

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



**Vliv kyseliny nikotinové na expresi endoglinu v aterosklerotických
plátech arteria brachiocephalica**

**The effect of nicotinic acid on the expression of endoglin in
atherosclerotic lesions brachiocephalic artery**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2013

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Pavlína Skýpalová

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

Datum:

Podpis:

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

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Vliv kyseliny nikotinové na expresi endoglinu v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica

Diplomová práce

Pavλίna Skýpalová

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

Cíl práce: Záměrem této práce bylo nastavit metodiku na detekci exprese endoglinu v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica. Dále jsme chtěli zhodnotit potencionální změny v expresi endoglinu po léčbě kyselinou nikotinovou.

Metody: Pro tuto studii byl použit kmen apoE/LDL-receptor deficientních myší s předem stanovenou aterosklerózou. Ve věku 16-18 týdnů byly myši rozděleny podle váhy do dvou skupin po šesti a po dobu osmi týdnů byly krmeny upravenou AIN-93G-based dietou s nízkým obsahem sacharidů a vysokým množstvím proteinů. Druhé skupině myší byla k této dietě po čtyři týdny přidávána kyselina nikotinová s obsahem 1%. Pro zjištění hladin celkového cholesterolu byla provedena biochemická analýza krve. Detekce a kvantifikace exprese endoglinu byla realizována pomocí imunohistochemických a stereologických metod.

Výsledky: Podávání kyseliny nikotinové neovlivnilo hladiny celkového cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou. Expese endoglinu byla detekována u obou skupin myší pouze na cévním endotelu, zejména na endotelu aterosklerotických plátů. Imunohistochemické a stereologické analýzy prokázaly, že léčba kyselinou nikotinovou nemá vliv na expresi endoglinu.

Závěr: Výsledky prezentované v této diplomové práci dokládají, že kyselina nikotinová v použitém designu experimentu aterosklerotický proces neovlivňuje. V budoucnu bude nutné design experimentu změnit a postupy zopakovat, aby se zjistilo, zda toto léčivo působí na zánětlivý stav a progresi lézí u tohoto experimentálního modelu.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

The effect of nicotinic acid on the expression of endoglin in atherosclerotic lesions
brachiocephalic artery

Diploma thesis

Pavλίna Skýpalová

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

Background: The aim of this study was to set methods for the detection of endoglin in atherosclerotic lesions brachiocephalic artery. In addition we wanted to evaluate possible effect of nicotinic acid treatment on endoglin expression.

Methods: In this study were used ApoE/LDLR double knockout mice with pre-established atherosclerosis. At the age of 16-18 weeks mice were weight-matched between two groups with six members and fed modified AIN-93G-based diets with low carbohydrate and high protein for eight weeks. The second group was fed the same diet with added 1% of nicotinic acid for four weeks. Biochemical analysis of blood samples was performed to identify cholesterol levels. Detection and quantification of endoglin expression was realized by immunohistochemical and stereological methods.

Results: Nicotinic acid did not affect cholesterol levels when compared with control mice. The expression of endoglin was detected only vascular endothelium predominantly covering atherosclerotic lesions in both groups. Immunohistochemical and stereological analysis revealed no effect of nicotinic acid treatment on endoglin expression.

Conclusions: The results presented here in this diploma thesis showed no effect of nicotinic acid on the process of atherosclerosis in this experimental design suggesting that change of experimental design seems to be necessary to see whether this drug can affect inflammation and lesion progression in this experimental model.

Obsah

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Mikroskopická anatomie cév	9
2.1.1 Obecná stavba cév	9
2.1.2 Krevní cévy	11
2.2 Endotel	13
2.2.1 Funkce endotelových buněk	13
2.2.2 Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce	15
2.3 Ateroskleróza	16
2.3.1 Epidemiologie	16
2.3.2 Rizikové faktory	17
2.3.3 Patogeneze	19
2.3.4 Predilekční místa pro rozvoj aterosklerotických lézí	23
2.3.5 Patologie aterosklerotických lézí	23
2.3.6 Typy aterosklerotických plátů	24
2.4 Endoglin	25
2.4.1 Struktura endoglinu	25
2.4.2 Exprese endoglinu	26
2.4.3 Exprese endoglinu u myších modelů aterosklerózy	26
2.4.4 Vliv endoglinu na endoteliální NO syntázu	27
2.4.5 Vztah endoglinu k ateroskleróze	27
2.5 Myší modely aterosklerózy	28
2.5.1 Model C57BL/6	28
2.5.2 Model s deficitem apolipoproteinu E	29
2.5.3 Model s deficitem LDL receptoru	29

2.5.4 Využití myších modelů	30
2.6 Kyselina nikotinová	31
2.6.1 Mechanismus účinku	31
2.6.2 Fixní kombinace ER niacin/laropiprant	32
2.7 Imunohistochemie	33
2.7.1 Avidin-biotin metoda (ABC)	33
3 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE	35
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu	36
4.1.1 Zvířata a jejich chov	36
4.1.2 Potrava a krmení	36
4.2 Imunohistochemie	36
4.2.1 Použité protilátky	37
4.2.2 Příprava roztoků a činidel	37
4.2.3 Postup	37
4.3 Stereologická analýza	38
4.4 Statistická analýza	39
5 VÝSLEDKY	40
5.1 Biochemická analýza	40
5.2 Imunohistochemická analýza	40
5.3 Stereologická analýza endoteliální exprese endoglinu v arteria brachiocephalica	43
6 DISKUSE	44
7 ZÁVĚR	46
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47

1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí ve většině vyspělých států. Intenzivní výzkumy neustále přináší nové možnosti nejúčinnější léčby a diagnostiky. Velmi důležitá je prevence, protože zdravým životním stylem lze těmto onemocněním do jisté míry předejít, nebo je alespoň věkově oddálit.

