové peroxidázy (HRP – horseradish peroxidase), popř. alkalické fosfatázy (AP – alkaline phosphatase), ukotvena na polymeru dextranu. Jeden polymerový konjugát může obsahovat až 100 enzymových molekul a až 20 molekul sekundární protilátky. Výsledkem metody je barevná reakce označující prokazovaný antigen [48, 49].

Výhodami EnVision® metodiky je vysoká citlivost, minimální nespecifická reakce a snížený počet jednotlivých kroků ve srovnání s konvenčními metodami [48, 49].

Obrázek 11. Schéma EnVision® metodiky, převzato, upraveno [50]



1.9.4. ImmPress™ metodika

Činidlem pro ImmPress metodiku je mikropolymer s vysoce aktivní křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou, který se bez využití jiného makromolekulárního nosiče váže na sekundární protilátku. ImmPress metodika poskytuje velkou citlivost pro detekované antigeny (zejména jaderné a membránové), vysoce specifickou vazebnost a intenzivní výsledné signály bez rušivého nespécifického zbarvení pozadí [51, 52].

Obrázek 12. Schéma ImmPress™ metodiky, převzato, upraveno [52]



1.9.5. ABC (Avidin-Biotin Complex) metodika

Nepřímá imunohistochemická metoda využívající ABC komplex je běžně používaným standardem, který poskytuje vysokou citlivost [51, 53].

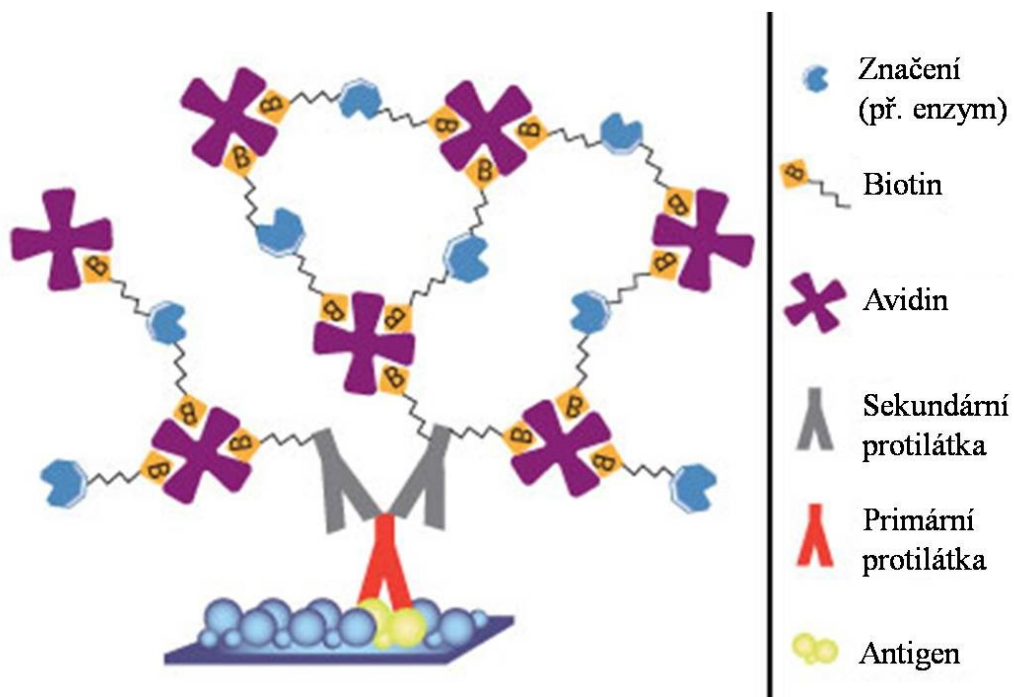
Vaječný glykoprotein avidin, který může být označen peroxidázou nebo fluoresceinem, se vyznačuje velkou afinitou a prakticky ireversibilní vazbou k biotinu. Biotin je nízkomolekulární vitamin, který může být konjugován s řadou molekul včetně protilátek [51].

Metodika obsahuje tři kroky. V prvním kroku je na detekovaný antigen navázána primární protilátka, ve druhém následuje nanosení biotinylované sekundární protilátky. Ve třetím kroku je aplikován avidin-biotin peroxidázový komplex, který je potřeba připravit s předstihem, aby mohla proběhnout inkubace komplexu [53].

Avidin má 4 shodné podjednotky, kdy každá z nich může vázat jednu molekulu biotinu. Některé z podjednotek váží biotin v komplexu, jiné se váží na biotinylovanou sekundární látku za vzniku enzymové sítě. Tak získáme vyšší počet molekul enzymu

vázaných k jedné molekule dokazovaného antigenu a po přidání enzymatického substrátu i potřebnou amplifikaci signálu [53].

Obrázek 13. Schéma ABC (Avidin-Biotin Complex) metodiky, převzato, upraveno [53]



2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zdokumentovat expresi adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 na endotelu aorty myši kmene C57BL/6 a porovnat změny v této expresi mezi experimentální skupinou, která byla krmena dietou indukující NASH (tzv. „FFC-type diet“), a kontrolní skupinou, která měla standardní dietu (tzv. „chow-type diet“). Analýza modelů byla provedena biochemicky a imunohistochemickými metodami.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité myší modely

Studie s použitím myších modelů splňuje etická kritéria pro experimentální použití laboratorních zvířat. Protokoly byly schváleny Etickou komisí na ochranu zvířat proti týrání na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze. Pokusy byly prováděny v souladu se zákonem České národní rady č.246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v aktuálně platném znění.

Do této studie byli zařazeni desetitýdenní samci myší kmene C57BL/6 (Velaz Česká republika), které byly náhodně rozděleny do dvou skupin po pěti zvířetech. Skupina označená jako experimentální byla po dobu 25 týdnů krmena NASH indukující dietou, která se skládala ze 40 % kalorií z tuku a 0,2 % z cholesterolu (AIN-76A Western Diet, TestDiet, St. Louis, MO) a exogenního přídatku fruktózy a glukózy do vody k pití v koncentraci 42 g/l (tzv. FFC-type diet). Kontrolní skupina byla po stejnou dobu krmena standardní dietou pro hlodavce (tzv. chow-type diet). Během studie nebyly zaznamenány rozdíly v konzumaci stravy jak mezi skupinami, tak i rámci jednotlivých skupin.

Obrázek 14. Myš kmene C57BL/6, převzato [54]



3.2. Příprava vzorků

Po 25 týdnech byly myši po jednodenním lačnění usmrceny cervikální dislokací. Pro imunohistochemickou analýzu byly odebrány vzorky z místa výstupu aorty ze srdce (arcus aortae - typické predispoziční místo pro rozvoj aterosklerózy) společně s přibližně 2 mm myokardu.

Následně byly preparáty zality do kryoprezervačního média (Leica, Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems, Richmond, Inc., REF: 14020108926) a uloženy na 24 hodin do mrazáku s teplotou -20 °C. Poté byly preparáty přesunuty do mrazáku s teplotou -80 °C, kde se mohou dlouhodobě skladovat.

Vzorky byly na kryostatu nakrájeny na řezy o síle 5 - 7 μm , každý vzorek poskytl 30 řezů. Řezy byly umístěny na želatinou potažená sklíčka a imunohistochemicky obarveny.

3.3. Použité metody

3.3.1. Imunohistochemie

Použitá činidla

PBS (phosphate-buffered saline):

NaCl	80,0
KCl	2,0
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	11,5
(nebo Na ₂ HPO ₄)	10,21)
KH ₂ PO ₄	2,0
Aqua bidestilata	ad 1000,0

Takto připravený roztok solí má pH 6,8 a slouží jako pufr. Pro experiment byl použit PBS o pH 7,4, který byl připraven naředěním PBS (pH 6,8) destilovanou vodou v poměru 1:9.

BSA (bovine serum albumin):

BSA	5
PBS (pH 7,4)	95

Po smísení se uchovává v 1 ml zkumavkách v mrazáku.

3.3.1.1. Pracovní postup – ICAM-1 (ABC metoda)

Pro stanovení exprese ICAM-1 byla použita nepřímá trojstupňová ABC (avidin-biotin komplex) metoda.

Primární protilátka

Hamster anti Mouse

CD 34, BD Pharmingen, CAT: 550287

Sekundární protilátka

Goat anti Hamster

IgG (H+L), affinity purified, made in Goat, VectorLaboratories, Inc, BA – 9100

Po rozmrazení byla skla se vzorky ponořena do acetonu a uložena do mrazáku, kde byla ponechána 20 minut. Poté skla 15 minut osychala. Následně byly na suchých sklech zakroužkovány jednotlivé řezy. Kroužkování bylo provedeno olejovým fixem, který drží činidla analýzy na ploše řezu. Opět následovalo zaschnutí.

Dalším krokem bylo ponoření vzorků do PBS po dobu 5 minut.

Po okapání skel byly řezy pipetou na 30 minut zality mlékem (0,5g sušeného mléka do 10 ml PBS, Blotting Grade Blocker, BiORAD – Laboratories, Inc., USA, CA:# 170-6404). Mléko se nanáší pro vysycení vzorku bílkovinami, čímž zabráníme nespecifickému vychytávání protilátek. Dále následoval oplach skel v PBS a krátké oschnutí.

Pro eliminaci případné reakce s endogenním avidinem byly vzorky 15 minut inkubovány s anti-avidinem (50 μ l, AVIDIN, SP-2001, Burlingame, Kit, VectorLaboratories, Inc.) a následně ponořeny na 2 x 5 minut do PBS.

Stejně tak pro eliminaci případné reakce s endogenním biotinem proběhla 15-minutová inkubace s anti-biotinem (50 μ l, BIOTIN, SP-2001, Burlingame, Kit, VectorLaboratories, Inc.) následovaná oplachem v PBS.

Dále byla na 60 minut aplikována primární protilátka a po jejím hodinovém působení byla skla na 2 x 5 minut ponořena do PBS.

