

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



**Imunohistochemická detekce eNOS v aterosklerotických plátech
arteria brachiocephalica**

**Immunohistochemical detection of eNOS in atherosclerotic lesions
brachiocephalic artery**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2013

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Kateřina Klimešová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a příjemnou spolupráci při sestavování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Katedry biologických a lékařských věd za ochotu pomoci i mimo rámec své vlastní práce.“

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kateřina Klimešová

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

Název diplomové práce: Imunohistochemická detekce eNOS v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica

Cíl práce: Sledovali jsme expresi endoteliální NO syntázy (eNOS) v arteria brachiocephalica u apoE/ LDLR^{-/-} deficientních myší po podávání vysokoproteinové stravy s nízkým obsahem cukrů (LCHP).

Metody: Pro tuto práci byly použity myši s deficientním apolipoproteinem E a LDL receptorem, které jsou náchylné k rozvoji aterosklerózy. Myši byly rozděleny do 2 skupin po 6. Jedné skupině (kontrolní skupina) byla podávána běžná strava západního typu, druhá skupina byla krmena vysokoproteinovou dietou s nízkým obsahem cukrů (LCHP). Bylo provedeno stanovení celkového cholesterolu, exprese eNOS byla hodnocena imunohistochemicky a stereologicky.

Výsledky: Biochemická analýza prokázala zvýšení celkového cholesterolu myší krměných LCHP dietou oproti kontrolní skupině. Imunohistochemickou analýzou byla potvrzena exprese eNOS na endotelu kryjícím aterosklerotický plát i na intaktním endotelu u obou skupin myší. Stereologická analýza neprokázala významné zvýšení exprese eNOS u myší v LCHP skupině oproti kontrolní skupině.

Závěr: Bylo prokázáno zvýšení hladin celkového cholesterolu u myší krměných LCHP dietou. Exprese eNOS nebyla významně zvýšena oproti kontrolní skupině. Tato práce však potvrdila imunohistochemii jako vhodnou metodu pro kvantifikaci exprese eNOS v arteria brachiocephalica.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Kateřina Klimeřov

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

Title of diploma thesis: Immunohistochemical detection of eNOS in atherosclerotic lesions brachiocephalic artery

Background: We observed the expression of endothelial NO synthase (eNOS) in brachiocephalic artery in apoE/ LDLR^{-/-} deficient mice fed by low carbohydrate high protein diet.

Methods: We used apolipoprotein E and LDL- receptor deficient female mice that are prone to atherosclerosis. Mice were divided in two groups, 6 mice in each group. First group (control) was fed by western-type diet; second group was fed by low carbohydrate high protein diet (LCHP). We made total cholesterol level measurement. The expression of eNOS was detected by immunohistochemical and stereological methods.

Results: Biochemical analysis showed significantly increased total cholesterol level in LCHP group comparing to control group. eNOS expression was detected by immunohistochemical analysis in endothelium covering atherosclerotic plaques as well as in intact endothelium in both groups. Stereological analysis has detected no significant increase of eNOS expression in LCHP group comparing to control group.

Conclusion: Increased total cholesterol level was observed in mice on LCHP diet. There was no significant increase of eNOS expression comparing to control group. Nevertheless this diploma thesis showed that immunohistochemistry might be used for the quantification of eNOS expression in brachiocephalic artery.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	ANATOMICKÁ STAVBA CÉV	9
2.1	Obecná struktura cév.....	9
2.2	Kapiláry.....	11
2.3	Arterie	12
2.4	Vény.....	12
3	ENDOTEL.....	14
3.1	Stavba a funkce endotelu	14
3.2	Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce	16
3.3	Endoteliální dysfunkce a hypertenze	17
3.4	Endoteliální dysfunkce a hyperlipoproteinémie.....	17
3.5	Endoteliální dysfunkce a diabetes mellitus	18
3.6	Endoteliální dysfunkce a ateroskleróza.....	18
3.7	Možnosti detekce endoteliální dysfunkce	19
3.8	Léčba endoteliální dysfunkce.....	19
4	ATEROSKLERÓZA	21
4.1	Epidemiologie	22
4.2	Rizikové faktory aterosklerózy	22
4.3	Tabulka kardiovaskulárního rizika.....	24
4.4	Patogeneze aterosklerózy	25
4.4.1	Úloha lipoproteinů v patogenezi aterosklerózy	25
4.4.2	Vliv endotelu na patogenezi aterosklerózy.....	27
4.4.3	Role monocytů a makrofágů v patogenezi aterosklerózy.....	28
4.4.4	Úloha hladkých svalových buněk v patogenezi aterosklerózy	29
4.4.5	Stádia aterosklerózy	30
4.4.6	Typy ateromových plátů	33

4.5	Komplikace aterosklerózy	34
5	ENDOTELIÁLNÍ NO SYNTÁZA.....	35
5.1	Struktura eNOS	35
5.2	Tvorba NO	36
5.3	Regulace aktivity eNOS	37
5.4	eNOS a ateroskleróza	38
6	MYŠÍ MODEL ATEROSKLERÓZY	39
7	IMUNOHISTOCHEMIE.....	41
7.1	Avidin – biotin metoda (ABC).....	41
8	CÍL PRÁCE – ZADÁNÍ PRÁCE.....	43
9	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
9.1	Použitá zvířata.....	44
9.2	Použité protilátky	45
9.3	Příprava roztoků	45
9.4	Pracovní postup.....	45
9.5	Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza	46
9.6	Statistická analýza.....	47
10	VÝSLEDKY	48
10.1	Biochemická analýza.....	48
10.2	Imunohistochemická analýza	49
10.2.1	Imunohistochemické barvení eNOS v arteria brachiocephalica.....	49
10.3	Stereologická analýza endoteliální exprese eNOS v arteria brachiocephalica..	52
11	DISKUZE.	53
12	ZÁVĚR.....	55
13	Seznam obrázků.....	56
14	Seznam tabulek	56
15	Seznam grafů	56
16	Použitá literatura	57

1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) řadíme mezi civilizační choroby. Tato onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí obyvatel ve vyspělých zemích. Úmrtí na následky KVO tvoří asi 50% úmrtí v průmyslově vyspělých zemích, v celosvětovém měřítku tvoří asi 30% celkové mortality. V České republice je úmrtnost na tato onemocnění jedna z nejvyšších v Evropě. Každých 9 minut zemře jeden Čech na následky kardiovaskulárních onemocnění. To je 178 osob denně, 65 000 ročně. Nejčastější manifestací KVO je ischemická choroba srdeční (ICHS), která bývá v mnoha případech navozena aterosklerotickými změnami cév.

Endoteliální NO syntáza (eNOS) je enzym produkující v endotelových buňkách oxid dusnatý (NO). NO má v organismu řadu funkcí. Především je to hlavní vazodilatační faktor, dále vykazuje účinky antitrombotické a snižuje expresi adhezivních molekul. Pravděpodobně deficit NO je jednou z hlavních příčin rozvoje aterosklerózy. Naše práce je tedy zaměřena na pozorování exprese eNOS v aterosklerotických lézích a hledání vztahu mezi stadiem rozvoje aterosklerózy a expresí eNOS.

2 ANATOMICKÁ STAVBA CÉV

Oběhová soustava tvoří uzavřený systém trubic, jehož úkolem je transport kyslíku, živin, odpadních a dalších látek. Skládá se ze 4 součástí: srdce (svalová pumpa), arterie přenášející krev bohatou na kyslík a živiny ke tkáním, větvy odvádějící krev z tkání zpět do srdce a kapiláry, které tvoří spojky mezi arteriemi a vénami a jsou místem samotné výměny kyslíku a živin mezi krví a tkáněmi (1).

2.1 Obecná struktura cév

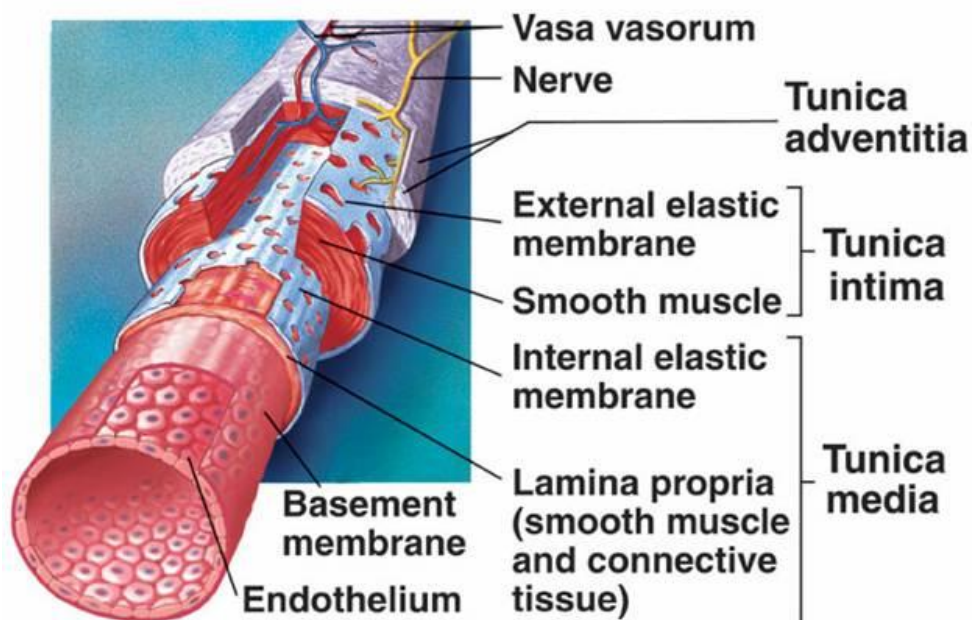
Cévní stěna je složena z 3 vrstev. Jsou to:

- Tunica intima
- Tunica media
- Tunica adventitia

Obrázek 1: Stavba cévní stěny

http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Blood_Vessels.html (15. 4. 2013)

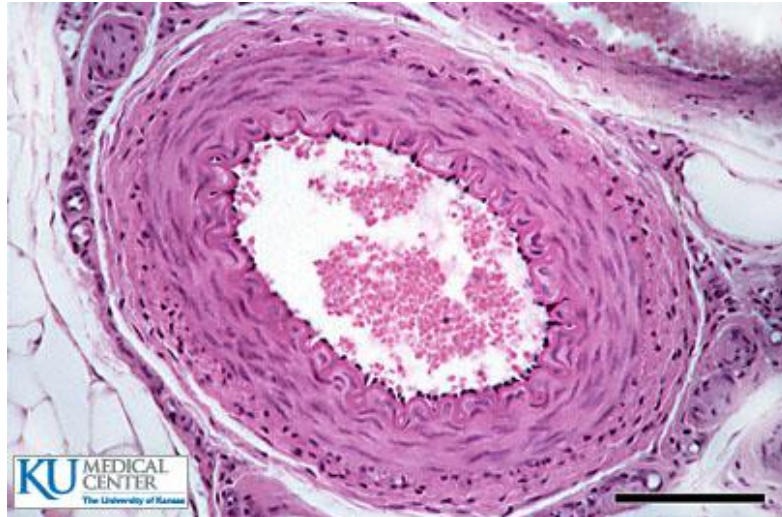
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Obrázek 2: Mikroskopický preparát cévní stěny

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

(15. 4. 2013)



Tunica intima

Tunica intima je vnitřní vrstva cévní stěny. Je tvořena endotelem a subendotelovou vrstvou. Endotel je jednovrstevný plochý epitel. Endotelové buňky jsou polygonální, ploché, protažené ve směru proudění krve. Subendotelová vrstva je tvořena řídkým kolagenním vazivem. Ve velkých cévách může obsahovat i hladké svalové buňky (2).

Tunica media

Hlavními elementy prostřední vrstvy cévní stěny jsou cirkulárně uspořádané hladké svalové buňky produkující mezibuněčnou hmotu. Ta obsahuje především mukopolysacharid chondroitinsulfát. Dále se zde nachází elastická vlákna, která vytvářejí jemné sítě nebo blanky. V těchto blankách jsou vytvořeny otvory umožňující pronikání živin do hlubších vrstev cévní stěny. Nazývají se membranae fenestratae. U silnějších arterií tvoří elastické struktury na hranici mezi tunica media a tunica intima membrana elastica interna a na rozhraní tunica media - tunica adventitia membrana elastica externa (2).

Tunica adventitia

Tunica adventitia je svrchní vrstvou cévní stěny. Její struktura je tvořena longitudinálně uspořádanými kolagenními a elastickými vlákny. Z buněčných elementů se zde nachází především fibroblasty a adipocyty, mohou se zde vyskytovat i hladké svalové buňky. U cév s průměrem větší než 1 mm je adventitia prostoupena soustavou drobných cév nazývaných vasa vasorum (cévy cév), které zajišťují výživu cévní stěny (1).

2.2 Kapiláry

Kapilární řečiště se nazývá mikrovaskulární. Kapiláry tvoří spojení mezi arteriálními a venózními částmi oběhu, jsou místem, kde probíhá vlastní výměna kyslíku a živin mezi krví a tkáněmi. Průměr kapilár je 7-9 μm , můžeme se však setkat i s kapilárami o průměru pouhé 4 μm . Kvůli častému větvení dosahuje délka většiny kapilár jen asi 0,25-1mm. Celková délka všech kapilár v organismu se odhaduje asi na 96 000 km (3).

Stěnu kapilár tvoří jedna vrstva endotelových buněk. Kolem nich jsou nepravidelně rozmístěné pericyty, což jsou mezenchymové buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, které vytváří vlastní bazální lamínu. Obsahují kontraktilní proteiny, zastupují tedy funkci tunica media. Kolem kapilár bývá vytvořena i vrstvička kolagenních vláken zastupující funkci tunica adventitia. Podle struktury kapilární stěny můžeme kapiláry rozdělit do čtyř skupin:

- Kapiláry se souvislou výstelkou
- Kapiláry fenestrované (viscerálního typu) – mají ve stěnách vytvořeny otvory přepažené diafragmatem. Vyskytují se např. ve střevě nebo žlázách s vnitřní sekrecí
- Kapiláry s póry – ve stěně mají pravé otvory bez přepážky, bazální lamína je souvislá. Vyskytují se pouze v glomerulech ledvin
- Kapiláry sinusoidní – mají nepravidelné lumen, četné póry, bazální lamína není kontinuální. Nachází se v játrech, kostní dřeni, slezině (2)

2.3 Arterie

Arterie jsou cévy přivádějící tkáním krev obsahující kyslík a živiny. Jsou charakteristické poměrně tlustou a pružnou stěnou, která udržuje svůj tvar i při poklesu náplně cévy. Podle průměru dělíme arterie na arterioly, arterie malého a středního kalibru a arterie velkého kalibru (2).

Arterioly mají průměr menší než 0,5 mm. V poměru k tloušťce stěny mají relativně úzké lumen. *Tunica intima* je tvořena endotelem a tenkou subendotelovou vrstvou. *Tunica media* je složena z 1 až 5 vrstev hladkých svalových buněk, v menších arteriolách je tato vrstva nesouvislá. Membrana elastica interna a externa nejsou vyvinuty. *Tunica adventitia* je velmi tenká (2).