Následovalo nanesení sekundární protilátky, která působila po dobu 30 minut. Po této fázi byla skla na 5 minut ponořena do PBS.

Pro zablokování reakce tkáňové peroxidázy (a tím také pro předejití případné nespecifické reakci), byla skla na po dobu 15 minut ponechána v roztoku 3% H₂O₂, který byl připraven smísením 8 ml H₂O₂ + 70 ml PBS. Po tomto kroku byla skla opět ponořena na 2 x 5 minut do PBS.

V dalším kroku byl na vzorky nanesen roztok ABC komplexu (Komplex – Elite – Kit, Vector Laboratories, Inc., CA 94 010). Ten je nutno připravit 30 minut předem smísením 10 µl složky A, 10 µl složky B a 500 µl PBS. Opět následovalo ponoření na 2 x 5 minut do PBS.

Posléze došlo k reakci s chromogenem DAB (3,3'-diaminobenzidin, 10 µl DAB v 500 µl pufru, DAB SubstrateKit, ab64238, DAB Substrate + Chromogen, Abcam USA). Je velmi důležité přesně odměřit čas, po který reakce probíhá. Při této studii DAB reagoval se vzorky 5 sekund. V tomto kroku došlo k reakci peroxidázy, která je vázána na ABC komplexu, s přidaným chromogenem DAB. Oxidace činidla DAB poskytuje hnědé zbarvení tkáně se specifickou reakcí.

Po přesně odměřeném čase reakce s DAB byla skla přesunuta do kyvety s destilovanou vodou.

Následně byla skla se vzorky ponořena na 5 vteřin do roztoku hematoxylinu, který způsobí obarvení buněčných jader do modra.

Dalším krokem bylo minutové proplachování skel pod mírným proudem tekoucí vody. Během této fáze došlo postupnému modrání jader.

Pro odvodnění vzorků byla skla ponořena do roztoku acetonu, následně do roztoku aceton-xylen (10:1) na 3 minuty a dále do roztoku aceton-xylen (1:10), také po dobu 3 minut.

V další fázi byla sklíčka ponořena do roztoku xylenu, třikrát po sobě, pokaždé po dobu 2 minut.

Posledním krokem byla fixace vzorků pomocí montážního média (Eukit) a krycích sklíček.

Pracovní protokol ICAM-1

1.	PBS	5 minut
2.	Mléko	30 minut
3.	Anti-avidin	15 minut
4.	PBS	2 x 5minut
5.	Anti-biotin	15 minut
6.	PBS	oplach
7.	Primární protilátka (rozpuštěná v BSA)	60 minut
8.	PBS	2 x 5 minut
9.	Sekundární protilátka (rozpuštěná v BSA + 2% myší sérum)	30 minut
10.	PBS	5 minut
11.	3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS)	15 minut
12.	PBS	2 x 5 minut
13.	ABC komplex elite (10 µl A + 10 µl B do 500 µl PBS (30 minut))	30 minut
14.	PBS	2 x 5 minut
15.	DAB (10 µl DAB v 500 µl pufru)	5 sekund
16.	Destilovaná voda	
17.	Hematoxylin	5 sekund
18.	Proplach pod tekoucí vodou, modrání	1 minuta
19.	Aceton	oplach
20.	Aceton-xylen (10:1) → Aceton-xylen (1:10)	3 minuty
21.	3 x xylen	2 minuty
22.	Eukit	

3.3.1.2. Pracovní postup – VCAM-1(ImmPress™ metoda)

Pro stanovení exprese VCAM-1 byla použita nepřímá ImmPress™ metoda.

Primární protilátka

Rat - anti mouse

CD 106, BD-Pharmingen, Cat: 550547

Sekundární protilátka

Impress – HRP - Reagent – Peroxidase anti RatIgG

mouseabsorbed, made in Goat, CAT: MP-7444

Po rozmrazení byla skla se vzorky ponořena do acetonu a uložena do mrazáku, kde byla ponechána 20 minut. Poté skla 15 minut osychala. Následně byly na suchých sklech zakroužkovány jednotlivé řezy. Kroužkování bylo provedeno olejovým fixem, který drží činidla analýzy na ploše řezu. Opět následovalo zaschnutí.

Dalším krokem bylo ponoření vzorků do PBS po dobu 5 minut.

Po okapání skel byly řezy pipetou na 30 minut zality mlékem (0,5g sušeného mléka do 10 ml PBS, Blotting Grade Blocker, BiORAD – Laboratories, Inc., USA, CA:# 170-6404). Mléko se nanáší pro vysycení vzorku bílkovinami, čímž zabráníme nespecifickému vychytávání protilátek. Dále následoval oplach skel v PBS a krátké oschnutí.

Dále byla na 60 minut aplikována primární protilátka a po jejím hodinovém působení byla skla na 2 x 5 minut ponořena do PBS.

Pro zablokování reakce tkáňové peroxidázy (a tím také pro předejití případné nespecifické reakci), byla skla na po dobu 15 minut ponechána v roztoku 3% H₂O₂, který byl připraven smísením 8 ml H₂O₂ + 70 ml PBS. Po tomto kroku byla skla opět ponořena na 2 x 5 minut do PBS.

Následovalo nanesení sekundární protilátky, která působila po dobu 30 minut. Po této fázi byla skla na 2 x 5 minut ponořena do PBS.

Posléze došlo k reakci s chromogenem DAB (3,3'-diaminobenzidin, 10 μ l DAB v 500 μ l pufru, DAB SubstrateKit, ab64238, DAB Substrate + Chromogen, Abcam USA). Je velmi důležité přesně odměřit čas, po který reakce probíhá. Při této studii DAB reagoval se vzorky 10 sekund. V tomto kroku došlo k reakci peroxidázy, která je vázána na Immpress reagentu, s přidaným chromogenem DAB. Oxidace činidla DAB poskytuje hnědé zbarvení tkáně se specifickou reakcí.

Po přesně odměřeném čase reakce s DAB byla skla přesunuta do kyvety s destilovanou vodou.

Následně byla skla se vzorky ponořena na 5 vteřin do roztoku hematoxylinu, který způsobí obarvení buněčných jader do modra.

Dalším krokem bylo minutové proplachování skel pod mírným proudem tekoucí vody. Během této fáze došlo postupnému modrání jader.

Pro odvodnění vzorků byla skla ponořena do roztoku acetonu, následně do roztoku aceton-xylen (10:1) na 3 minuty a dále do roztoku aceton-xylen (1:10), také po dobu 3 minut.

V další fázi byla sklíčka ponořena do roztoku xyleny, třikrát po sobě, pokaždé po dobu 2 minut.

Posledním krokem byla fixace vzorků pomocí montážního média (Eukit) a krycích sklíček.

Pracovní protokol VCAM-1

- | | | |
|-----|---|-------------|
| 1. | PBS | 5 minut |
| 2. | Mléko | 30 minut |
| 3. | Primární protilátka | 60 minut |
| 4. | PBS | 2 x 5 minut |
| 5. | 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS) | 15 minut |
| 6. | PBS | 2 x 5 minut |
| 7. | Sekundární protilátka s peroxidázou | 30 minut |
| 8. | PBS | 2 x 5 minut |
| 9. | DAB (10 µl DAB v 500 µl pufru) | 10 sekund |
| 10. | PBS | oplach |
| 11. | Hematoxylin | 5 sekund |
| 12. | Proplach pod tekoucí vodou, modrání | 1 minuta |
| 13. | Aceton | oplach |
| 14. | Aceton-xylene (10:1) → Aceton-xylene (1:10) | 3 minuty |
| 15. | 3 x xylene | 2 minuty |
| 16. | Eukit | |

3.3.2. Biochemická analýza krevních vzorků myši C57BL/6

Krevní vzorky byly odebrány před usmrcením myši C57BL/6 zařazených do studie, centrifugovány a získané sérum bylo analyzováno.

Biochemická analýza byla provedena na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové a její výsledky nám byly pro tuto práci poskytnuty.

Výsledky jsou uvedeny ve výsledkové části této práce, str. 72.

4. VÝSLEDKY

4.1. Imunohistochemie ICAM-1

Expres ICAM-1 detekovaná pomocí ABC imunohistochemické metody je patrná na endotelu řezů zobrazených na obrázcích č. 15 - 22. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou. Reprezentativní oblasti řezů jsou označeny šipkami. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.

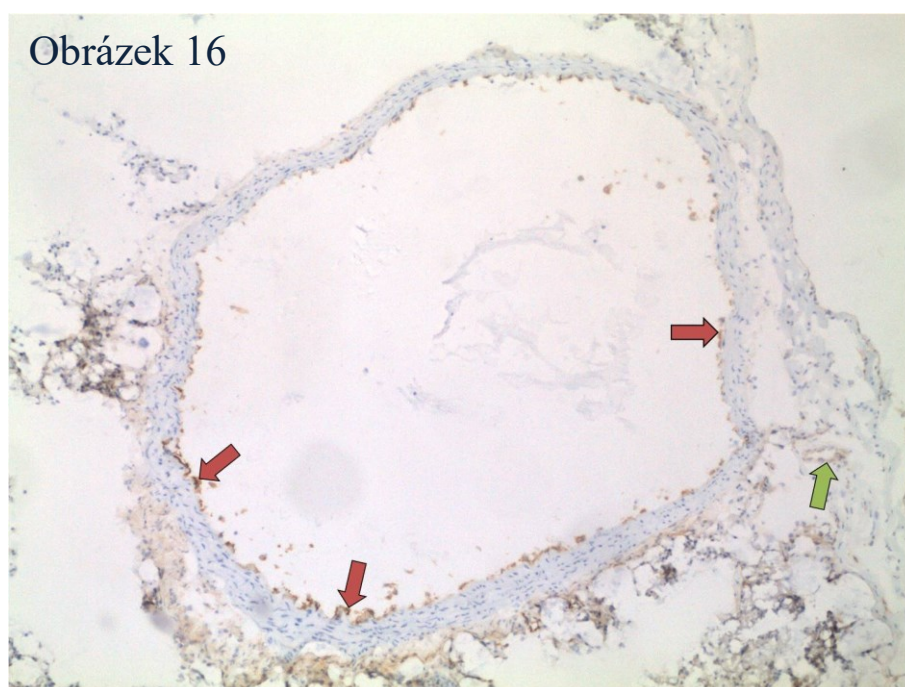
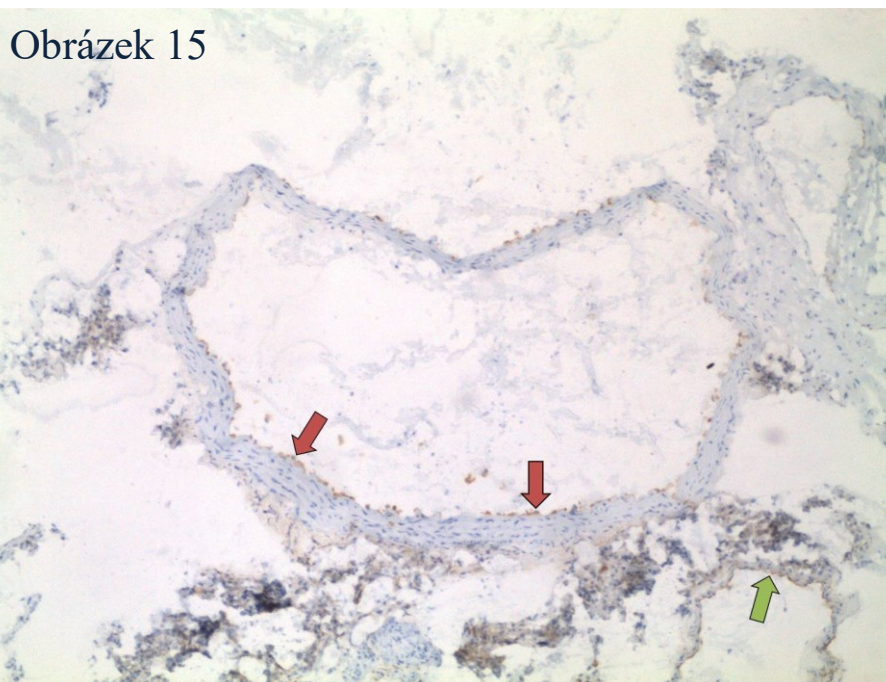
Obrázky č. 15, 16, 17 a 18 dokládají expresi adhezní molekuly ICAM-1 u kontrolní skupiny myši krmené standardní (tzv. chow-type) dietou.

Na obrázcích 19, 20, 21 a 22 je zachycena expres adhezní molekuly ICAM-1 u experimentální skupiny myši, která byla krmena NASH indukující dietou sestávající ze 40 % kalorií z tuku, 0,2 % z cholesterolu a fruktózy a glukózy přidávané do vody k pití v koncentraci 42 g/l (tzv. FFC-type diet).

Expres ICAM-1 je dobře pozorovatelná u obou skupin zařazených do studie. Při porovnání exprese ICAM-1 mezi kontrolní a experimentální skupinou nejsou patrné výrazné rozdíly.

Obrázek 15, 16. Exprese ICAM-1 (kontrolní skupina)

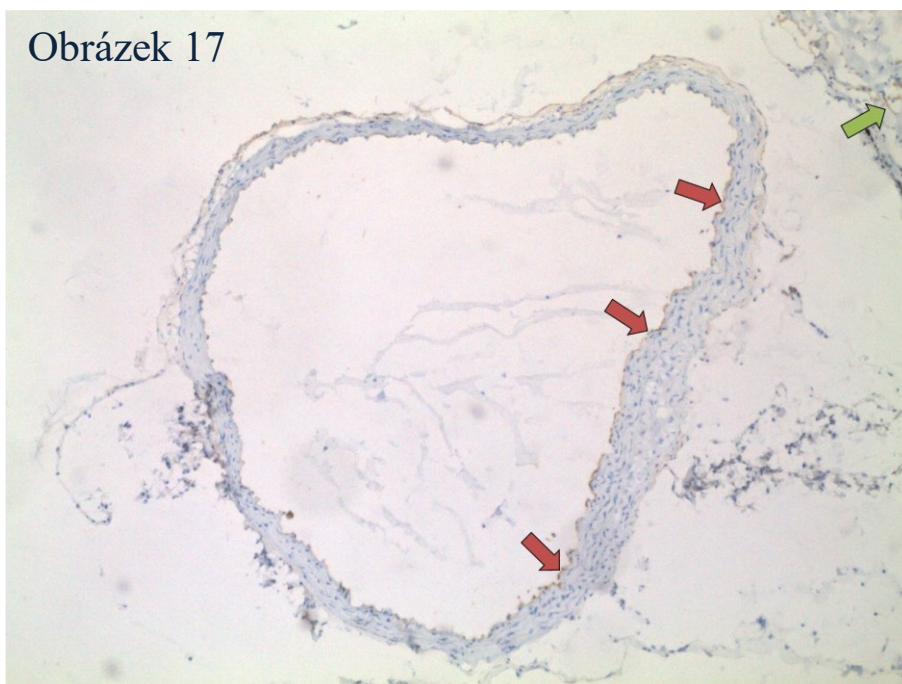
Na obrázcích 15 a 16 je patrná exprese ICAM-1 v aortě myši, které byly krmeny standardní dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Dále je na obrázcích viditelná pozitivní reakce získaná mimo endotel. Tato reakce se nachází v myokardu a je označena zelenými šipkami. Zvětšení 40krát.



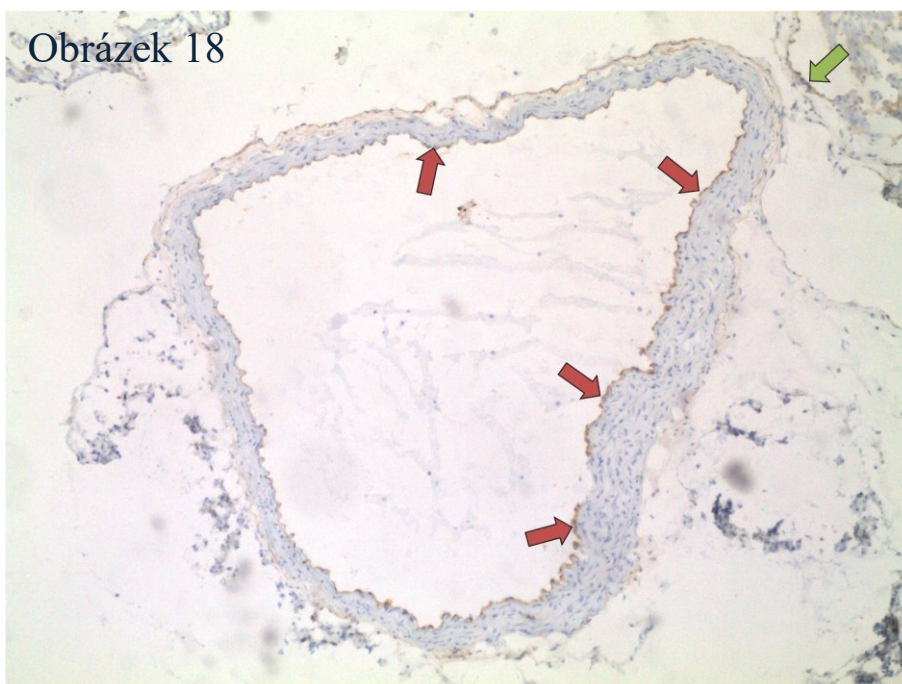
Obrázek 17, 18. Exprese ICAM-1 (kontrolní skupina)

Na obrázcích 17 a 18 je patrná exprese ICAM-1 v aortě myši, které byly krmeny standardní dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Dále je na obrázcích viditelná pozitivní reakce získaná mimo endotel. Tato reakce se nachází v myokardu a je označena zelenými šipkami. Zvětšení 40krát.