Arterie malého a středního kalibru jsou arterie **svalové**. Mají poměrně tlustou stěnu vzhledem ke svému průsvitu. *Tunica intima* je tvořena vrstvou endotelových buněk a subendotelovou vrstvou, která je silnější než u arteriol. Mohou se zde nacházet i hladké svalové buňky. Dobře vyvinuta je membrana elastica interna. *Tunica media* je tvořena až 40 vrstvami hladkých svalových buněk uspořádaných do svazků. Nacházíme zde i elastická vlákna. Ve větších arteriích je vyvinuta membrana elastica externa. *Tunica adventitia* obsahuje longitudinálně uspořádaná kolagenní a elastická vlákna, fibroblasty a nepříliš četné adipocyty. Ve stěnách těchto arterií nacházíme vasa vasorum, lymfatické kapiláry a nervová vlákna. Tento typ arterií zajišťuje distribuci krve jednotlivým orgánům (2).

Arterie velkého kalibru jsou arterie **elastické**, do této skupiny patří aorta a její velké větve. *Tunica intima* je tlustší než u svalových arterií. *Tunica media* je tvořena hladkými svalovými buňkami upnutými do elastických membrán. Tyto membrány mají otvory, nazývají se proto *membranae fenestrace*. Membrana elastica interna a externa nejsou odlišitelné od ostatních elastických blanek. *Tunica adventitia* je tenká, tvořená elastickými a kolagenními vlákny. Tyto arterie díky své elasticitě zajišťují kontinuální tok krve v průběhu diastoly (2).

2.4 Vény

Vény mají morfologickou stavbu blízkou tepnám. Mají však tenčí stěny a při poklesu náplně nedrží svůj tvar. Nejtlustší vrstvou stěny vény je *tunica adventitia*, u

arterií *tunica media*. Obdobně jako arterie, dělíme i vény podle průměru na venuly a malé, střední a velké vény (2).

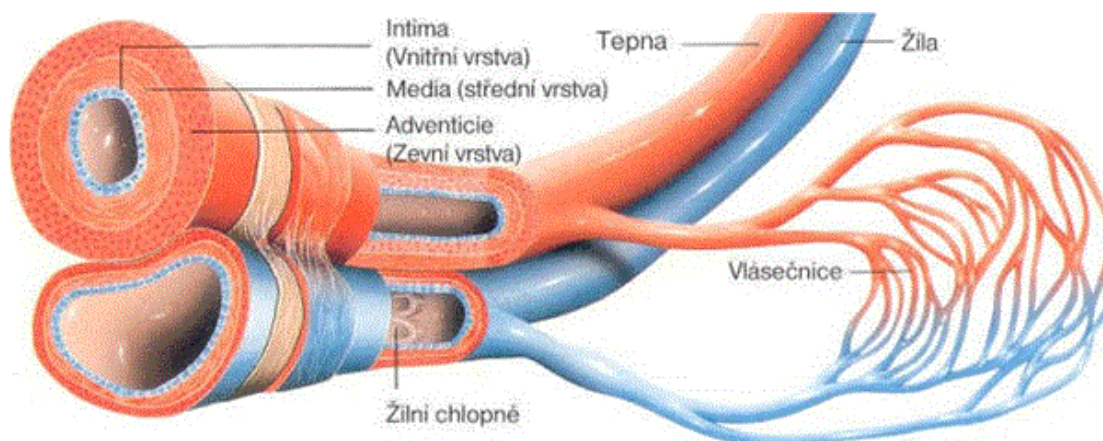
Venuly mají průměr 0,2-1mm. *Tunica intima* je tvořena endotelem a slabou vrstvou subendotelového vaziva. *Tunica media* je tenká, tvořená hladkými svalovými buňkami. Ty mohou v některých venulách i chybět. *Tunica adventitia* je netlustší vrstvou. Je složená z kolagenního vaziva (2).

Malé a střední vény mají průměr 1-9 mm. *Tunica intima* je tvořena endotelem a tenkou subendotelovou vrstvičkou. Výchlipky *tunica intima* tvořené elastickým vazivem a lemované endotelem tvoří chlopně. Ty se nacházejí hlavně ve vénách dolních končetin a usměrňují tok krve směrem k srdci. *Tunica media* obsahuje hladké svalové buňky prostoupené sítí elastických vláken. *Tunica adventitia* je silná, tvořená hlavně kolagenními vlákny, mohou se zde však vyskytnout i hladké svalové buňky (2).

Tunica intima velkých vén je dobře vyvinuta. Je tvořena endotelem a subendotelovou vrstvou, ve které můžeme nalézt longitudinálně uspořádané hladké svalové buňky. *Tunica media* je tenká, tvořená hladkými svalovými buňkami. Ty mohou být redukovány a nahrazeny vazivovou tkání. *Tunica adventitia* je nejtlustší vrstvou. Je tvořena longitudinálními svazky hladkých svalových buněk, které cévu zpevňují. V adventicii horní a dolní duté žíly před vyústěním do srdce nacházíme také příčně pruhovanou srdeční svalovinu (2).

Obrázek 3: Porovnání cévní stěny arterie a vény

<http://files.didsom.webnode.cz/200000000-1d1261e0cd/teply.gif> (15. 4. 2013)



3 ENDOTEL

Endotel je jednovrstevná výstelka cév tvořící rozhraní mezi krví a tkáněmi. Dlouhou dobu se předpokládalo, že jeho jedinou funkcí je tvorba této bariéry a udržení nesmáčivého povrchu cév. Bylo však prokázáno, že endotel je důležitý metabolicky vysoce aktivní orgán s celou řadou fyziologických funkcí (4).

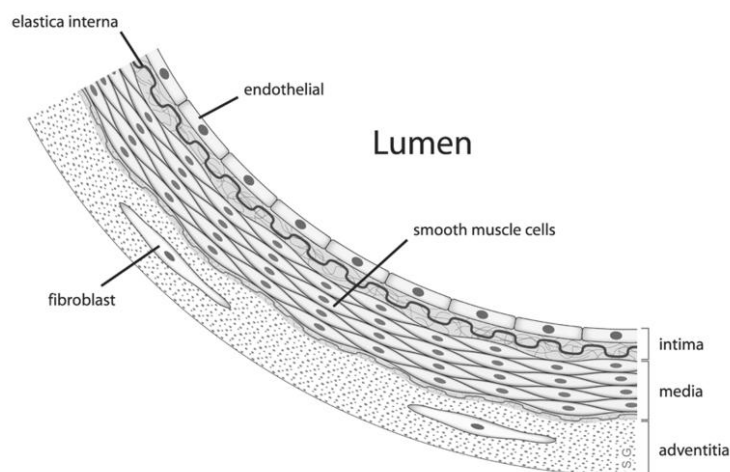
3.1 Stavba a funkce endotelu

Endotel je z histologického hlediska tvořen jednou vrstvou buněk dlaždicového epitelu. Endoteliální buňky jsou polygonální, ploché, většinou protažené ve směru proudění krve. V centrální části buňky je umístěno ploché jádro (2).

Endotel má v organismu celou řadu regulačních funkcí. Reguluje permeabilitu cév, zajišťuje optimální průtok krve, udržuje cévní tonus, udržuje v rovnováze koagulační procesy a podílí se i na imunitní odpovědi (5) (6).

Obrázek 4: Endotel na povrchu cévní stěny

http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Anatomy_artery.png (15. 4. 2013)



1. regulace cévní permeability

Základní funkcí endotelu je vytvoření semipermeabilní membrány mezi krví a tkáněmi a zabránění přestupu škodlivých látek do cévní stěny. Reguluje tak průnik vody,

elektrolytů a jiných nízkomolekulárních látek, dále proteinů, lipoproteinů i některých buněk, zejména monocytů a leukocytů. Nízkomolekulární látky přestupují přes membránu po koncentračním a tlakovém gradientu, velké molekuly prostupují díky specifickým a nespecifickým přenašečům. Buněčné struktury procházejí přes endotel složitým mechanismem pomocí adhezivních molekul. Při poškození endotelu, nebo jeho patologické aktivaci se propustnost endotelu zvyšuje, což může vést ke kumulaci látek v subendoteliálním prostoru a rozvoji aterosklerotických změn (7) (8).

2. Regulace cévního tonu

Endotel udržuje cévní tonus pomocí syntézy nebo aktivace a degradace vazomotorických látek. Tyto látky mají buď vazokonstrikční, nebo vazodilatační účinky. Pravděpodobně nejdůležitějším vazodilatačním faktorem je endoteliální relaxační faktor (EDRF/NO), dále prostacyklin (PGI₂), prostaglandin E₂ a bradykinin. Nejsilnějším vazokonstrikčním působkem je endotelin 1 (ET1), další důležité vazokonstriktory jsou angiotensin II, acetylcholin a tromboxan A₂. Při poškození funkce endotelu dochází k narušení rovnováhy mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními faktory, dochází k poklesu produkce NO a zvýšenému působení vazokonstriktorů, což má za následek cévní spazmy (7).

3. Antikoagulační a fibrinolytické vlastnosti

Endotel vytváří dokonale nesmáčivý povrch, jehož úkolem je udržovat rovnováhu mezi faktory regulujícími trombotické a fibrinolytické procesy. Adhezi a agregaci trombocytů brání produkce EDRF a prostacyklinu. Antikoagulační aktivita spočívá ve vytvoření bariéry mezi cirkulujícími koagulačními faktory a tkáňovým faktorem a také v produkci antikoagulačně působícího heparansulfátu a trombomodulinu a inhibitoru tkáňového faktoru. Fibrinolytických procesů se endotel účastní produkcí tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) a inhibitorů plazminogenových aktivátorů (PAI-1,2) (8).

4. Ovlivnění struktury cévní stěny

Strukturu cévní stěny ovlivňuje endotel produkcí látek s růst stimulujícími a růst inhibujícími účinky. Při zvýšeném mechanickém napětí cévní stěny dochází k produkci látek s mitogenními účinky. Jsou to např. PDGF (destičkami produkovaný růstový

faktor), IGF (inzulinu podobný růstový faktor), FGF (fibroblastový růstový faktor), endotelin-1 nebo angiotensin II. Proliferaci hladké svaloviny tlumí např. EDRF/NO nebo prostacyklin. Největší význam má pravděpodobně EDRF/NO. Právě jeho nedostatek je zřejmě příčinou hypertrofie cévní stěny u nemocných s hypertenzí (7).

5. Interakce s buňkami krevního oběhu

Endotel na svém povrchu exprimuje adhezivní molekuly, zajišťující interakci s buňkami krevního oběhu. Za fyziologického stavu je tato exprese minimální. Při poškození endotelu dochází ke zvýšené expresi adhezivních molekul, např. ICAM-1 (intercellular cell adhesion molekule-1), ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molekule-1) a E-selektinu, které zprostředkovávají adhezi leukocytů k endotelu a jejich migraci do cévní stěny (7).

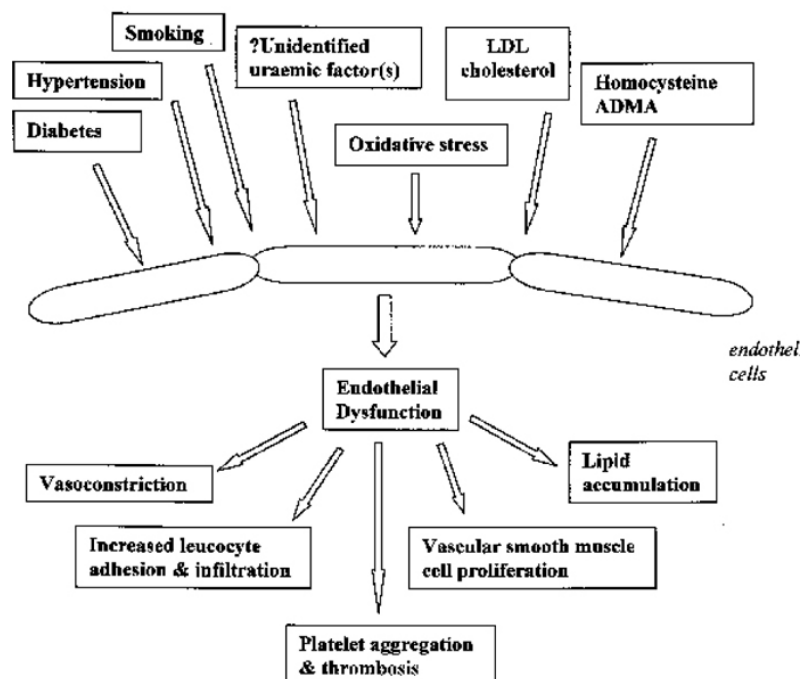
3.2 Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce

Endotel je neustále se měnící povrch odpovídající na celou řadu podnětů. Aktivace těmito podněty se může projevat např. zvýšením permeability, vasospastickou reakcí, porušením hemostatických nebo fibrinolytických mechanismů či uvolněním růstových faktorů. Na rozdíl od endoteliální dysfunkce je tento stav pouze přechodný, způsobený např. reakcí na akutní infekce nebo stres (7).

Rizikové faktory jako hyperlipoproteinémie, hypertenze, kouření nebo diabetes vedou k endoteliální dysfunkci. Endoteliální dysfunkce je charakterizovaná jako lokalizované či generalizované postižení endotelu, kdy dochází ke zvýšení permeability cévní stěny, vzniku nerovnováhy mezi faktory vazokonstrikčními a vazodilatačními, prokoagulačními a antikoagulačními a růst stimulačními a růst inhibujícími. Výsledkem je proaterogenní účinek s převahou faktorů vazokonstrikčních, prokoagulačních a proliferačních. Endoteliální dysfunkce je považována za první stadium aterosklerózy, má však svůj význam i v patogenezi hypertenze, diabetu, ICHS či srdečního selhání. (7)

Obrázek 5: Příčiny a projevy endoteliální dysfunkce

<http://www.tmj.ro/article.php?art=3231885564124450> (17. 4. 2013)



3.3 Endoteliální dysfunkce a hypertenze

Důležitou roli v poškození endotelu u nemocných s hypertenzí hraje především zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron. Ta má za následek snížení syntézy PGI_2 a EDRF/NO, což vede ke zvýšení exprese endotelinu-1 a převaze vazokonstrikčních faktorů. Dále bylo zjištěno zvýšení exprese adhezivních molekul, zejména ICAM-1 a zvýšení permeability endotelu. Vztah hypertenze a endoteliální dysfunkce je však oboustranný, bylo popsáno i zvýšení krevního tlaku následkem snížené produkce NO či prostacyklinu (7).