Obrázek 17

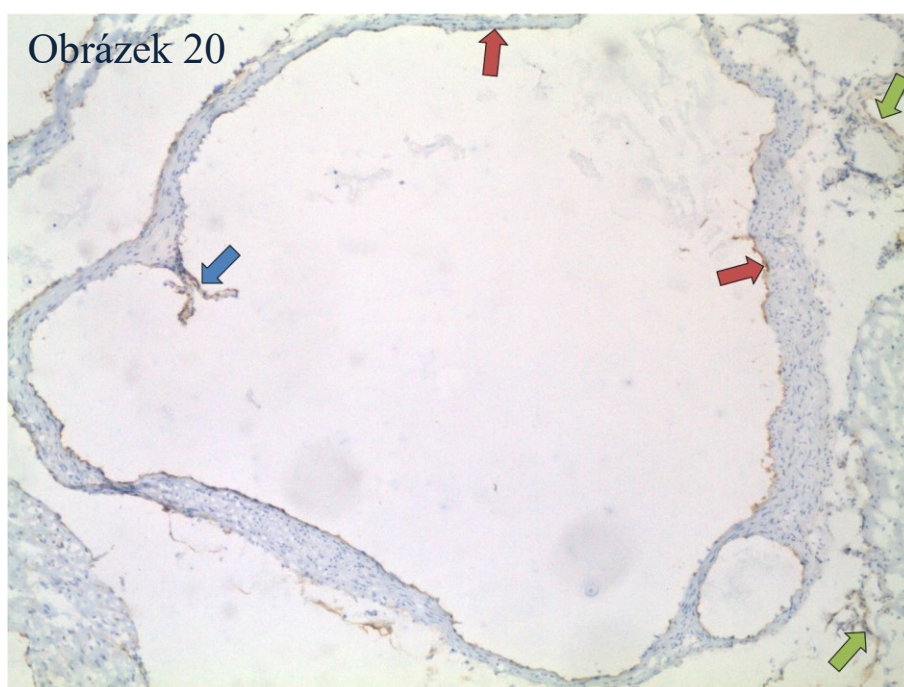
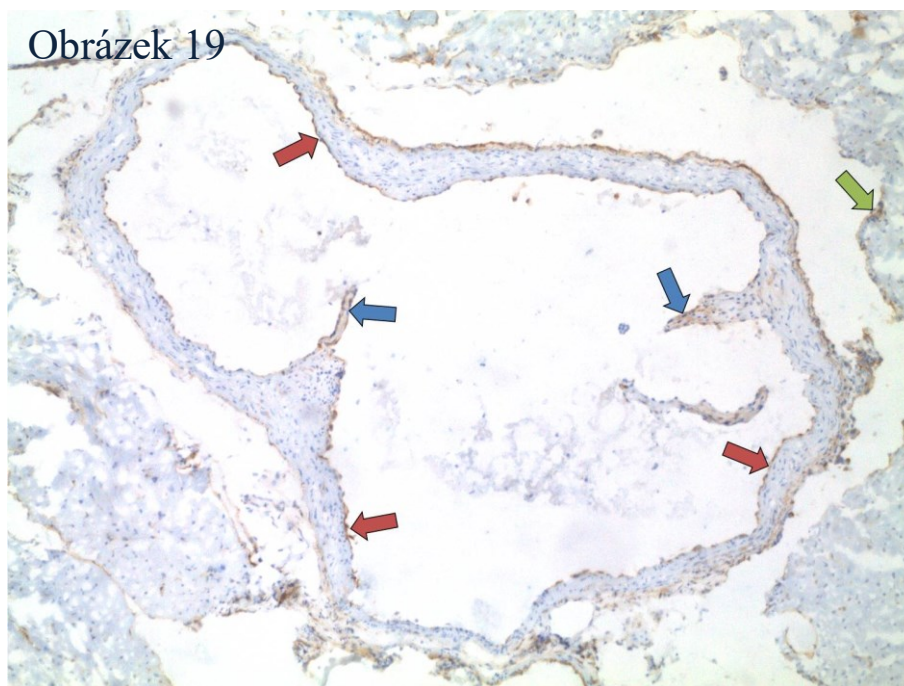


Obrázek 18



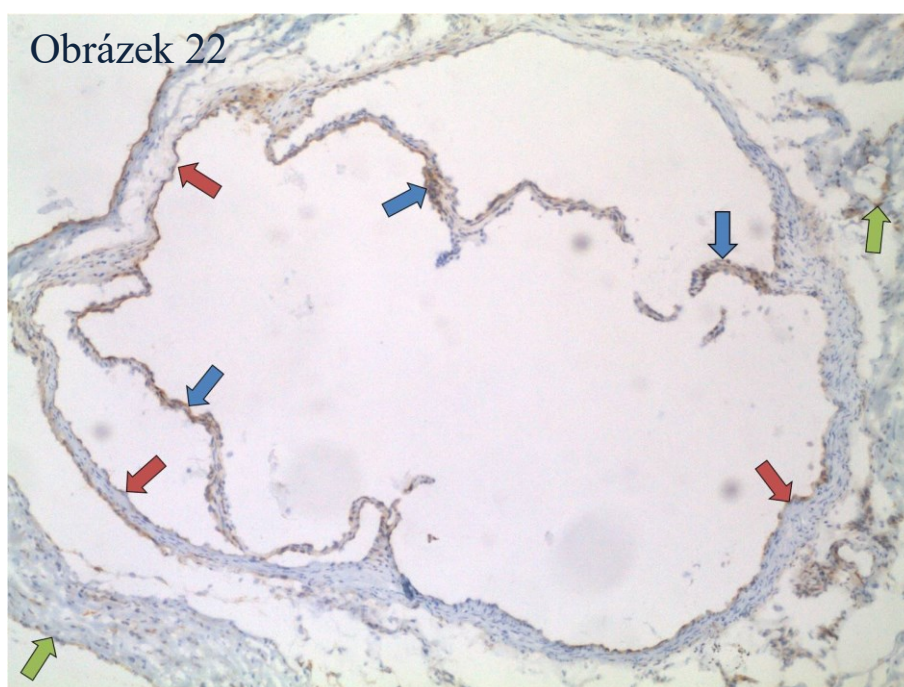
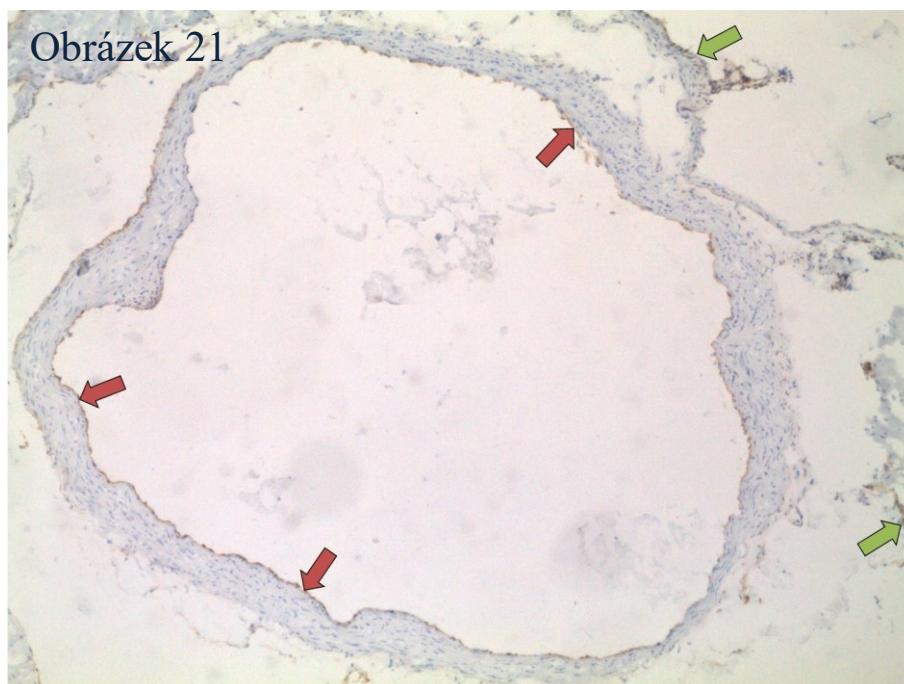
Obrázek 19, 20. Exprese ICAM-1 (experimentální skupina)

Na obrázcích 19 a 20 je patrná exprese ICAM-1 v aortě myši, které byly krmeny NASH indukující dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Dále je na obrázcích viditelná pozitivní reakce získaná mimo endotel. Tato reakce se nachází v myokardu a je označena zelenými šipkami. Modré šipky označují zbytky poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40krát.



Obrázek 21, 22. Exprese ICAM-1 (experimentální skupina)

Na obrázcích 21 a 22 je patrná exprese ICAM-1 v aortě myši, které byly krmeny NASH indukující dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Dále je na obrázcích viditelná pozitivní reakce získaná mimo endotel. Tato reakce se nachází v myokardu a je označena zelenými šipkami. Modré šipky označují zbytky poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40krát.



4.2. Imunohistochemie VCAM-1

Expres VCAM-1 zvýrazněná pomocí ImmPressTM imunohistochemické metody je zřejmá na endoteliální vrstvě řezů zachycených na obrázcích č. 23 – 30. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou. Reprezentativní oblasti řezů jsou označeny šipkami. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.

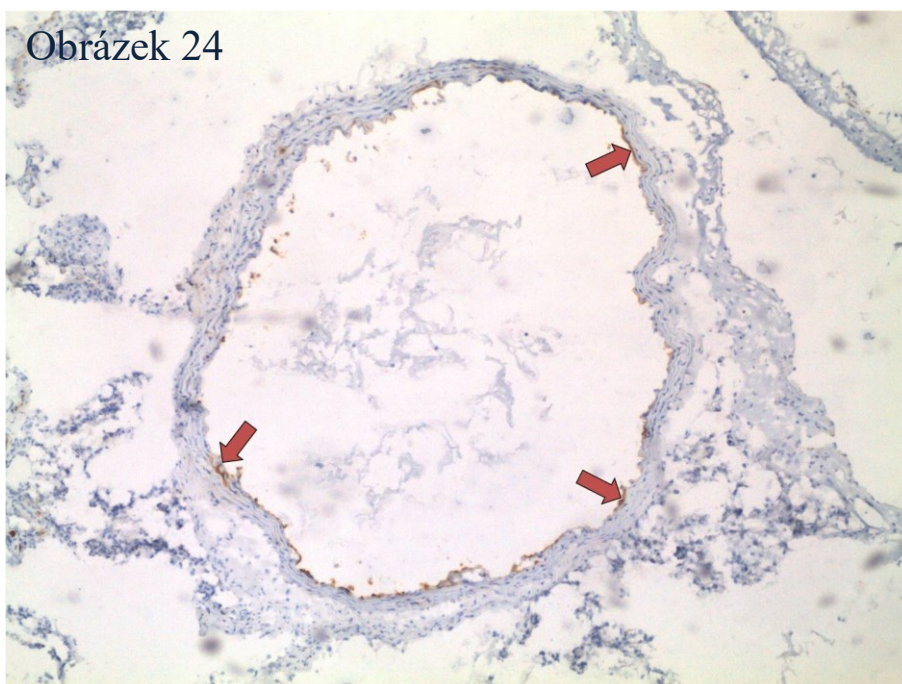
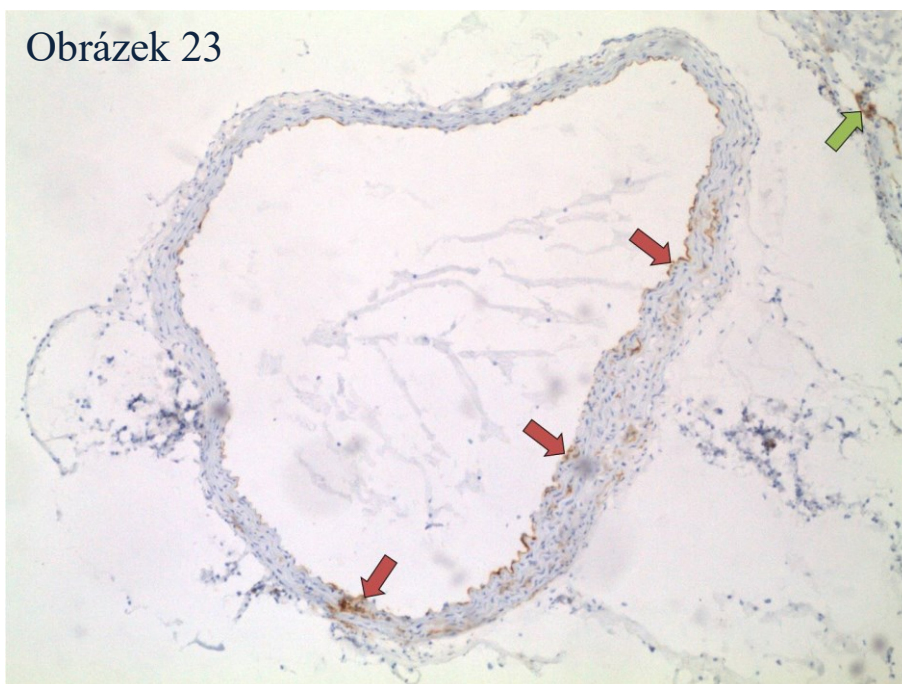
Na obrázcích č. 23, 24, 25 a 26 je zobrazena exprese adhezní molekuly VCAM-1 u kontrolní skupiny myší krmené standardní (tzv. chow-type) dietou.

Obrázky 27, 28, 29 a 30 znázorňují expresi adhezní molekuly VCAM-1 u experimentální skupiny myší, která byla krmena NASH indukující dietou sestávající ze 40 % kalorií z tuku, 0,2 % z cholesterolu a fruktózy a glukózy přidávané do vody k pití v koncentraci 42 g/l (tzv. FFC-type diet).

Expres VCAM-1 je dobře patrná na endotelu obou skupin zařazených do experimentu. Intenzita exprese VCAM-1 je u kontrolní a experimentální skupiny velmi podobná. Při porovnání obou skupin nejsou evidentní signifikantní rozdíly.

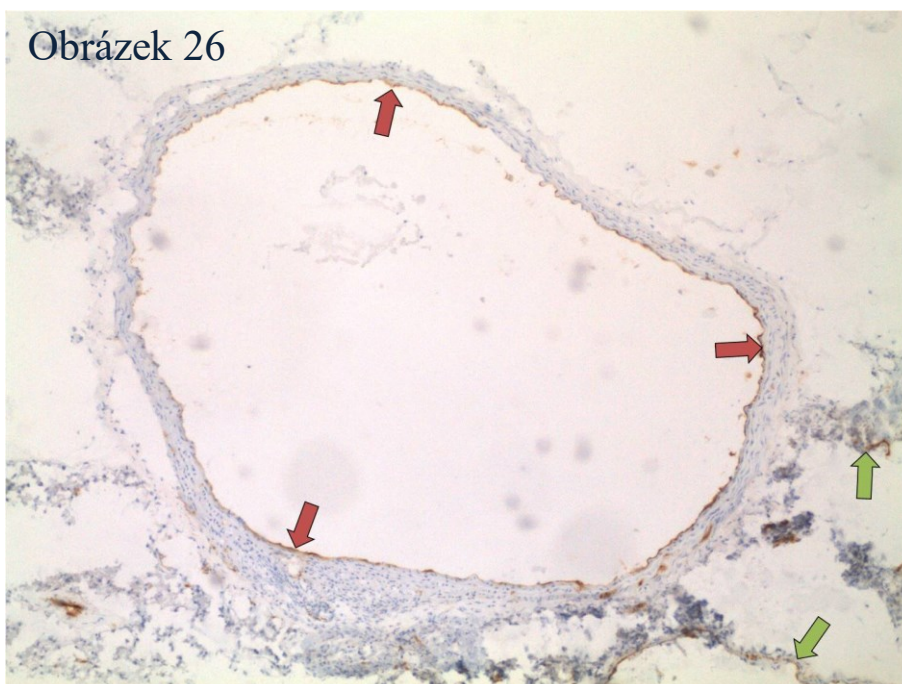
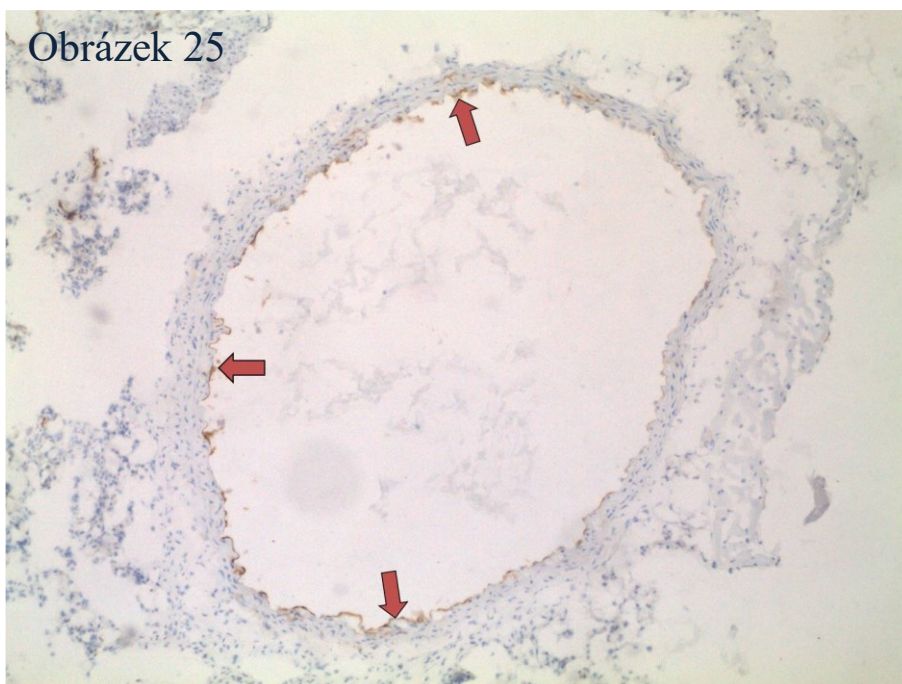
Obrázek 23, 24. Exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)

Na obrázcích 23 a 24 je patrná exprese VCAM-1 v aortě myši, které byly krmeny standardní dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Dále je na obrázcích viditelná pozitivní reakce získaná mimo endotel. Tato reakce se nachází v myokardu a je označena zelenými šipkami. Zvětšení 40krát.



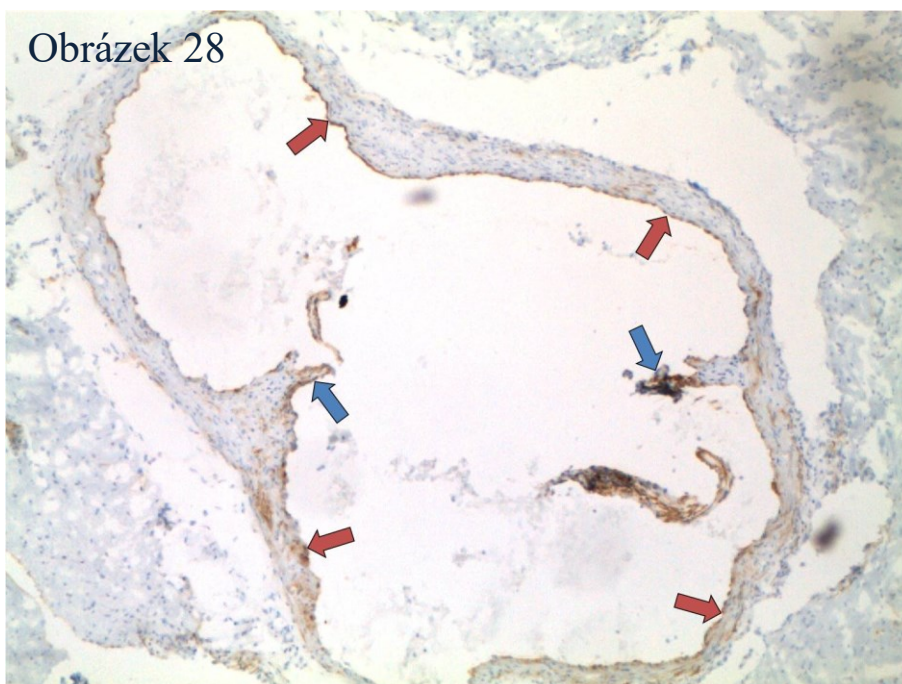
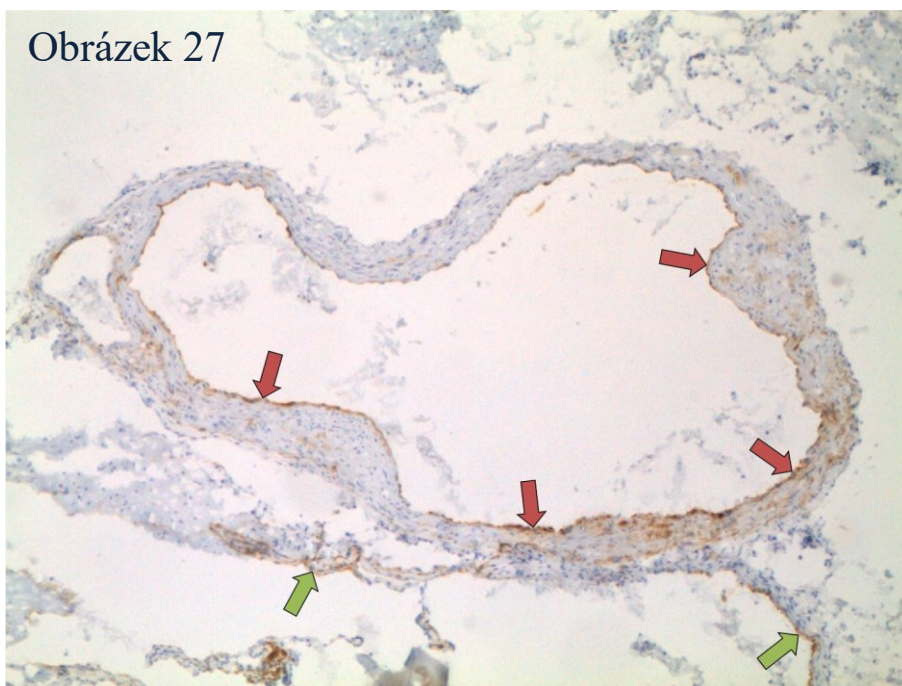
Obrázek 25. 26. Exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)