3.4 Endoteliální dysfunkce a hyperlipoproteinémie

Krátkodobé působení aterogenních lipidů na endotel vede k jeho aktivaci, při dlouhodobé expozici vzniká endoteliální dysfunkce. Ta je způsobena především sníženou aktivitou NO, který je nadměrně degradován kyslíkovými radikály. Snížená aktivita NO pak vede ke zvýšené expresi růstových faktorů, migraci monocytů a LDL

do subendoteliálního prostoru a následnému vzniku pěnových buněk. Přítomnost lipoproteinu(a) vede k inhibici fibrinolýzy a podílí se tak na vzniku trombotických komplikací (9).

3.5 Endoteliální dysfunkce a diabetes mellitus

Následkem hyperglykémie dochází ke glykosylaci lipoproteinů (LDL), bílkovin a rovněž některých enzymů. Glykosylace proteinů vede ke zvýšení permeability pro aterogenní lipidy. Hyperglykémie také aktivuje endotel ke zvýšené expresi adhezivních molekul a následnému průniku monocytů do cévní stěny. Dochází také ke změnám v produkci vazodilatačních a koagulačních působků. Snižuje se tak syntéza např. protacyklinu a NO, naopak zvyšuje se syntéza PAI-1 nebo von Willebrandova faktoru (7).

3.6 Endoteliální dysfunkce a ateroskleróza

Endoteliální dysfunkce je prvním krokem vzniku aterosklerózy. V časně fázi hraje roli především zvýšená permeabilita umožňující pronikání aterogenních lipidů a monocytů do cévní stěny. Dále se uplatňuje nedostatečná produkce vazodilatačně, antiadhezivně a antitromboticky působícího NO a nadměrná produkce kontraktilních a růst stimulujících faktorů. Zvýšená exprese adhezivních molekul umožňuje interakci s cirkulujícími leukocyty, jejich adhezi a subendoteliální migraci. V subendoteliálním prostoru dochází k oxidaci LDL a jejich následnému pohlcení monocyty. Ty se mění na pěnové buňky a následně vznikají tukové proužky. Následnou kumulací krevních buněk a lipoproteinů dochází ke vzniku aterosklerotického plátu. V pozdních fázích aterosklerózy se projevuje zvýšená trombotická aktivita v místě endoteliální dysfunkce a zvyšuje se riziko ruptury plátu. Vznikají tak nestabilní léze s vysokým obsahem lipidů a makrofágů, které se mohou manifestovat akutními kardiovaskulárními příhodami (10).

3.7 Možnosti detekce endoteliální dysfunkce

K posouzení funkčního stavu se v současnosti používají 3 metody

- Sledování cévní reaktivity na vazoaktivní podněty
- Stanovení endoteliálních působků
- Sledování metabolismu značených prekurzorů

Sledování cévní reaktivity

Při této metodě se používá farmakologických testů zjišťujících reakci cévy na vazokonstrikční nebo vazodilatační podněty. Používá se např. podání acetylcholinu, který stimuluje NOS a následně dochází k vazodilataci, u dysfunkce pozorujeme vazokonstrikci. Vedle farmakologických testů se používá i tzv. „flow-mediated dilatation“, kdy se sleduje dilatace cévy po zvýšení průtoku. Výsledky se hodnotí buď invazivní metodou (angiografie) nebo neinvazivně pomocí ultrasonografie (4).

Stanovení endoteliálních působků

Další možností je stanovení látek produkovaných endotelem. Stanovují se např. hladiny EDRF/NO, endotelinu-1, adhezivních molekul (E a P-selektin, ICAM-1, VCAM-1), koagulačních faktorů (PAI, t-PA) (4).

Sledování metabolismu značených prekurzorů

Jedná se o dynamické testy sledující osud radioizotopem značených substrátů, např. L-argininu. (4)

3.8 Léčba endoteliální dysfunkce

Včasnou léčbou endoteliální dysfunkce je možné předejít rozvoji aterosklerózy nebo zabránit její další progresi stabilizací již rozvinutých aterosklerotických lézí. Léčba by měla směřovat k obnovení fyziologických funkcí endotelu. Toho je možno dosáhnout režimovými opatřeními zaměřenými na eliminaci rizikových faktorů. Pokud toto není možné nebo nedochází k žádoucímu zlepšení, přistupuje se k léčbě

farmakologické stimulující vazodilatační, antiadhezivní a antiagregační vlastnosti endotelu.

- Nefarmakologická léčba

Základem režimových opatření je omezení vlivu rizikových faktorů úpravou životosprávy. Odstranění vlivu kouření vede do několika měsíců k normalizaci endoteliální funkce. U diabetiků bylo dosaženo zlepšení endoteliální dysfunkce úpravou hladiny glykémie, u pacientů s hyperlipoproteinémií je třeba úprava stravovacích návyků. U pacientů se srdečním selháním a obecně u všech pacientů je doporučeno přiměřeně zvýšit fyzickou aktivitu. Tato opatření jsou současně prevencí aterosklerózy u zdravých jedinců.

- Farmakologická léčba

K farmakologické úpravě endoteliální dysfunkce se používají především:

1. Hypolipidemika- z této skupiny se nejvíce osvědčily inhibitory HMG-CoA reductázy neboli statiny
2. Inhibitory ACE
3. Antioxidační látky
4. Estrogeny
5. Blokátory kalciových kanálů

(11)

4 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je chronické pomalu progredující zánětlivé onemocnění postihující tepny vzniklé na podkladě endoteliální dysfunkce. Pojem ateroskleróza vznikl spojením řeckých slov atharé = kaše a skleros = tvrdý (12).

Pojem ateroskleróza bývá často zaměňován s pojmem arterioskleróza. Pojem arterioskleróza je širší a zahrnuje aterosklerózu, arteriosklerózu a Mönckebergovu mediokalcinózu. Tyto stavy se liší velikostí a umístěním postižených tepen. Ateroskleróza postihuje velké a střední tepny svalového a elastického typu (např. aorta, věnčité tepny, krkavice), při arterioskleróze jsou postiženy malé arterie a arterioly. Projevem arteriosklerózy je ischemie způsobená ztluštěním stěny arterie a zúžením lumina. Arteriosklerózou jsou postiženi hlavně pacienti s hypertenzí a diabetem (12). Jako Mönckebergova mediokalcinóza se označuje stav, kdy dochází ke kalcifikaci a hyalinizaci tunica media tepen horních a dolních končetin. To se projevuje zvýšenou tuhostí tepny, v ojedinělých případech mohou být tepny i hmatné, ale nesnižuje se jejich průsvit (13).

Aterosklerózou bývají postiženi většinou starší jedinci, avšak již v mladém věku (kolem 20 let) bývají na stěnách cév pozorovatelné nažloutlé proužky, tzv. lipidní skvrny, které později přecházejí ve fibrózní pláty. Fibrózní pláty mohou kalcifikovat a vytvářet tak ateromové pláty (12).

Podle lokalizace můžeme aterosklerózu rozdělit na centrální a periferní typ. Centrálním typem označujeme aterosklerózu vznikající na aortě. Nejvíce bývá postižena aorta břišní, po rozvětvení aorty obě velké tepny směřující do končetin. Při masivním postižení stěny aterosklerózou se snižuje pevnost cévy a může dojít k výduť. Tuto výduť nazýváme aterosklerotické aneurysma. Periferním typem aterosklerózy jsou postiženy především věnčité, mozkové a ledvinové tepny. V těchto tepnách vede ateroskleróza k zúžení cévního průsvitu, nasedající trombóze, případně krvácení do aterosklerotického plátu. Tento stav vyvolá ischemické změny v orgánech zásobených těmito tepnami. Rozsah poškození závisí na velikosti postižené tkáně a době trvání ischemie. Právě aterosklerotické komplikace patří k nejčastějším příčinám úmrtí (12).

4.1 Epidemiologie

Ateroskleróza je hlavní příčinou nemocnosti a úmrtí v průmyslově rozvinutých zemích. Přesné statistiky, kolik procent obyvatel aterosklerózou trpí, nejsou známy, neboť ateroskleróza se většinou zjistí, až když se manifestuje některým z kardiovaskulárních onemocnění. Na následky kardiovaskulárních onemocnění umírá v Evropské unii 42% obyvatel. V České republice je to dokonce 50% (14). Nižší prevalence aterosklerózy byla zjištěna ve střední a jižní Americe, Africe a Asii. Nižší úmrtnost na KVO je také ve Francii a Středomoří a u Eskymáků (15).

Tabulka 1: Příčiny úmrtí v České republice v r. 2000 (%) (14)

(17. 4. 2013)

Úmrtnost v ČR v roce 2000 (%)		
	muži	ženy
Kardiovaskulární onemocnění	49,6	54,9
Nádory	28,1	25,9
ostatní	22,3	29,2

4.2 Rizikové faktory aterosklerózy

Soubor faktorů, které se podílejí na vzniku aterosklerózy, nazýváme rizikovými faktory aterosklerózy. Rizikové faktory aterosklerózy dělíme primárně podle možnosti jejich ovlivnění. Jsou to rizikové faktory ovlivnitelné a neovlivnitelné. Třetí skupinu tvoří faktory, které se pravděpodobně také podílejí na vzniku aterosklerózy, ale jejich význam ve vztahu k ateroskleróze nebyl zatím dostatečně prozkoumán (15).

Mezi neovlivnitelné faktory patří:

- Věk – vyšší riziko je u mužů starších 45 let a žen starších 55 let
- Pohlaví - více jsou ohroženi muži
- Rodinná anamnéza
- Příslušnost k etnické skupině

Hlavní ovlivnitelné faktory jsou:

- Kouření
- Hypertenze
- Hypercholesterolémie
- Diabetes

Další rizikové faktory:

- Obezita
- Fyzická inaktivita
- Dlouhodobý stres
- Postmenopauzální deficit estrogenů
- Hyperhomocysteinémie
- Zvýšení CRP
- Zvýšení příjem cukrů a trans-nenasycených mastných kyselin v potravě

Rizikové faktory mají aditivní charakter. To znamená, že čím více rizikových faktorů současně působí, tím je riziko vzniku aterosklerózy vyšší. Při působení dvou faktorů najednou se riziko zvyšuje čtyřikrát, při působení třech faktorů dokonce sedmkrát (15).

Pokud se u pacienta vykytuje více rizikových faktorů současně, hovoříme o metabolickém syndromu. Tento stav u pacientů výrazně zvyšuje riziko vzniku aterosklerózy a jejích pozdějších komplikací. V České republice trpí metabolickým syndromem 32% mužů a 24% žen ve věku 24-65 let. Ve skupině nad 65 let je výskyt ještě vyšší.

Tabulka 2: Definice metabolického syndromu (14) (17. 4. 2013)

Veličina	Hodnota
Obvod pasu (cm)	Muži ≥ 102 , ženy ≥ 88
+ 2 z následujících charakteristik:	
Krevní tlak (mm Hg)	$\geq 130/85$
Triglyceridémie (mmol/l)	$\geq 1,7$
HDL cholesterol (mmol/l)	Muži $\leq 1,04$, ženy $\leq 1,29$
Glykémie nalačno (mmol/l)	$\geq 5,6$ nebo diagnostikovaný diabetes mellitus

4.3 Tabulka kardiovaskulárního rizika

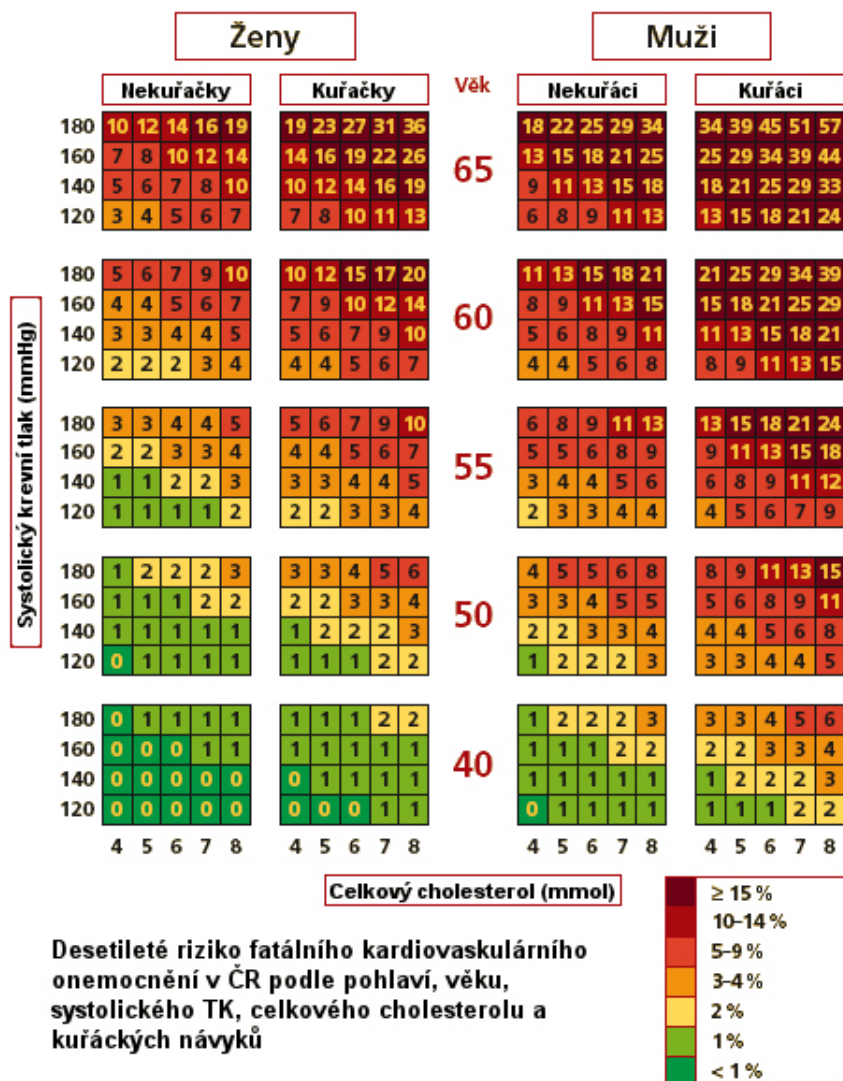
Tyto tabulky jsou výsledkem projektu SCORE. Pomocí metody SCORE můžeme určit procentuální riziko fatální kardiovaskulární příhody v následujících deseti letech.

Tabulka vychází z těchto hodnot:

- Věk
- Pohlaví
- Kouření
- Hodnota systolického tlaku (mmHg)
- Hodnota celkového cholesterolu (mmol/l)

Tabulka 3: Tabulka kardiovaskulárního rizika

<http://www.stefajir.cz/files/Score.jpg> (17. 4. 2013)



Hodnoty absolutního rizika odečteného z tabulek SCORE jsou vyšší:

- U osob, které se věkem blíží vyšší věkové kategorii
 - U asymptomatických osob vykazujících známky aterosklerózy (zjištěných při ultrasonografickém vyšetření, nálezů kalcifikací v tepnách, nebo stanovení kalciového skotu pomocí CT)
 - U osob s pozitivní rodinnou anamnézou KVO
 - U osob s nízkou koncentrací HDL cholesterolu
 - U osob s porušenou glukózovou tolerancí
 - U osob se zvýšenou hladinou C-reaktivního proteinu, homocysteinu, apolipoproteinu B nebo Lp(a)
 - U obézních nebo fyzicky inaktivních osob
- (16)

4.4 Patogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění cév vycházející z kaskády na sebe navazujících dějů. Dříve se soudilo, že ateroskleróza vzniká pasivním ukládáním lipidů do stěny arterií. Intenzivní výzkum posledních let však dokazuje, že tento proces je aktivní a podílí se na něm celá řada faktorů, zejména endoteliální buňky a buňky monocyto-makrofágové linie. Ateroskleróza postupně progreduje a její vývoj se dá rozdělit na několik fází (15).