Na obrázcích 25 a 26 je patrná exprese VCAM-1 v aortě myši, které byly krmeny standardní dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Dále je na obrázcích viditelná pozitivní reakce získaná mimo endotel. Tato reakce se nachází v myokardu a je označena zelenými šipkami. Zvětšení 40krát



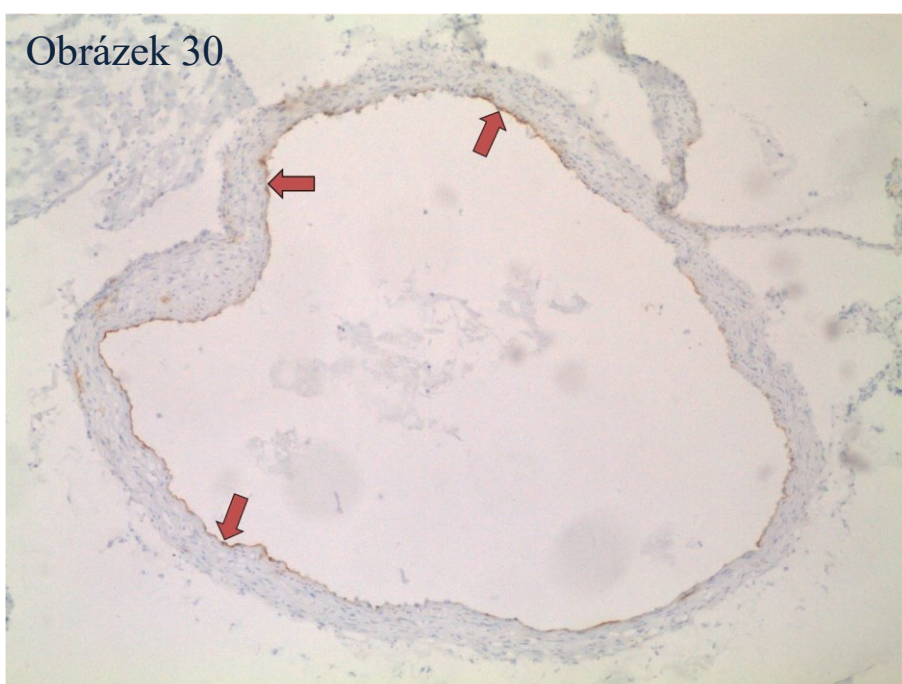
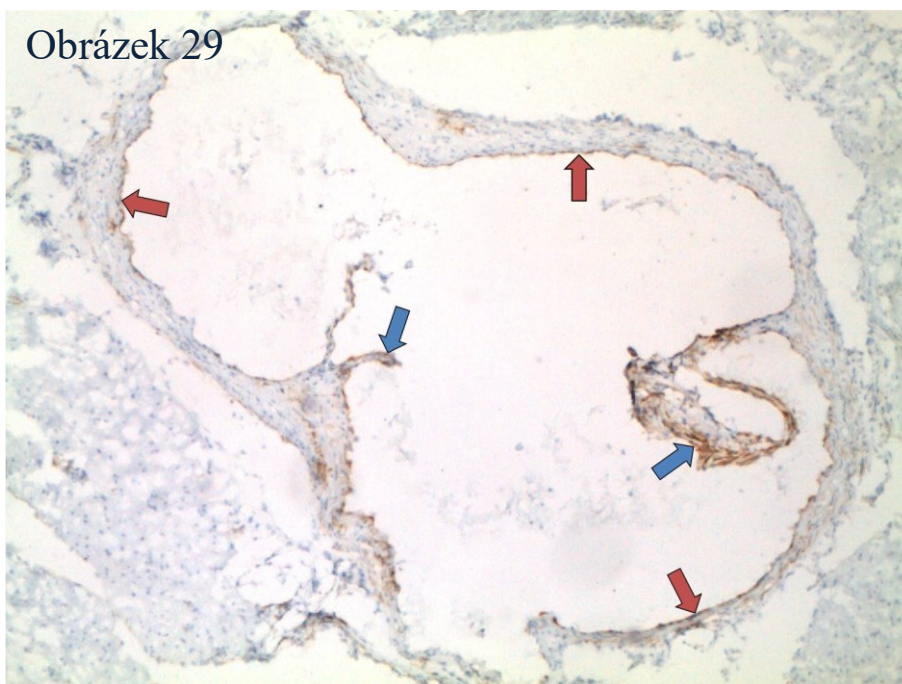
Obrázek 27, 28. Exprese VCAM-1 (experimentální skupina)

Na obrázcích 27 a 28 je patrná exprese VCAM-1 v aortě myši, které byly krmeny NASH indukující dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Dále je na obrázcích viditelná pozitivní reakce získaná mimo endotel. Tato reakce se nachází v myokardu a je označena zelenými šipkami. Modré šipky označují zbytky poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40krát.



Obrázek 29, 30. Exprese VCAM-1 (experimentální skupina)

Na obrázcích 29 a 30 je patrná exprese VCAM-1 v aortě myší, které byly krmeny NASH indukující dietou. Pozitivní reakce je zbarvena hnědou barvou a označena červenými šipkami. Modré šipky označují zbytky poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40krát.



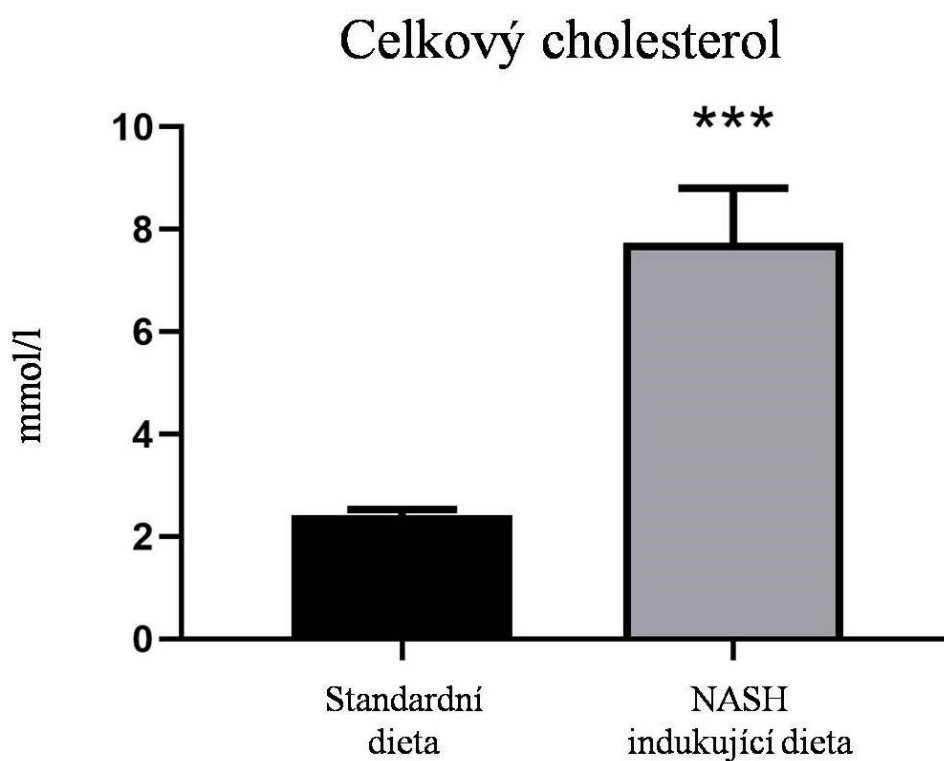
4.3. Biochemická analýza

Biochemická analýza prokázala značné rozdíly mezi hladinami celkového cholesterolu experimentální a kontrolní skupiny.

Výsledky zobrazené Grafu 1. potvrzují extrémně statisticky významný vliv NASH indukující diety na cholesterolemii experimentální skupiny myší (**P= méně než 0,001).

K porovnání hladin mezi skupinami modelů byl použit jednostranný nepárový t-test, výpočet a graf byly zpracovány v software GraphPad 8.0.

Graf 1. Hodnoty celkové cholesterolemie u experimentální a kontrolní skupiny



5. DISKUSE

Ateroskleróza, v dnešní době stále častěji skloňovaná diagnóza je právem označována za epidemii lidstva 21. století. Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění a ačkoli její vlastní projevy jsou dlouho němé, její klinické následky bývají závažné, často také bohužel fatální. Ve vyspělých zemích Evropy a Severní Ameriky jsou ateroskleróza a její následky nejčastější příčinou úmrtí [1]. Nejvýznamnějšími důsledky rozvinuté aterosklerózy jsou ischemická choroba srdeční, akutní infarkt myokardu, angina pectoris, cévní mozková příhoda nebo postižení cév zásobujících jiné orgány a jejich následná ischemie (např. ledviny, dolní končetiny)

Zásadním aspektem pro případný rozvoj aterosklerotických procesů v cévní stěně arterie je stav endotelu, jehož funkce je velmi komplexní. Za fyziologických podmínek udržuje rovnováhu mezi vazoaktivními mediátory, hemokoagulačními mechanismy a protizánětlivými a zánět indukujícími faktory. Dále se také účastní regulace proliferace buněk [13].