4.4.1 Úloha lipoproteinů v patogenezi aterosklerózy

Lipidy jsou v plazmě transportovány ve formě lipoproteinů (LP). Lipoproteiny jsou kulovité částice složené z jádra a obalu. Jádro lipoproteinů je hydrofobní a je tvořeno estery cholesterolu a triacylglyceroly (TAG). Tyto částice tvoří transportní formy cholesterolu. Obal lipoproteinu je tvořen amfifilními látkami jako apolipoproteiny, fosfolipidy a cholesterolem. Lipoproteiny můžeme dělit do skupin podle jejich denzity, velikosti, složení lipidů nebo podle obsažených apolipoproteinů (17).

V patogenezi aterosklerózy hraje hlavní roli částice o nízké hustotě - LDL (low-density lipoprotein). LDL částice je hlavní transportní formou cholesterolu zajišťující přísun cholesterolu buňkám, které nejsou samy schopny cholesterol vytvářet. A právě v této podobě proniká cholesterol do cévní stěny (8).

Prekurzorem LDL je lipoprotein o velmi nízké hustotě - VLDL (very low-density lipoprotein) tvořený v játrech. Účinkem lipoproteinové lipázy lokalizované na endotelu jsou VLDL štěpeny na lipoproteiny střední hustoty- IDL (intermediate-density lipoprotein). IDL jsou dále štěpeny lipoproteinovou a jaterní lipázou na LDL (8).

Ve stěnách cév jsou LDL odbourávány jednak navázáním na LDL-receptory, jednak navázáním na scavengerové receptory. Na LDL-receptory jsou vázány pomocí apolipoproteinů B a E. Uvolněný cholesterol je pak využit buňkou a zpětnovazebně inhibuje syntézu endogenního cholesterolu a LDL-receptorů. Na rozdíl od LDL-receptorů, scavengerové receptory na buňkách monocyto-makrofágové linie nejsou zpětnovazebně regulovány. Jejich počet tedy roste se vzrůstající koncentrací LDL. Tím se zvyšuje kumulace LDL v monocytech a makrofázích, potencuje se jejich přeměna na pěnové buňky a urychluje se rozvoj aterosklerózy (8).

Nadbytek volných radikálů vede k modifikaci LDL, především oxidaci a glykaci. Takto pozměněné formy LDL jsou pak přednostně vychytávány scavengerovými receptory monocytů a makrofágů. Poslední výzkumy ukazují, že právě oxidované formy LDL by mohly být antigenem stimulujícím imunitní systém ve stěně cévy. Zdá se, že hladina oxidovaných LDL je v přímém vztahu s rozvojem aterosklerózy (18).

Tabulka 4: Přehled LP

www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/cholesterol.ppt (17. 4. 2013)

Třída	Původ	Poločas přeměny	Hlavní apoproteiny	Hlavní lipidy	Funkce
Chylomikrony	střevo	5-15 min	B-48, C-II, E	TG	transport exogenních lipidů
VLDL	játra	2h	B-100, E, C-II	TG	transport endogenních lipidů
IDL	plasma	2h	B-100, E, C-II	TG/CHE	meziprodukt katabolismu VLDL
LDL	plasma	2-4 dny	B-100	CHE	transport cholesterolu do buněk
HDL (nascentní)	játra, střevo, plasma	10h ?	A-I, C-II, E	PL/CHE	reverzní transport cholesterolu, remodelace lipoprot.

4.4.2 Vliv endotelu na patogenezi aterosklerózy

Endotel, jak již bylo zmíněno, je tvořen jednou vrstvou plochých epiteliálních buněk, a tvoří nejnvnitřnější vrstvu cévní stěny. Jeho na sebe těsně nasedající buňky tvoří semipermeabilní membránu mezi krví a tkáněmi a jsou mechanicky odolné vůči tlakovým změnám uvnitř cév. Endotel má též radu regulačních funkcí (19).

Iniciálním stadiem v patogenezi aterosklerózy je aktivace endotelu. Endotel je aktivován klasickými rizikovými faktory, jako je kouření, hypertenze atd. Dále se na jeho aktivaci podílí zánět a přítomnost oxidovaných LDL. Aktivované endoteliální buňky mění svůj tvar a zvyšují svoji permeabilitu. To usnadňuje pronikání oxidovaných LDL částic a dalších elementů do cévní stěny. Aktivovaný endotel na svém povrchu také exprimuje množství adhezivních molekul, které usnadňují navázání buněk imunitního systému. Mezi adhezivní molekuly patří:

- VCAM-1 (vascular cell adhesion molekule-1)
- ICAM-1 (intercellular cell adhesion molekule-1)
- E a P selektiny

Dalším důležitým faktorem v patogenezi aterosklerózy je vazodilatačně působící NO. V aktivovaném endotelu je tvorba NO snížena, což je důsledek působení

oxidovaných forem LDL částic. Snížená produkce NO způsobí narušení rovnováhy vazoaktivních látek a převahu vazokonstrikčních. Tato nerovnováha vyústí ve spasmus cévy. Následkem snížení hladiny NO dojde také ke zvýšené agregaci trombocytů a adhezi leukocytů. Endotel se také podílí na regulaci koagulačních a fibrinolytických procesů. Za fyziologického stavu jsou tyto procesy v rovnováze, v aktivovaném endotelu však dochází k narušení rovnováhy a převaze prokoagulačních faktorů (19).

4.4.3 Role monocytů a makrofágů v patogenezi aterosklerózy

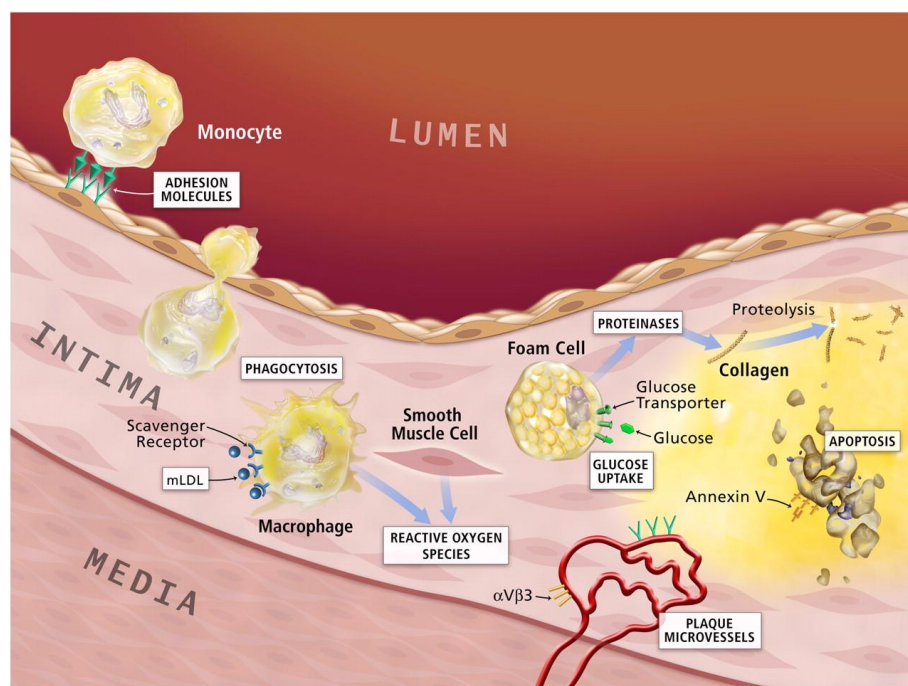
Buňky monocyto-makrofágové linie jsou pravděpodobně hlavními buněčnými elementy podílející se na vývoji aterosklerózy a jsou v různém množství pozorovatelné téměř ve všech aterosklerotických plátech. Tyto buňky pronikají do arteriální stěny stejným mechanismem jako do ostatních tkání, důležitou roli zde hraje přichycení díky adhezivním molekulám produkovaným aktivovaným endotelem. Ve stěně intimy dochází k aktivaci a diferenciaci monocytů a jejich přeměně na makrofágy. Na svém povrchu exprimují široké spektrum růstových faktorů, zánětlivých mediátorů, enzymů a dalších působků. Nejvíce je makrofágy produkován růstový faktor VEGF (vascular endothelial growth factor). Mezi mediátory zánětu produkované makrofágy patří interleukiny IL-1, IL-2, TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa) a INF- γ (interferon gama). Tyto substance vedou k aktivaci dalších buněk, a to jak endotelových tak buněk monocyto-makrofágové linie a tím další progresi aterosklerózy (20).

Makrofágy, podobně jako ostatní buňky, exprimují na svém povrchu LDL-receptory, jejichž počet je zpětnovazebně regulován množstvím LDL. Kromě těchto receptorů vytváří na svém povrchu i scavengerové receptory s podobnou strukturou, jejich počet však není zpětnovazebně ovlivňován a naopak se stoupající hladinou LDL počet těchto receptorů a následně množství pohlcených LDL roste. Tyto scavengerové receptory vykazují větší afinitu k oxidovaným formám LDL částic. Kumulace velkého množství LDL částic v makrofázích vede k jejich náhlému zvětšení, což znemožňuje opustit arteriální stěnu. Makrofág tak zůstává uvězněn v mezibuněčné hmotě a mění se na pěnovou buňku. Dochází k apoptóze makrofágů. Pěnové buňky jsou základním buněčným elementem nacházející se v aterosklerotickém plátu. Tyto struktury jsou však nestabilní a hrozí jejich rozpad. V takovém případě se uvolní intercelulární obsah bohatý na tuk a dává vzniknout extracelulární ateromové mase (8).

Makrofág je také zdrojem skupiny enzymů nazývaných matrixové metaloproteinázy. Jedná se o skupinu enzymů vázající ve svém aktivním místě zinek nezbytný pro správnou funkci enzymu. Tyto proteiny se podle funkce dělí do několika skupin, např. kolagenázy, galetinázy, elastázy (21). Tyto enzymy jsou hojně produkovány jak makrofágy, tak i pěnovými buňkami. Svým působením rozrušují extracelulární matrix, čímž snižují stabilitu aterosklerotického plátu a zvyšují riziko ruptury (8).

Obrázek 6: Patogeneze aterosklerózy

http://jnm.snmjournals.org/content/51/Supplement_1/33S/F2.large.jpg (17. 4. 2013)



4.4.4 Úloha hladkých svalových buněk v patogenezi aterosklerózy

V cévní stěně se vyskytují dva druhy hladkých svalových buněk. Jsou to buňky kontraktilní a sekreční. Na aktivovaném endotelu dochází působením růstových faktorů, především PDGF, ke změně fenotypu buněk z kontraktilního na sekreční typ. Sekreční typ buněk je charakteristický ubýváním aktinu a myozinu, v důsledku toho ztrácí schopnost kontrakce. Naopak buňka získává schopnost proliferace, migrace a sekrece mezibuněčné matrix. Tato sekrece vede k narůstání ateromového plátu a může tak

zužovat průsvit cévy. Na druhé straně množství kolagenních a elastických vláken stabilizuje plát a zabraňuje ruptuře (7) (8).

4.4.5 Stádia aterosklerózy

Jak již bylo zmíněno, ateroskleróza je postupně progredující onemocnění a její vývoj lze rozdělit do několika stádií.

- I. Stadium – tvorba lipidového proužku

Iniciálním stadiem aterosklerózy je pronikání LDL do intimy a média cévní stěny. Jejich přítomnost vyvolává zvýšenou aktivitu monocytů, které je pomocí scavengerových receptorů pohlcují a mění se na makrofágy. Rychlá kumulace LDL v makrofázích vede k jejich náhlému zvětšení a přeměně na pěnové buňky. Nahromaděním pěnových buněk vzniká lipidový proužek, který se může makroskopicky projevat jako nažloutlé tečky či proužky. Toto stadium je zcela bez klinických příznaků. Při poklesu hladiny LDL v krvi může docházet k regresi, většinou však přechází do II. stadia (22) (23).

- II. Stadium - tvorba fibrózního plátu

V další fázi se významně uplatňují buňky hladkého svalstva. Ty proliferují, migrují do subendotelového prostoru a produkují mezibuněčnou hmotu. Zároveň tvoří i proteolytické enzymy, které tuto hmotu odbourávají a umožňují tak buňkám migraci. Zmnožováním vaziva vznikají fibrózní pláty. Pěnové buňky, které se v tomto stádiu vytváří i z hladkých svalových buněk, postupně odumírají, jejich obsah uvolněný do okolního prostoru tvoří ateromové pláty. Pro ně je charakteristické tukové jádro kryté vazivovou čepičkou, která může být různě silná. Tyto pláty již zužují průsvit cévy a mohou se tak klinicky manifestovat příznaky z nedokrvení orgánů (22) (14).

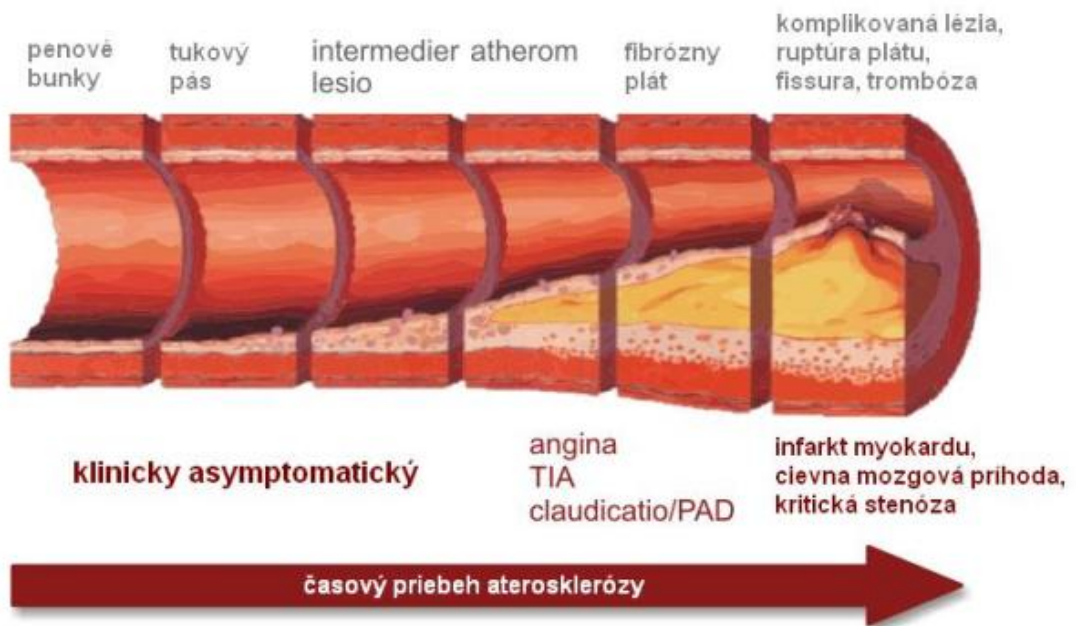
- III. Stadium – ateromový vřed

Ateromový vřed vzniká z plátu s tenkou čepičkou. Ta může prasknout a odhalit ateromový plát, který je vysoce trombogenní. Začnou na něj tedy nasedat trombocyty a vytváří se krevní sraženina. Tato sraženina může úplně uzavřít

některé menší tepny a dochází k ischemii, což je nejčastější komplikace aterosklerózy. Ve větších tepnách nemusí tromby omezovat průtok, část trombu se ale může odtrhnout a embolizovat na periférii (22) (14).

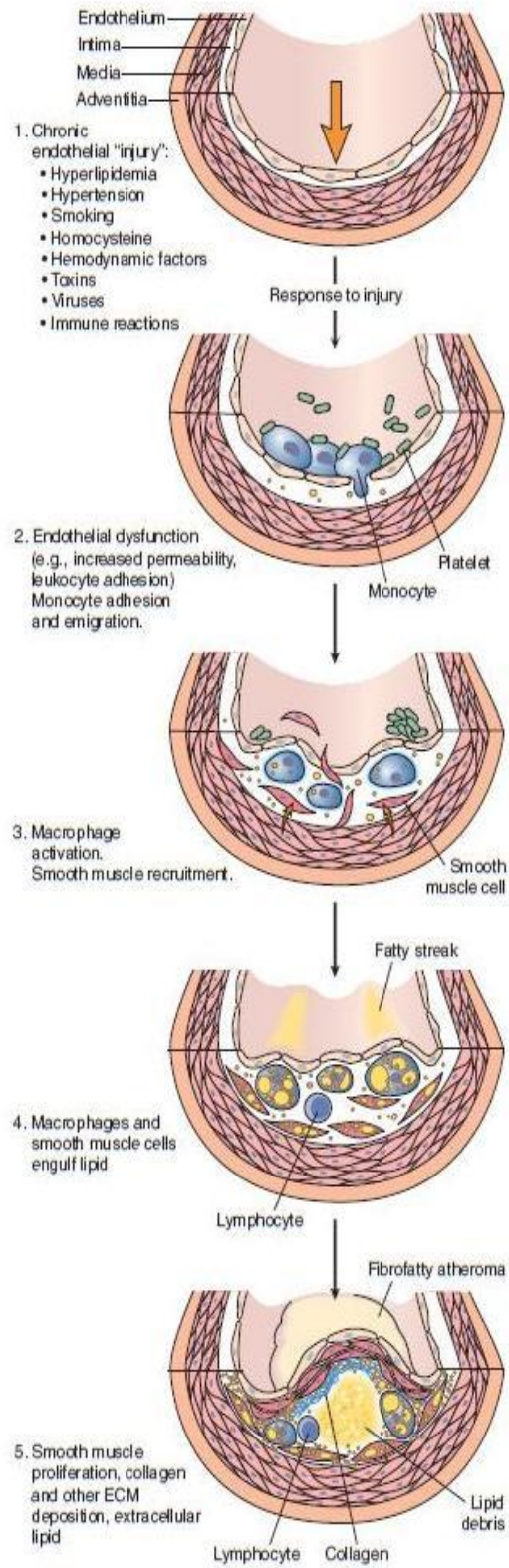
Obrázek 7: Progrese aterosklerózy v čase

<http://www.arteriograf.hu/pic/article/slovak/athero-SK.png> (18. 4. 2013)



Obrázek 8: Progrese aterosklerózy

(15) str. 347



4.4.6 Typy ateromových plátů

Podle charakteru čepičky rozlišujeme dva druhy ateromových plátů:

- Stabilní plát

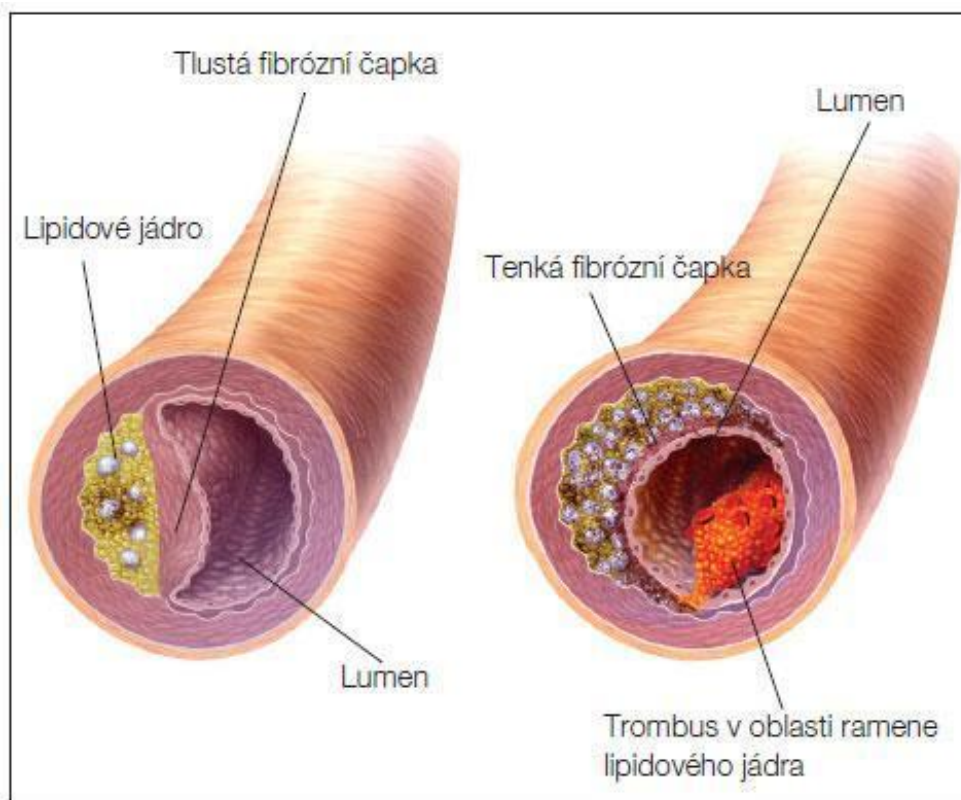
Stabilní pláty jsou charakteristické silnou, málo buněčnou čepičkou. Tyto pláty nejsou náchylné k prasknutí a nehrozí další komplikace. Významně však omezují krevní průtok a jsou podkladem anginy pectoris (14) (22).

- Nestabilní plát

Pro nestabilní pláty je charakteristická tenká čepička prostoupená četnými makrofágy. Tato čepička je vysoce nestabilní a hrozí její ruptura. Na odhalenou ateromovou hmotu nasedají krevní destičky a tvoří trombus. Ten může cévu uzavřít a způsobit ischemické poškození nebo se odtrhnout embolizovat (14) (22).

Obrázek 9: Typy aterosklerotických plátů

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fofolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141> (18. 4. 2013)



4.5 Komplikace aterosklerózy

Ateroskleróza v počátečních stádiích je onemocnění němé, nemocný často ani neví, že jí trpí. Klinické projevy se objevují až v pozdních stádiích. Aterosklerotický plát zužuje cévní průsvit, snižuje se tak prokrvení dané oblasti a může dojít k ischemii. Ta se může projevovat různě, závisle na lokalizaci postižené tepny. Typickými projevy jsou např. ischemická choroba srdeční manifestované převážně jako angina pectoris, ischemická cévní mozková příhoda nebo ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) (23) (14).

Pokud se jedná o nestabilní plát s tenkou čepičkou, může dojít k ruptuře plátu a následnému vzniku trombu. Tenké tepny mohou být tímto trombem úplně uzavřeny. Pokud nedojde k rychlému obnovení průtoku, vzniká ischemická nekróza. V silnějších tepnách nehrozí ucpání, trombus se však může odtrhnout a embolizovat na periferii. V posledních fázích aterosklerózy také dochází ke kalcifikaci ateromového plátu. Céva tak definitivně ztrácí pružnost a možnost regulace vazodilatace či vazokonstrikce. Tyto kalcifikace jsou pozorovatelné na rentgenových snímcích. Stěny velkých tepen postižené aterosklerózou jsou méně odolné tlaku krve a může se na nich vytvořit výduť (aneurysma). Následkem aneurysmatu může dojít k vážnému krvácení do okolní tkáně (14) (23).

5 ENDOTELIÁLNÍ NO SYNTÁZA

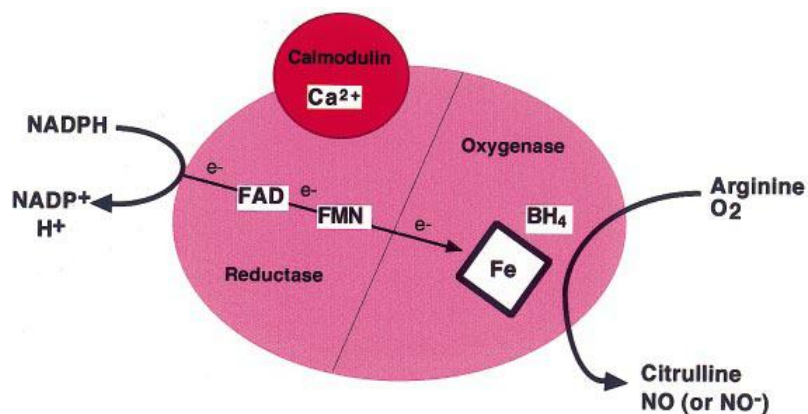
Oxid dusnatý, hlavní vazodilatační faktor, je produkován enzymem NO syntézou (NOS). Tento enzym se vyskytuje ve třech izoformách, které se liší svou aminokyselinovou sekvencí. Izoformy NOS byly pojmenovány podle místa jejich výskytu. Jsou to syntáza z nervových buněk (nNOS), endotelová (eNOS) a induktivní (iNOS). Toto zařazení však není zcela přesné, některé typy NOS se mohou vyskytovat i na jiných místech. Např. v endotelu najdeme kromě eNOS i další typy NOS, nNOS je kromě centrálního a periferního nervového systému hojně zastoupena i v buňkách kosterního svalstva. Kromě lokalizace můžeme NOS rozlišovat na formy indukibilní (hlavně iNOS) a formy konstitutivní. Konstitutivní formy produkují neustále určité bazální množství NO potřebné za fyziologických stavů (24).

5.1 *Struktura eNOS*

Endoteliální NO syntéza je enzym složený ze dvou podjednotek. Jsou to oxygenázová podjednotka, na níž se nachází vazebná místa pro hem, L-arginin a tetrahydrobiopterin (BH_4) propojená s reduktázovou jednotkou obsahující vazebná místa pro nikotinamid adenin dinukleotit fosfát (NADPH), flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD) a komplex Ca^{2+} /kalmodulin (CaM). Aby byl enzym aktivní, dochází ke spojení dvou jednotek eNOS a tvorbě dimeru. Na každé jednotce jsou dva cysteinové zbytky, které tvoří disulfidické můstky mezi monomery a zároveň koordinačně vážou atom zinku. Dochází tak ke stabilizaci struktury dimeru (25).

Obrázek 10: Struktura jednotky eNOS

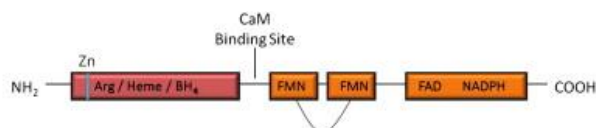
(26) (19. 4. 2013)



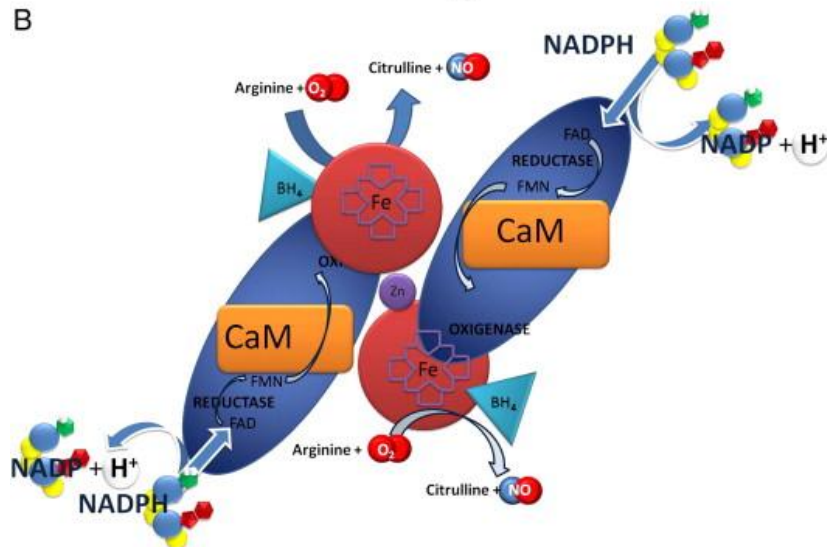
Obrázek 11: Struktura dimeru eNOS

(27)

A



B



5.2 Tvorba NO

NO je syntetizován z aminokyseliny L-argininu. Pro jeho fyziologickou tvorbu je tedy potřeba dostatek substrátu (L-argininu) a současně dalších látek (kofaktorů) potřebných pro správnou funkci enzymu. Při tvorbě NO jsou elektrony uvolněné z NADPH předávány FAD a FMN na reduktázové jednotce a následně jsou

dopravovány k hemovému železu umístěnému na oxidázové jednotce. Hemové železo následně váže O_2 a postupně katalyzuje syntézu NO z L-argininu. Aktivace syntézy NO je zahájena navázáním CaM na své vazebné místo, čímž je umožněn přesun elektronů z reduktázové na oxidázovou jednotku (25).

Za fyziologických podmínek produkuje eNOS hojně NO, vzniká však i nepatrné množství superoxidového aniontu O_2^- a peroxidu vodíku (H_2O_2), obecně nazývaných ROS (reaktivní formy kyslíku). Poměr vznikajících produktů se mění při nedostatku BH_4 . BH_4 je důležitý koenzym, který se váže na oxygenázové jednotky a stabilizuje dimer. Nedostatek BH_4 , vzniklý např. jeho nadměrnou oxidací na BH_2 , tedy vede k rozpojení dimeru na dvě monomerní jednotky. Tyto jednotky nejsou schopny efektivní produkce NO. Přenos elektronů neprobíhá dostatečně rychle a aktivovaný O_2 je tak přeměňován na ROS (27).

5.3 Regulace aktivity eNOS

Jak již bylo zmíněno, aktivita eNOS je podmíněna dostatečným množstvím substrátu a kofaktorů. Kromě toho její aktivitu ovlivňuje i řada dalších faktorů.