V případě působení rizikových vlivů, mezi kterými má výsadní roli vysoká plazmatická hladina LDL [39], může dojít k rozvratu fyziologické rovnováhy udržované endotelem a začne se rozvíjet endotelová dysfunkce, která je počátečním stádiem aterosklerózy [14]. V rámci aterosklerózy dochází ke zvýšení permeability endotelové vrstvy, transendotelové migraci a následné oxidaci LDL, atrakci imunitních buněk do dysfunkční oblasti, rozvoji imunitní zánětlivé reakce a tvorbě vazivového plátu se silně aterogenním jádrem tvořeným pěnovými buňkami. Na rozvoji zánětlivé reakce mají klíčový podíl adhezní molekuly exprimované aktivovaným endotelem, které umožňují uchycení leukocytů na cévní stěně a jejich migraci do subendotelové oblasti [39].

Vzhledem k tomu, že endotelová dysfunkce je iniciační, a tedy zásadní fází aterosklerózy, je velmi častým předmětem mnoha studií. Pro zhodnocení stavu endotelu a faktorů, které potenciálně mohou indukovat endotelovou dysfunkci, jsou vhodné adhezní molekuly, mezi které řadíme i proteiny ICAM-1 a VCAM-1 použité pro analýzu vlivu NASH indukující diety na stav endotelu aorty myši kmene C57BL/6 v rámci této diplomové práce. Hlavním cílem bylo zhodnotit, zda indukce NASH a podávání diety,

kteřá indukuję patologickę změny v jätřech, ovlivní také potenciální změny v aortě na úrovni indukce zánětu nebo endotelové dysfunkce.

Transmembránové proteiny ICAM-1 a VCAM-1 patří do skupiny imunoglobulinů podobných adhezních molekul, u kterých je studiemı potvrzen klíčový vliv v iniciační fázi aterosklerózy. Dřívější studie prokázaly pokles intenzity adheze leukocytů a zmenšení aterosklerotických lézí u myší s vyřazeným genem pro ICAM-1 a VCAM-1 [18, 27, 28]. ICAM-1 je exprimován kontinuálně v malém množství potřebném pro běžný fyziologický stav, zatímco VCAM-1 za fyziologického stavu exprimován není. [19]. Společný pro oba proteiny je markantní nárůst exprese při aktivaci endotelu [25, 27]. Stupeň endotelové dysfunkce je tak definován dle stupně endoteliální exprese adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 [55].

Tato studie byla provedena na myších modelech kmene C57BL/6. Experimentální skupina byla po dobu 25 týdnů krmena NASH indukující dietou sestávající ze 40 % kalorií pocházejících z tuku, 0,2 % z cholesterolu a glukózy a fruktózy rozpuštěné ve vodě k pití v koncentraci 42 g/l (tzv. FFC-type diet). Kontrolní skupina byla krmena standardní (tzv. chow-type) dietou.

Vzhledem k průkazům vlivu vysokotukových diet na zvýšení hladin LDL, rozvoj endotelové dysfunkce, obezitu a insulinovou rezistenci u myšího kmene C57BL/6 zdokumentovaným v dřívějších studiích [40, 42] jsme předpokládali, že po imunohistochemické analýze vzorků budou vzorky modelů experimentální skupiny vykazovat při srovnání se vzorky modelů kontrolní skupiny markantně intenzivnější expresi detekovaných molekul ICAM-1 a VCAM-1 na endotelu aorty.

Také skutečnost, že vysoká hladina LDL je považována za klíčový faktor indukce endoteliální exprese adhezních molekul [18, 39], a výsledky biochemické analýzy krevních vzorků myších modelů, které vliv použité NASH indukující diety na celkovou cholesterolémii modelů experimentální skupiny jednoznačně potvrdily, náš předpoklad potvrdily.

Provedená imunohistochemická analýza náš předpoklad nenaplnila. V případě adhezní molekuly ICAM-1 byly výsledky při porovnání experimentální a kontrolní skupiny srovnatelné a vzorky nevykazovaly výrazné změny exprese.

Ani u adhezní molekuly VCAM-1 nebyly detekovány signifikantní rozdíly v endoteliální expresi mezi experimentální a kontrolní skupinou.

Z výsledků, které tato práce přinesla, lze usoudit, že ačkoli použitá dieta má prokazatelný vliv na zvýšení hladiny celkového cholesterolu, při trvání 25 týdnů nedochází k indukci endotelové dysfunkce identifikovatelné imunohistochemickými metodami. Nelze však vyloučit, že při delším trvání experimentu, či případné úpravě diety by k rozvoji endotelové dysfunkce došlo. Značný vliv by mohlo mít nahrazení myšího kmene C57BL/6 geneticky modifikovaným kmenem s větší náchylností k manifestaci aterosklerózy.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovení exprese adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 na endotelu aorty myši kmene C57BL/6 a její porovnání mezi experimentální skupinou krmnou po dobu 25 týdnů NASH indukující dietou, která byla složena ze 40 % kalorií z tuku a 0,2 % kalorií z cholesterolu a doplněná glukózou a fruktózou rozpuštěnou ve vodě k pití v koncentraci 42 g/l (tzv. FFC-type diet), a kontrolní skupinou, která byla po stejnou dobu krmena standardní dietou pro hlodavce (tzv. chow-type dietou).

Vzorky aort byly analyzovány imunohistochemickými metodami.

Kromě imunohistochemické analýzy aort byla provedena biochemická analýza krevních vzorků modelových myší zařazených do studie.

Biochemická analýza prokázala značný vliv NASH indukující diety na zvýšení hladin celkové cholesterolémie myší z experimentální skupiny.

Expres ICAM-1 byla dobře patrná na endotelu aorty, vliv diety na intenzitu exprese však nebyl potvrzen. Expres ICAM-1 na endotelu aort experimentální i kontrolní skupiny byla velmi podobná a bez výrazných změn.

Analýza adhezní molekuly VCAM-1 poskytla dobře zřetelnou expresi na endotelu aorty. Při porovnání vzorků experimentální a kontrolní skupiny ale nebyly shledány signifikantní rozdíly. Intenzita exprese VCAM-1 byla u obou studovaných skupin srovnatelná.

Ačkoli biochemická analýza potvrdila signifikantní nárůst celkových hladin krevních lipidů u experimentální skupiny krmné po dobu 25 týdnů NASH indukující dietou, imunohistochemická analýza neprokázala vliv použité diety na intenzitu exprese adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 na endotelu aort modelových myší.

Dle výsledků této práce lze soudit, že použití myšího kmene C57BL/6 a aplikace výše zmíněné diety v tomto časovém rozvrhu mají vliv na nárůst hladin celkové cholesterolémie, ale nevedou ke změnám endotelu detekovatelným imunohistochemickými metodami.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AP	alkaline phosphatase
ApoE ^{-/-}	apolipoprotein E deficitní myši
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
EDFR	epidermal growth factor receptor
e-NOS	endotelová NO-syntáza
FFC	high saturated fat, high saturated fructose, high saturated cholesterol
HRP	horseradish peroxidase
ICAM-1	intracellular endothelial cell adhesion molecule 1
IL-1	interleukin 1
INF- γ	interferon γ
LDL	low density lipoprotein
LDLr ^{-/-}	LDL receptor deficitní myši
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
MS	metabolický syndrom
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NCAM-1	neutrální adhezní molekula 1
NO	oxid dusnatý
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PDGF	destičkový růstový faktor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule

PGI ₂	prostacyklin
ROS	reactive oxygen species
SMCs	smooth muscle stem cell
TCR	T-cell receptor
TF	tkáňového faktoru
TGF- β	transformující růstový faktor β
TJP-1	tight junction protein 1
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA ₂	tromboxan A ₂
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VE-cadherin	vaskulární endoteliální kadherin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLA-4	very late antigen-4
vWf	von Willebrandův faktor
ZO1	zonula-occludens 1

8. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1	Schéma obecné stavby cévní stěny
Obrázek 2	Typy kapilár
Obrázek 3	Cévy kardiovaskulárního systému
Obrázek 4	Endotelová dysfunkce
Obrázek 5	Role adhezních molekul při transendotelové migraci leukocytů
Obrázek 6	Adhezní molekuly
Obrázek 7	Schéma struktury adhezních molekul imunoglobulinového typu - ICAM-1 a VCAM-1
Obrázek 8	Fáze nealkoholického ztukovatění jater
Obrázek 9	Příčiny úmrtí u pacientů s diagnózou NASH
Obrázek 10	Schéma přímé a nepřímé imunohistochemie
Obrázek 11	Schéma EnVision® metodiky
Obrázek 12	Schéma ImmPress™ metodiky
Obrázek 13	Schéma ABC (Avidin-Biotin Complex) metodiky
Obrázek 14	Myš kmene C57BL/6
Obrázek 15, 16	Exprese ICAM-1 (kontrolní skupina)
Obrázek 17, 18	Exprese ICAM-1 (kontrolní skupina)
Obrázek 19, 20	Exprese ICAM-1 (experimentální skupina)
Obrázek 21, 22	Exprese ICAM-1 (experimentální skupina)
Obrázek 23, 24	Exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)

Obrázek 25, 26	Exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)
Obrázek 27, 28	Exprese VCAM-1 (experimentální skupina)
Obrázek 29, 30	Exprese VCAM-1 (experimentální skupina)
Tabulka 1	Myší modely používané pro studie NAFLD a NASH
Graf 1	Hodnoty cholesterolémie u experimentální a kontrolní skupiny