- Komplex Ca^{2+} /kalmodulin (CaM) – je nezbytný pro funkci eNOS. Po jeho navázání se zvyšuje přenos elektronů z NADPH na flaviny reduktázové jednotky a také spouští přenos z reduktázové jednotky na hem, umístěný na oxidázové jednotce.
- Fosforylace – jako řada jiných enzymů, i aktivita eNOS je modifikována fosforylací a defosforylací. Zvýšený průtok krve (tzv. „shear stress“) způsobí fosforylací eNOS a následně na Ca^{2+} nezávislé zvýšení aktivity. Je však potřeba dodat, že důležitým faktorem je místo fosforylace. Bylo zjištěno, že fosforylace na serinovém zbytku Ser1179 vede ke zvýšené aktivitě eNOS, naproti tomu fosforylace na serinovém zbytku Ser847 aktivitu eNOS potlačuje.
- Heat-shock protein 90 (Hsp90) – tento molekulární chaperon se podílí na správném prostorovém uspořádání eNOS. Bylo také zjištěno, že je zodpovědný za inzerci hemu do nezralého proteinu. Aktivace histaminem, VEGF, nebo nadměrným prouděním krve prokázala zvýšení interakcí mezi Hsp90 a eNOS a asi trojnásobné zvýšení produkce NO (26) (25) (28).

5.4 eNOS a ateroskleróza

Endotel je neustále zásoben NO produkovaným eNOS, v určitých situacích (např. při zánětu) může být množství NO zvýšeno aktivací indukibilní NOS. Počátečním stadiem aterosklerózy je endoteliální dysfunkce. Vzhledem k tomu, že endoteliální buňky jsou hlavním zdrojem eNOS v cévním systému, ztráta normální funkce endoteliálních buněk vyústí ve zhoršení funkce eNOS a snížení produkce NO (28).

Ve studii provedené na zvířatech krmených vysoko-cholesterolovou dietou bylo prokázáno zhoršení na endotelu závislé relaxace cév. Toto zhoršení přímo koreluje se stadiem aterosklerózy (29). Podávání L-argininu nebo tetrahydrobiopteridinu snížilo progresi aterosklerotických lézí, zatímco podávání inhibitorů eNOS tento protektivní efekt ruší. To ukazuje na přímou souvislost mezi tvorbou NO a progresí aterosklerózy (28).

Nicméně role NO v procesu aterosklerózy může být duální. Vysoké hladiny NO produkované indukibilní NOS v endoteliálních buňkách a makrofázích mohou vést k poškození endotelu. Peroxinitrit (ONOO^-), což je produkt interakce NO se superoxidovým aniontem, byl pozorován ve značném množství aterosklerotických lézí. Peroxinitrit je schopen oxidovat BH_4 , čímž se snižuje jeho množství. Toto množství BH_4 pak není dostatečné pro normální funkci eNOS a vede ke zvýšené produkci ROS na úkor NO (28).

Byly provedeny klinické studie zkoumající vliv perorálně podaného L-argininu na vývoj aterosklerózy. Výsledky studií však přinesly nejednoznačné výsledky. V jedné studii nedošlo k žádným známkám zlepšení mortality (28).

Zdá se, že jistou roli v ovlivnění progresu aterosklerózy by mohl hrát i chaperon Hsp90. Je totiž nezbytný pro správnou konformaci některých prozánětlivých mediátorů. Zejména matrixová metaloproteináza-2, která má významnou roli při tvorbě aterosklerotického plátu, využívá Hsp90 pro dosažení správné konformace a funkce. Také u scavengerového receptoru na makrofázích byla zjištěna souvislost mezi Hsp90 a jeho funkcí. Vzhledem k tomu, že v pozdních stádiích aterosklerózy má NO spíše škodlivou roli, blokování eNOS a iNOS pomocí Hsp90 by se mohlo ukázat jako klinicky významné (28).

6 MYŠÍ MODELY ATEROSKLERÓZY

Na konci 80. let byly provedeny první pokusy o navození aterosklerózy u myši. Pro urychlení rozvoje aterosklerózy byl výzkum soustředěn především na metody genové modifikace (30).

Myši jsou vůči ateroskleróze vysoce rezistentní. Jejich hladina cholesterolu se pohybuje většinou < 2,6 mmol/l. Jejich lipidové spektrum tvoří z větší části antiaterogenní HDL částice, podíl LDL a VLDL je malý (30).

Výjimku tvoří kmen C57BL/6. Myši tohoto kmenu vykazovaly při vysokocholesterolové dietě tvorbu aterosklerotických plátů. Na rozdíl od aterosklerózy v lidském těle se ale tyto léze vyskytovaly jen na omezeném úseku aorty a dále neprogredovaly. K dosažení tvorby plátů bylo také potřeba použití diety s obsahem 10-20 násobného množství cholesterolu oproti běžné lidské stravě. Dieta obsahovala též kyselinu cholovou, která není přirozenou součástí lidské stravy (31).

Skutečnost, že kmen C57BL/6, na rozdíl od jiných, je schopen tvořit aterosklerotické pláty, vedla ke studiu rozdílu v genetické výbavě myších kmenů. Pozornost byla soustředěna na oblast chromozomu 1, kde se nachází gen nazvaný Ath-1, určující hladinu HDL a náchylnost k ateroskleróze a gen Alp-2 kódující strukturu apolipoproteinu A-II (Apo A- II) (32).

Od roku 1992 se využívá především tzv. knockoutová technologie. Tímto způsobem je možno získat myši s deficientním apolipoproteinem E (apoE). ApoE deficientní myši mají prodlouženou clearance lipoproteinů. To znamená, že i při nízko-lipidové dietě dosahují hladiny cholesterolu hodnot 10-16 mmol/l, což je výsledkem akumulace chylomikronů a VLDL. Tvoří se tak léze podobné aterosklerotickým plátům u člověka (30).

Tyto léze se vytváří na bázi aorty, na spodním oblouku hrudní aorty, na větvení karotid, v renálních a kyčelních artériích a na proximální části hlavopažní tepny. Léze se začínají tvořit v 5. - 6. týdnu přichycením monocytů na endotelu a transendoteliální migrací. Kolem 10. týdne se začínají utvářet tukové proužky. Léze obsahující pěnové buňky a svalové buňky pozorujeme kolem 15. týdne. Po 20. týdnu se objevují fibrózní pláty tvořené nekrotickým jádrem, které je kryto fibrózní čepičkou z hladkých svalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myši pláty progredují. V některých případech byla pozorována částečná destrukce buněk medie a vznik aneurysmat, jinde začaly fibrózní pláty kalcifikovat (30).

Při podávání stravy bohaté na cholesterol a tuky dochází k progresi aterogenního procesu. Tento efekt byl prokázán u apoE deficientních myši. Pokud byly tyto myši krmeny stravou západního typu (s obsahem 0.15% cholesterolu a 21% tuku), jejich hladina cholesterolu dosahovala 3-4 násobné hodnoty hladiny cholesterolu u myši krmených nízkocholesterolovou, nízkotučnou dietou a jejich léze se zvětšovaly a progredovaly (30).

Další myší modely aterosklerózy byly vytvořeny zavedením dalších mutací, které také mění lipidový profil. U lidské hyperlipoproteinemie III. typu se vyskytují mutované formy ApoE, které zpomalují clearance chylomikronů a VLDL. Podařilo se dosáhnout dvou typů mutací, ApoE Leiden a ApoE R142C. Při podávání vysokolipidové diety bylo u ApoE Leiden skupiny dosaženo hodnot cholesterolu v rozmezí 41-52 mmol/l a tvorby fibrózních plátů. U skupiny ApoE R142C bylo dosaženo hodnot kolem 9,6 mmol/l a tvorby tukových proužků. Při podávání běžné stravy nebyly pozorované léze ani u jedné skupiny (30).

Jiný výzkum se zaměřil na myši s deficientním LDL receptorem. LDL receptor na povrchu buněk rozpoznává apolipoprotein B (ApoB) na LDL a ApoE na IDL, pevně je na sebe váže a odstraňuje je tak z oběhu. Tato vlastnost u LDL receptor deficientních myši chybí. Při nízkocholesterolové dietě vykazovaly tyto myši zvýšení hladiny cholesterolu oproti normálním hodnotám. Zvýšené byly hlavně frakce LDL a IDL. Při podávání diety s vysokým obsahem cholesterolu a obsahem kyseliny cholové dosahoval jejich cholesterol hladin >39 mmol/l a byly pozorovány masivní léze tvořené tukovými proužky. Při podávání diety západního typu bylo dosaženo hodnot cholesterolu kolem 31 mmol/l a vytvářely se léze převážně tvořené tukovými proužky (30).

Posledním typem jsou myši, u kterých se podařilo dosáhnout exprese lidského genu pro ApoB. Při nízkotučné dietě byla hladina cholesterolu u těchto myši 2,6-5,2 mmol/l a nedocházelo ke tvorbě lézí. Nicméně při přechodu na stravu bohatou na cholesterol a kyselinu cholovou hodnoty vzrostly na 7,8-13 mmol/l a došlo k rozvoji lézí (33).

Myší modely aterosklerózy jsou velmi cenné pro výzkum aterosklerózy *in vivo*. Díky nim můžeme studovat vliv prostředí, nutričních faktorů nebo pohlavních hormonů na aterogenezi. Jsou též dobrým nástrojem pro testování nových léků potenciálně brzdících aterogenezi. Dostupnost velkého množství myši náchylných k ateroskleróze umožní relativně levné preklinické studie nových léčiv (30).

7 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemie je metoda, která kombinuje anatomické, biochemické a imunologické techniky pro detekci určitých tkáňových struktur navázáním specifické protilátky a její následnou vizualizací. Použité protilátky mohou být buď monoklonální nebo polyklonální. Monoklonální protilátky jsou protilátky produkované jedním klonem plazmatických buněk a jsou zcela identické. Vážou se pouze na jeden epitop na antigenu. Polyklonální protilátky reagují s více epitopy na antigenu, reakce tak nemusí být zcela specifická, je však často výraznější než u monoklonálních protilátek. Imunohistochemická detekce může být přímá nebo nepřímá (34).

- Přímá imunohistochemie - tato metoda je založena na reakci antigenu s již značenou primární protilátkou. Reakce je následně detekována elektronovým mikroskopem. Tato metoda je jednoduchá a rychlá, avšak vzhledem k malé citlivosti jen málo používaná (35).
- Nepřímá imunohistochemie – nepřímá metoda zahrnuje použití neznačené primární protilátky, na kterou je následně navázána značená sekundární protilátka. Na jednu molekulu primární protilátky se může vázat i více molekul sekundární protilátky, dochází tak k zesílení signálu. Metoda je tedy citlivější. Sekundární protilátka může být značená fluorescenčním barvivem, tato reakce je pak vyhodnocována fluorescenčním mikroskopem. Další možností je označení enzymem, např. křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou. Po navázání substrátu na enzym se vyvíjí barevná reakce (35).

7.1 Avidin – biotin metoda (ABC)

V naší práci jsme využívali ABC metodu. Tato metoda patří mezi široce používané imunohistochemické techniky. Je založena na využití vysoké afinity avidinu k biotinu. V prvním kroku dojde k navázání neznačené primární protilátky. Následně se aplikuje sekundární protilátka, na kterou je navázán biotin. Následuje aplikace

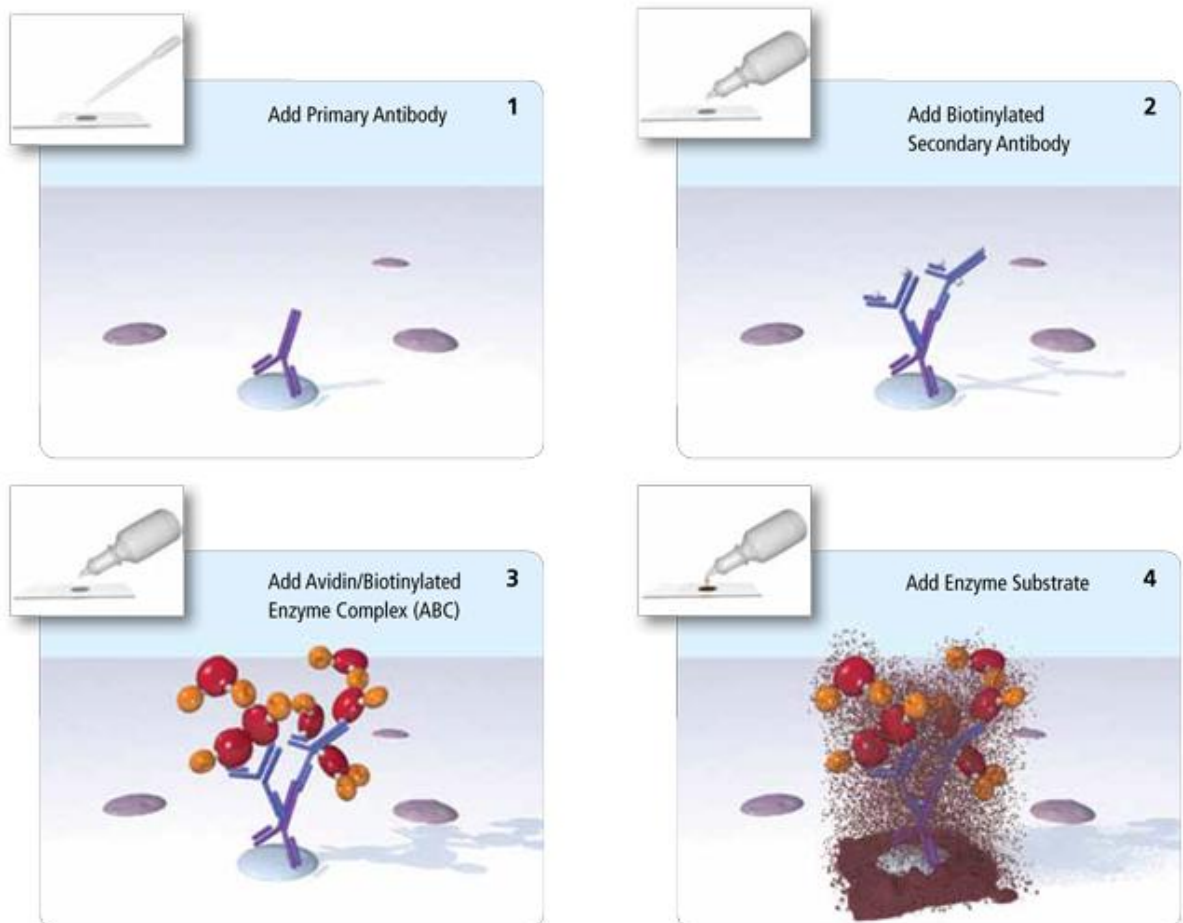
komplexu avidin-biotin-enzym. Velmi často používaným enzymem je křenová peroxidáza. Po navázání substrátu diaminobenzidinu (DAB) dochází k barevné reakci. Avidin je schopen na sebe navázat až 4 molekuly biotinu. Tím dochází k mnohonásobnému zesílení signálu a snadné detekci i malého množství pozorované struktury (35).

Obrázek 12: Schéma použití ABC metody

http://www.vectorlabs.com/data/descriptions/images/descr_8608_ABCuse.jpg

(20. 4. 2013)

Using the ABC System:



8 CÍL PRÁCE – ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo popsat a kvantifikovat expresi endoteliální NO syntázy v arteria brachiocephalica u apoE/LDL-receptor deficientních myší po podávání diety s vysokým obsahem proteinů a nízkým obsahem cukrů. K detekci exprese byly použity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci metody stereologické.

9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

9.1 Použitá zvířata

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

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

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

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

Tabulka 5: Složení použité stravy (%)

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

9.2 Použité protilátky

Pro detekci eNOS byla použita primární protilátka eNOS rabbit anti-mouse (Pharmingen) ředěná v poměru 1:100 v BSA (hovězí sérový albumin). Jako sekundární protilátka byla použita goat anti-rabbit Ig (Vector laboratoriem, USA) ředěná v poměru 1:400 v BSA + 8 µl 2% mouse serum.

9.3 Příprava roztoků

- PBS (Phosphate Buffered Saline - pufrovaný fyziologický roztok)
80,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 2,0 g KH₂PO₄, aqua bidestilata do 1 litru. Tento koncentrovaný roztok se před použitím ještě 10x zředil
- Mléko
0,5 g sušeného kozího mléka se rozpustilo v 10 g PBS
- Peroxid vodíku
8 ml H₂O₂ jsme smísili se 70 ml PBS

9.4 Pracovní postup

Podložní sklíčka s řezy myších cév jsme vložili na 30 minut do acetonu při teplotě -20°C pro zafixování tkáně. Po 20 minutovém oschnutí při laboratorní teplotě následoval 5 minutový oplach v PBS.

Řezy jsme nejprve inkubovali 30 minut s 50 µl kozího mléka pro zablokování nespecifických vazebných míst, následoval oplach v PBS. Dále byla provedena 15 minutová inkubace s 40 µl anti-avidinu pro zablokování reakcí na přirozeně se vyskytujícím avidinu, následovaná oplachem v PBS (2x5 minut). Následně jsme inkubovali 15 minut s anti-biotinem pro zablokování reakce na biotinu a opláchli v PBS.

V dalším kroku jsme přidali 50µl primární protilátky a nechali hodinu inkubovat. Po oplachu v PBS (2x5 minut) jsme opět provedli 30 minutovou inkubaci s 50 µl mléka,

následovanou oplachem v PBS. Dále jsme přidali 50 µl sekundární protilátky a inkubovali 30 minut. Po 5 minutovém oplachu v PBS jsme sklíčka umístili na 15 minut do 3 % roztoku peroxidu vodíku pro zablokování přirozeně se vyskytující peroxidázy a následně opět oplachovali v PBS (2x5 minut). Poté jsme 30 minut inkubovali s 50 µl enzymu peroxidázy, následoval oplach v PBS (2x5 minut). Následovala 30 sekundová inkubace se substrátem enzymu DAB a přenesení do PBS.

V další části experimentu jsme sklíčka opláchli v destilované vodě, ponořili na 5 sekund do barviva hematoxylinu a poté nechali minutu pod tekoucí vodou. Řezy jsme následně opláchli v acetonu a pro odvodnění jsme je ponořili na 3 minuty do aceton-xylenu (10:1), aceton-xylenu (1:10) a na 3x2 minuty do xylenu. Provedli jsme závěrečnou fixaci Eukitem a překryli řezy krycími sklíčky.

9.5 Kvantitativní analýza imunohistochemie - stereologická analýza

Kvantifikace plochy velikosti endoteliální exprese eNOS byla provedena prostřednictvím stereologických metod. Po nakrájení série o 100 řezech síly 7 µm se z referenčního objemu řezy systematicky náhodně vybraly. Pro každé barvení se první řez vybral náhodně, potom byl vybrán každý dvanáctý řez. Tím pádem osm barvených řezů se použilo ke stereologickému hodnocení. Použila se metoda bodové testovací mřížky, ta se volila tak, aby bylo napočítáno přes 100 průsečíků mezi body sítě a endoglinu barvením na endotelu na jednu z cév. Odhadovaná barvená plocha se vypočítala dle vzorce:

$$estA = a * P,$$

kde a je plocha odpovídající 1 testovacímu bodu, P znamená počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení (36).

9.6 *Statistická analýza*

Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro osm myší v každé skupině. Statistická významnost rozdílů ve skupinách se hodnotila t-testem za použití softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., Kalifornie). *P* hodnoty 0, 05 nebo menší byly považovány za statisticky významné.

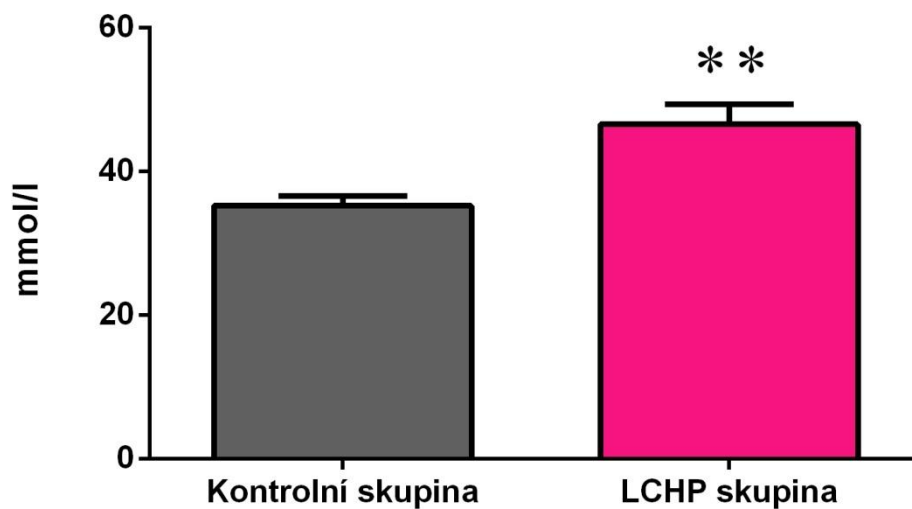
10 VÝSLEDKY

10.1 Biochemická analýza

U všech myší v tomto experimentu byla stanovena hladina cholesterolu. Biochemická analýza odhalila významné zvýšení hladin cholesterolu ve skupině myší krměných LCHP dietou oproti kontrolní skupině. ($35,23 \pm 1,37$ mmol/l vs. $46,61 \pm 2,79$ mmol/l, $p=0,0154$) (viz Graf 1)

Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší

8 týdenní podávání LCHP diety vedlo k signifikantnímu zvýšení hladiny cholesterolu oproti kontrolní skupině ($p=0,0154$)



10.2 Imunohistochemická analýza

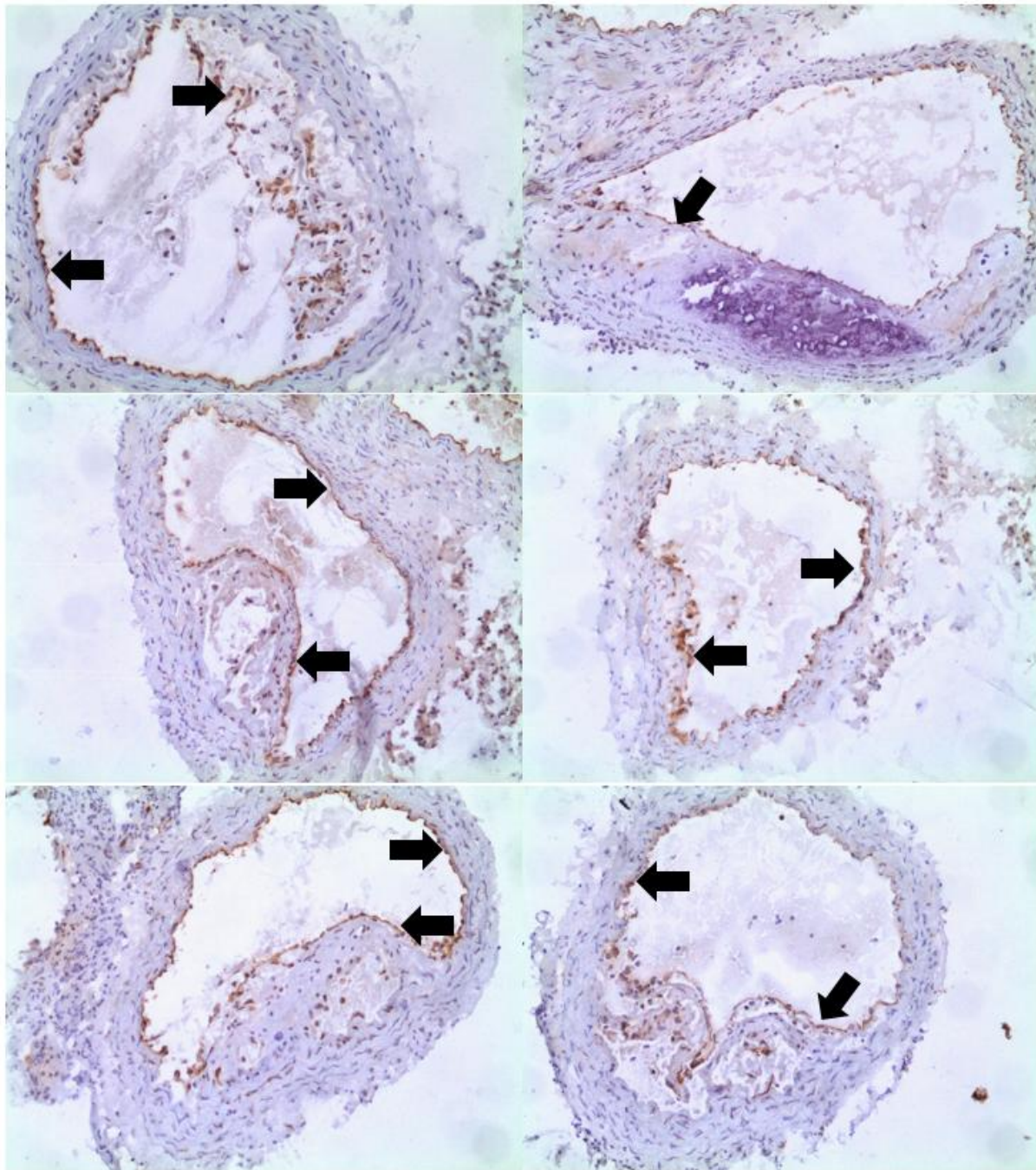
10.2.1 Imunohistochemické barvení eNOS v arteria brachiocephalica

Imunohistochemická detekce endoteliální exprese NO syntázy byla provedena na 96 sklíčkách s řezy z obou skupin myší. U obou skupin myší v experimentu byly pozorovány u každé myší aterosklerotické pláty. Exprese eNOS byla detekována pouze na cévním endotelu zejména na povrchu aterosklerotických plátů. Dále byla exprese detekována i na intaktním endotelu mimo pláty. Z hlediska vizuálního pohledu jsme nepozorovali žádné výrazné změny z hlediska intenzity barvení mezi oběma studovanými skupinami (obr 13, 14).

Všech 96 řezů bylo použito pro stereologickou analýzu.

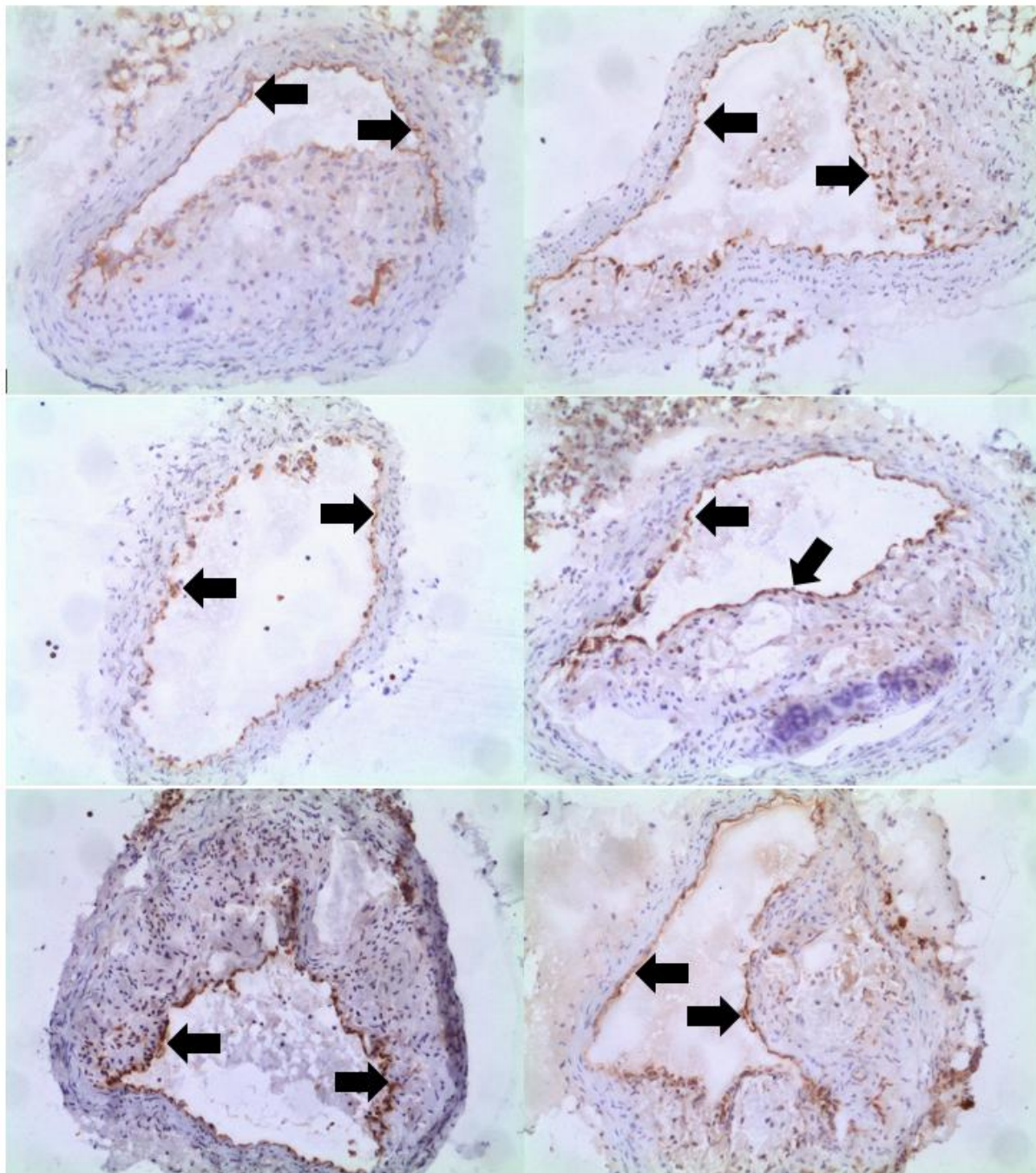
Obrázek 13: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení eNOS u kontrolní skupiny zvířat.