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GAJDOVÁ, J. Ateroskleróza. *Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF a FZV UP Olomouc* [online]. 2011 [cit. 2019-03-14]. Dostupné z: <http://pfyziolklin.upol.cz/?p=1449>
- [2] ČIHÁK, R. *Anatomie*. 1. vydání. Praha: Grada, 1997, s 69-76. ISBN 80-7169-140-2.
- [3] POVÝŠIL, C. a ŠTEINER, I. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007, s 1-4. ISBN 978-80-7262-494-2.
- [4] MARTÍNEK, J. a VACEK, Z. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009, s 11-17. ISBN 978-80-247-2393-8.
- [5] Cévy. *WikiSkripta* [online]. 2018- [cit. 2019-03-16]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/C%C3%A9vy>
- [6] HRONEK, M. *Praktická cvičení z morfologie a fyziologie pro posluchače Farmaceutické fakulty*. Praha: Karolinum, 2013, s 16. ISBN 978-80-246-2293-4.
- [7] Arterie. *WikiSkripta* [online]. 2018- [cit. 2019-03-17]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Arterie>
- [8] VAJNER, L. *Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie*. Praha: Karolinum, 2012, s 6-12. ISBN 978-80-246-2165-4.
- [9] Vény. *WikiSkripta* [online]. 2018- [cit. 2019-03-18]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/V%C3%A9ny>
- [10] The circulatory system. *Histology and Nano Technology* [online]. [cit. 2019-03-18]. Dostupné z:

<http://histonano.com/books/Junqueira's%20Basic%20Histology%20PDF%20WHOLE%20BOOK/11.%20The%20Circulatory%20System.htm>

- [11] VESELÝ, J. Fyziologie endotelu, dysfunkce endotelu. *Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF a FZV UP Olomouc* [online]. 2012 [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <http://pfyziolklin.upol.cz/?p=1456>
- [12] VOJÁČEK, J. a MALÝ, M. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. Praha: Grada, 2004, s 21-31. ISBN 80-247-0501-x
- [13] KARÁSEK, D., VAVERKOVÁ, H., HALENKA, M. a HUTYRA, M. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní Med.*, 2004, vol. 6, no. 9, p. 450-453.
- [14] KARETOVÁ, D. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní med.*, 2002, vol. 4, no. 3, p. 119-122
- [15] KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011, s 176. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [16] NEČAS, E. *Patologická fyziologie orgánových systémů*. Praha: Karolinum, 2003, s 162-166. ISBN 80-246-0615-1.
- [17] ARAÚJO, A. C., WHEELLOCK C.E. a HAEGGSTRÖM J.Z. The Eicosanoids, Redox-Regulated Lipid Mediators in Immunometabolic Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2018, **29**(3), 275-296 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1089/ars.2017.7332. ISSN 1523-0864. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2017.7332>
- [18] GALKINA, E. a LEY, K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*[online].

- 2007, **27**(11), 2292-2301 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.149179. ISSN 1079-5642. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.107.149179>
- [19] NEČAS, Emanuel. *Obecná patologická fyziologie*. Praha: Karolinum, 2000, s 104 - 107. ISBN 80-246-0051-x.
- [20] BLANKENBERG, S., BARBAUX, S. a TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* [online]. 2003, **170**(2), 191-203 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/S0021-9150(03)00097-2. ISSN 00219150. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915003000972>
- [21] KOH, Y. a PARK, J. Cell adhesion molecules and exercise. *Journal of Inflammation Research* [online]. 2018, **11**, 297-306 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.2147/JIR.S170262. ISSN 1178-7031. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/cell-adhesion-molecules-and-exercise-peer-reviewed-article-JIR>
- [22] CHIA, M. C. The Role of Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 2008, **35**(6), 573-602 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1080/10408369891234282. ISSN 1040-8363. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408369891234282>
- [23] Major families in cell-adhesion molecules (CAMs) and adhesion receptors. *BioLegend, Inc.: Enabling Legendary Discovery* [online]. [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: https://www.biolegend.com/recombinant_proteins
- [24] SARELIUS, I. H. a GLADING, A.J. Control of vascular permeability by adhesion molecules. *Tissue Barriers* [online]. 2015, **3**(1-2) [cit. 2019-03-21]. DOI:

10.4161/21688370.2014.985954. ISSN 2168-8370. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/21688370.2014.985954>

- [25] HORDIJK, P. L. Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *FEBS Journal* [online]. 2006, **273**(19), 4408-4415 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05440.x. ISSN 1742-464X. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2006.05440.x>
- [26] HANSSON, G. K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2001, **21**(12), 1876-1890 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1161/hq1201.100220. ISSN 1079-5642. Dostupné z:
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/hq1201.100220>
- [27] KONG, D.-H. et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(4) [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.3390/ijms19041057. ISSN 1422-0067. Dostupné z:
<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/1057>
- [28] COOK-MILLS, J. M., MARCHESE, M. E. a ABDALA-VALENCIA, H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2011, **15**(6), 1607-1638 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1089/ars.2010.3522. ISSN 1523-0864. Dostupné z:
<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2010.3522>
- [29] FERNANDEZ-BORJA, M., VAN BUUL, J. D. a HORDIJK, P. L.. The regulation of leukocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovascular Research* [online]. 2010, **86**(2), 202-210 [cit. 2019-03-23].

DOI: 10.1093/cvr/cvq003. ISSN 0008-6363. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvq003>

- [30] SIMA, A. V., STANCU, C. S. a SIMIONESCU, M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell and Tissue Research* [online]. 2009, **335**(1), 191-203 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1007/s00441-008-0678-5. ISSN 0302-766X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-008-0678-5>
- [31] PŘÍBRAMSKÁ, V. a TRUMPEŠOVÁ, H. Nealkoholická steatohepatitida - součást metabolického syndromu. *Solen*, 2008/12/19 2008, vol. 5, no. 5, p. 193-195. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/05/03.pdf>
- [32] BRODANOVÁ, M. Nealkoholická steatohepatitida. *Interní Med.*, 2003/12/31 2003, vol. 5, no. 6, p. 277-283. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2003/06/03.pdf>
- [33] TRUNEČKA, P. Nealkoholická steatohepatitida a možnosti její léčby. *Remedia* [online]. 2007 [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruh-ytemat/Hepatologie/Nealkoholicka-steatohepatitida-a-moznosti-jeji-lecby/8-16-ia.magarticle.aspx>
- [34] The non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) spektrum. *My Bypass* [online]. 2018 [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <https://mybypass.com.au/fatty-liver-disease-the-silent-epidemic/>
- [35] SPOERA, I. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Status Quo. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* [online]. 2018, **27**(4) [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.15403/jgld.2014.1121.274.quo. ISSN 18418724. Dostupné z: <http://www.jgld.ro/wp/archive/y2018/n4/a15>

- [36] BETTERMANN, K., HOHENSEE, T. a HAYBAECK, J. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(6), 9924-9944 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.3390/ijms15069924. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/6/9924>
- [37] Nonalcoholic steatohepatitis (NASH), *Genfit, Towards Better Medicine* [online]. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.genfit.com/therapeutic-areas/nash/>
- [38] SANYAL, A. J. NASH: A global health problem. *Hepatology Research*[online]. 2011, **41**(7), 670-674 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00824.x. ISSN 13866346. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1872-034X.2011.00824.x>
- [39] LEE, Y. T. et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2017, **16**(1) [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1186/s12944-016-0402-5. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-016-0402-5>
- [40] JAWIEŃ, J., NASTALEK, P. a KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. 2004, **55**(3), 503-517 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/09_04/pdf/503_09_04_article.pdf
- [41] DAUGHERTY, Alan. Mouse Models of Atherosclerosis. *The American Journal of the Medical Sciences* [online]. 2002, **323**(1), 3-10 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1097/00000441-200201000-00002. ISSN 00029629. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962915345213>

- [42] REID, D. T. a EKSTEEN, B. Murine models provide insight to the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition Research Reviews* [online]. 2015, **28**(02), 133-142 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1017/S0954422415000128. ISSN 0954-4224. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954422415000128
- [43] HANSEN, H. H. et al. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, **22**(11), 1707-1718 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.06.007. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644617300272>
- [44] BERANOVÁ, M. a TONAR Z. Principy a příklady imunohistochemie. *Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni* [online]. 2002 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf
- [45] ČECH, S. Imunohistochemie a imunohistochemické metody. *Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/OH_txt1-5.htm
- [46] Indirect immunofluorescence test, illustration. *Science Photo Library* [online]. [cit. 27-03-27]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/890209/view>
- [47] LIPMAN, N. S., JACKSON, L. R., TRUDEL, L. J. a WEIS-GARCIA F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*[online]. 2005, **46**(3), 258-268 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1093/ilar.46.3.258. ISSN 1084-2020. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article-lookup/doi/10.1093/ilar.46.3.258>
- [48] SABATTINI, E., BISGAARD, K., ASCANI, S. et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. *Critical*

comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 1998, **51**(7), 506-511 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1136/jcp.51.7.506. ISSN 0021-9746. Dostupné z: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.51.7.506>

- [49] KÄMMERER, U. et al. A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*[online]. 2016, **49**(5), 623-630 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1177/002215540104900509. ISSN 0022-1554. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002215540104900509>
- [50] Scheme of polymer-based two-step method in immunohistochemistry. *Cancer Translational Medicine* [online]. 2015 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: http://www.cancertm.com/viewimage.asp?img=CancerTranslMed_2015_1_4_115_163802_f2.jpg
- [51] Introduction to Immunohistochemistry. *IHC World Life Science Products&Services* [online]. 2011 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: http://www.ihcworld.com/_intro/ihc-methods.htm
- [52] ImmPRESS Polymer Detection Systems. *Vector Laboratories* [online]. 2019 [cit.2019-03-27]. Dostupné z: <https://vectorlabs.com/guides/page/immpress-one-step-polymer-systems>
- [53] Strept(avidin)–Biotin Complex Method for IHC Detection. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-complex-method-ihc-detection.html>

- [54] C57BL/6-*Ins2^{Akita}*/J. *The Jackson Laboratory* [online]. [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: <https://www.jax.org/strain/003548>
- [55] LIAO, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2013, **123**(2), 540-541 [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.1172/JCI66843. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/66843>