Expres eNOS se nachází na cévním endotelu plátu (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.



Obrázek 14: Obrázky imunohistochemického barvení eNOS u LCHP skupiny zvířat

Expres eNOS se nachází na cévním endotelu plátu (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

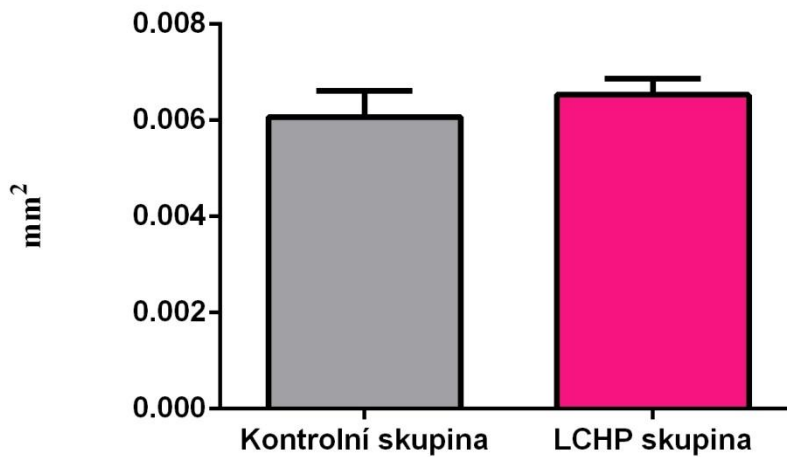


10.3 Stereologická analýza endoteliální exprese eNOS v arteria brachiocephalica

Stereologická analýza neprokázala statisticky významné rozdíly v endoteliální expresi eNOS u myši, kterým byla podávána LCHP dieta, ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,00607 \pm 0,00054 \text{ mm}^2$ vs $0,00653 \pm 0,00034 \text{ mm}^2$, $p= 0,3543$) (viz Graf 2).

Graf 2: Stereologická analýza exprese eNOS v arteria brachiocephalica

Podávání LCHP diety nevedlo k signifikantní změně endoteliální exprese eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou ($p= 0,3543$).



11 DISKUZE

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění charakterizované rozvojem endoteliální dysfunkce. Jedním ze znaků endoteliální dysfunkce je zhoršení produkce NO (37) (28). Oxid dusnatý (NO), produkovaný endoteliální NO syntázou (eNOS) je molekula působící antihypertenzivně, antitromboticky a antiaregogenně. Navíc NO produkovaný endoteliální NO syntázou vykazuje četné vlastnosti bránící rozvoji aterosklerózy. Hypercholesterolémie vede ke snížení dostupnosti NO v cévách. To je přičítáno dysfunkci eNOS a její snížené aktivitě (38).

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit expresi eNOS v arteria brachiocephalica po podávání vysokoproteinové diety s nízkým obsahem cukru (LCHP), u které se předpokládá vyšší aterogenní a prozánětlivý potenciál ve srovnání s běžnou dietou západního typu (39).

Práce je považována za pilotní studii, neboť dosud nebyly provedeny žádné studie zabývající se vlivem LCHP diety na expresi eNOS. Na začátku studie tedy nebyl znám přesný experimentální design studie, podle které by se experimentální design dal přesněji nastavit.

Byly použity apoE/LDLR-deficientní myši, které představují velmi vhodný zvířecí model pro studium aterosklerózy (40). LDL receptor vychytává LDL částice a lipoproteinové zbytky obsahující apoE, pravděpodobně se tak podílí i na regulaci produkce lipoproteinů játry (41). ApoE je strukturální částice nacházející se na všech lipoproteinech kromě LDL a vykazuje vysokou afinitu k receptorům pro apoB a remnanty. To umožňuje játrům specifické vychytávání lipoproteinů obsahující apoE. Kromě toho se apoE podílí na zvyšování jaterní sekrece VLDL. Oba tyto proteiny tedy hrají zásadní roli v produkci a odstraňování lipoproteinů (42).

Podávání LCHP diety významně zvýšilo hladiny cholesterolu u myši sledovaných v této práci. Jak již bylo zmíněno, bylo prokázáno, že hypercholesterolémie je zodpovědná za snížení exprese eNOS. Nicméně dosud nebyla provedena žádná studie sledující expresi eNOS v arteria brachiocephalica. Arteria brachiocephalica se zdá být velice důležitá s ohledem na morfologii plátu. Navzdory faktu, že doporučeným místem studia aterosklerózy u myši je aortický sinus, v arteria brachiocephalica byly pozorovány pokročilé léze a ruptury plátů, které mohou být blíže studovány (43). Pro kvantifikaci eNOS byly použity imunohistochemické a stereologické metody.

Imunohistochemická analýza prokázala expresi eNOS na endotelu pokrývajícím aterosklerotický plát a současně i na intaktním endotelu, což odpovídá výsledkům prezentovaným v předchozích studiích (44) (45). Stereologická kvantifikace neprokázala významné zvýšení exprese eNOS po podávání LCHP diety. Jako možné vysvětlení se nabízí fakt, že rozsáhlé aterosklerotické léze byly pozorovány v obou skupinách. To by mohlo znamenat, že exprese eNOS byla snižena i u myši v kontrolní skupině a nebyla tedy významně ovlivněna LCHP dietou.

Nicméně tato pilotní studie ukázala, že LCHP strava zvyšuje hladiny cholesterolu. Tato diplomová práce prokázala, že imunohistochemie je vhodnou metodou pro kvantifikaci exprese eNOS v arteria brachiocephalica a bude použita v dalších studiích soustředěných na objasnění mechanismu, kterým LCHP dieta přispívá k rozvoji aterosklerózy.

12 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nastavit metodu vhodnou pro detekci eNOS v arteria brachiocephalica myši krmených buď standardní nebo vysokoproteinovou dietou s nízkým obsahem cukru (LCHP).

Hladina cholesterolu u myši krmených LHCP dietou byla signifikantně zvýšena oproti kontrolní skupině.

Imunohistochemickým barvením byla potvrzena exprese eNOS v endoteliálních buňkách u všech myši.

Stereologická analýza neprokázala významné změny v expresi eNOS u myši krmených LCHP dietou oproti kontrolní skupině.

Výsledky práce ukázaly, že imunohistochemie je vhodná metoda pro kvantifikaci exprese eNOS v arteria brachiocephalica. Tato metoda bude v budoucnu využita pro další studie zaměřené na objasnění mechanismu, kterým LCHP dieta přispívá k rozvoji aterosklerózy.

13 Seznam obrázků

Obrázek 1: Stavba cévní stěny.....	9
Obrázek 2: Mikroskopický preparát cévní stěny	10
Obrázek 3: Porovnání cévní stěny arterie a vény	13
Obrázek 4: Endotel na povrchu cévní stěny	14
Obrázek 5: Příčiny a projevy endoteliální dysfunkce.....	17
Obrázek 6: Patogeneze aterosklerózy	29
Obrázek 7: Progrese aterosklerózy v čase	31
Obrázek 8: Progrese aterosklerózy	32
Obrázek 9: Typy aterosklerotických plátů.....	33
Obrázek 10: Struktura jednotky eNOS	36
Obrázek 11: Struktura dimeru eNOS.....	36
Obrázek 12: Schéma použití ABC metody.....	42
Obrázek 13: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení eNOS u kontrolní skupiny zvířat.....	50
Obrázek 14: Obrázky imunohistochemického barvení eNOS u LCHP skupiny zvířat ..	51

14 Seznam tabulek

Tabulka 1: Příčiny úmrtí v České republice v r. 2000 (%) (Vlček J., 2010)	22
Tabulka 2: Definice metabolického syndromu (Vlček J., 2010) (17. 4. 2013)	23
Tabulka 3: Tabulka kardiovaskulárního rizika	24
Tabulka 4: Přehled LP	27
Tabulka 5: Složení použité stravy (%).....	44

15 Seznam grafů

Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myši.....	48
Graf 2: Stereologická analýza exprese eNOS v arteria brachiocephalica.....	52

16 Použitá literatura

1. **Paulsen, D.F.** *Histologie a buněčná biologie*. Jinočany : nakladatelství H & H, 2004. stránky 156-162. ISBN: 80-7319-024-9.
2. **Vajner, L., Uhlík, J., Novotný, T., Konrádová, V.** *Lékařská histologie II. Mikroskopická anatomie*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2012. stránky 6-12. ISBN:978-70-246-2165-4.
3. [Online] [Citace: 15. 4 2013.] <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/obeh-ho.pdf>.
4. **Karásek, D., Veverková, H., Halenka, M., Hutýra, M.** Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*. Zář 2004, stránky 450-453.
5. [Online] [Citace: 15. 4 2013.] http://www.lfhk.cuni.cz/patfyz/Intranet/Aterosklerosa_text/sld001.htm.
6. **Blann, A.E., Taberner, D.A.** A reliable marker of endothelial cell dysfunction: Does it exist? *British Journal of Haematology*. June 1995, stránky 244-248.
7. **Bultas, J., Cífková, R., Češka, R., Horký, K., Hradec, J.** *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční*. Praha : nakladatelství Galén, 1999. stránky 11-41. ISBN: 80-7262-026-6.
8. **Vojáček, J., Malý, M., et.al.** *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. Praha : Grada Publishing a.s., 2004. stránky 21-43. ISBN: 80-247-0501-X.
9. **Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., Strijdom, H.** Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular journal of Africa*. May 2012, stránky 222-231.
10. **Andor, M.** The Role of Inflammation in Endothelial Dysfunction and Progression of Atherosclerosis in Metabolic Syndrome. *Timisoara medical journal*. December 2005, stránky 330-334.
11. **Martínková, J.** *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha : Grada Publishing, 2007. stránky 213-216. ISBN: 978-80-247-1356-4.
12. **Mačák J., Mačáková, J.** *Patologie*. Praha : Grada Publishing, 2004. str. 171. ISBN: 80-247-0785-3.
13. **Gašpar, L., Makovník, M., Hlinšťáková, S. et al.** Médiokalcinóza – marker zvýšeného kardiovaskulárního rizika. *Vaskulárna medicína*, 3. 2011, stránky 29-31.

14. **Vlček, J., Fialová, D. et al.** *Klinická farmacie I.* Praha : Grada Publishing, 2010. stránky 108-131. ISBN: 978-80-247-3169-8.
15. **Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Mithcell, R.N.** *Robbins basic pathology.* Philadelphia : Saunders, 2007. stránky 343-353. ISBN: 978-1-4160-2973-1.
16. [Online] [Citace: 17. 4 2013.] <http://www.athero.cz/cze/odkazy-a-zdroje/vypocet-rizika.php?page=tabulky-rizika-podle-projektu-SCORE>.
17. [Online] [Citace: 17. 4 2013.]
<http://themedicalbiochemistrypage.org/lipoproteins.php#top>.
18. **Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M.** Atherosclerosis: Basic mechanisms. *Circulation.* June 2005, stránky 2488-2496.
19. **George, S. J., Johnson, J.** *Atherosclerosis: molecular and cellular mechanism.* - : WILEY- VCH Verlag GmbH & Co., 2010. stránky 3-46. ISBN: 978-3-527-32448-4.
20. **Ferrières, J.** Effects on Coronary Atherosclerosis by Targeting Low-density Lipoprotein Cholesterol with Statins. *American journal of cardiovascular drugs.* March 2009, stránky 109-115.
21. **Kukačka, J., Zikmundová, K., Kotaška, K. et al.** PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dyslipoproteinémií. *Klinická biochemie a metabolismus.* Červen 2007, stránky 85-88.
22. **Šafránková, A., Nejedlá, M.** *Interní ošetřovatelství I.* místo neznámé : Grada Publishing, 2006. stránky 126-133. ISBN: 978-80-247-1148-5.
23. **Silbernagl, S., Lang, F.** *Atlas patofyziologie člověka.* 2001. stránky 236-239. ISBN: 80-7169-968-3.
24. **Geller, D.A., Billiar, T. R.** Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews.* March 1998, stránky 7-23.
25. **Fleming, I.** Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Cardiovascular physiology.* December 2009, stránky 793-806.
26. **Alderton, W. K., Cooper, Ch. E., Knowles, R G.** Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochemical Journal.* August 2001, stránky 593-615.
27. **Gielis, J.F., Lin, J.Y., Wingler, K., Van Schil, P.E.Y., Schmidt, H.H., Moens, A.L.** Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine.* April 2011, stránky 765–776.
28. **Chatterjee, A., Catravas, J. D.** Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology.* June 2008, stránky 134-140.

29. **Kojda, G., Hüsgen, B., Hacker, A., et al.** Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in experimental atherosclerosis is dependent on gender. *Cardiovascular Research*. September 1998, stránky 738–747.
30. **Breslow, J.L.** Mouse models of atherosclerosis. *Science*. May 1996, stránky 685-688.
31. **Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C. et al.** Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. October 1985, stránky 65-73.
32. **Paigen, B., Mitchell, D., Reue, K. et al.** Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *PNAS*. June 1987, stránky 3763–3767.
33. **Callow, M.J., Verstuyft, J., Tangirala, R. et al.** Atherogenesis in transgenic mice with human apolipoprotein B and lipoprotein (a). *The Journal of Clinical Investigation*. September 1995, stránky 1639–1646.
34. [Online] [Citace: 20. 4 2013.]
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F95B91A9-3DC1-4B56-8E8D-59CA044A8BA7>.
35. [Online] [Citace: 20. 4 2014.] http://www.ihcworld.com/_intro/ihc-methods.htm.
36. **Nachtigal, P., Semecky, V., Kopecky et al .** Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathology - Research and Practice*. June 2004, stránky 219-229.
37. **Nigashi, Y., Noma, K., Yozhizumi, M., Kihara, Y.** Endothelial Function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation Journal*. March 2009, stránky 411-418.
38. **Davignon, J., Ganz, P.** Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. June 2004, stránky 27-32.
39. **Kostogryz, R. B., Franczyk-Zarow, M., Maslak, E., et al.** Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR(-/-)). *Atherosclerosis*. August 2012, stránky 327-31.
40. **Coleman, R., Hayek, T., Keidar, S., Aviram, M.** A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic

arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. *Acta Histochemica*. December 2006, stránky 415-424.

41. **Jawien, J., Gajda, M., Mateuszuk, L., et al.** Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*. September 2005, stránky 483-489.

42. **Olszanecki, R., Jawien, J., Gajda, M., et al.** Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*. December 2005, stránky 627-635.

43. **Bond, A. R., Jackson, C. L.** The fat-fed apolipoprotein E knockout mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011, 379069

44. **Nachtigal, P., Vecerova, L., Pospisilova, N., et al.** Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histology and Histopathology*. December 2009, stránky 1499-1506.

45. **Sessa, W. C.** eNOS at a glance. *Journal of Cell Science*. May 2004, stránky 2427-2429.