Jednou z mnoha vědeckých skupin, zabývajících se výzkumem kardiovaskulárních onemocnění, je tým Katedry biologických a lékařských věd, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Petra Nachtigala, Ph.D. Tato skupina se zaměřuje zejména na studium aterosklerózy *in vivo* a *in vitro*. Významnou oblastí výzkumu je endoglin (CD 105) a jeho vztah k aterogenezi u myších modelů aterosklerózy. Výsledky naznačují, že by účinky endoglinu a s ním souvisejících signalizačních cest mohly být při aterogenezi protektivní.

V této diplomové práci jsme se zabývali potencionálními změnami v expresi endoglinu po podávání kyseliny nikotinové v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica. Pro tento experiment jsme použili apoE/LDL-receptor deficientní myši krmené specifickou dietou s nízkým obsahem sacharidů a vysokým množstvím proteinů, dále pak imunohistochemické a stereologické metody.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroskopická anatomie cév

Cévní řečiště tvoří tepny – artérie, které postupně přechází v drobné arterioly pokračující ve vlasečnice – kapiláry. Ty se sbírají do nejužších žil – venul, které se rozvětvují ve větší žíly – vény. Stěna cév se liší svou stavbou podle funkčních nároků jednotlivých úseků krevního řečiště [1].

2.1.1 Obecná stavba cév

Cévní stěnu obvykle tvoří tři základní koncentrické vrstvy, které se nazývají tunica intima, tunica media a tunica adventitia [2].

Tunica intima

Tunica intima je vnitřní vrstvou cévní stěny, která lemuje lumen. Intimy artérií a vén se svou strukturou nijak zvlášť neodlišují. Skládají se z vrstvy endotelových buněk a subendotelové vazivové tkáně [2].

Endotelové buňky jsou tvořeny jednovrstevným dlaždicovým epitelem [2]. Jsou polygonální, ploché, většinou protažené ve směru toku krve a leží na bazální lamině. V každé buňce je přítomno ploché jádro uložené v centrální oblasti. Buňky jsou spojeny prostřednictvím nejtěsnějších spojení - zonulae occludentes. Endotelové buňky jsou elementy s dlouhou délkou života a nízkou mitotickou aktivitou. Subendotelovou vrstvu tvoří řídké kolagenní vazivo a buňky hladké svaloviny [3].

Tunica media

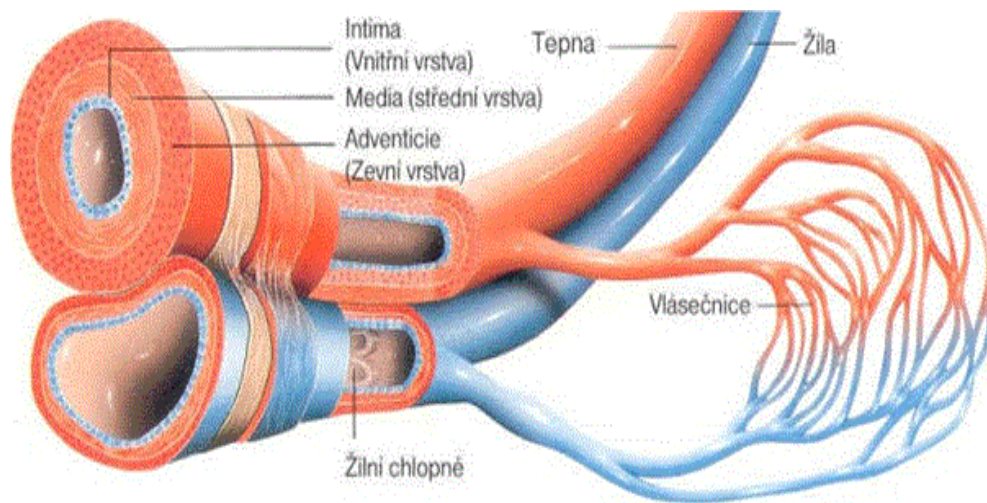
Skládá se převážně z cirkulárně uspořádaných vláken hladké svaloviny [2], ale také se zde nachází elastická a retikulární vlákna. Mezibuněčnou hmotu tvoří zejména chondroitinsulfát a proteoglykany [3]. Médie artérií je mohutnější než vén [2].

Tunica adventitia

Je vnější vrstva, ve které převažují vlákna složená z kolagenu typu I a elastická vlákna. Ve všech velkých cévách obsahuje adventicie také vasa vasorum, což jsou malé krevní cévy dodávající kyslík a živiny buňkám cévní stěny, které nemohou být vyživovány difuzí, protože jsou hodně vzdáleny od lumina [2].

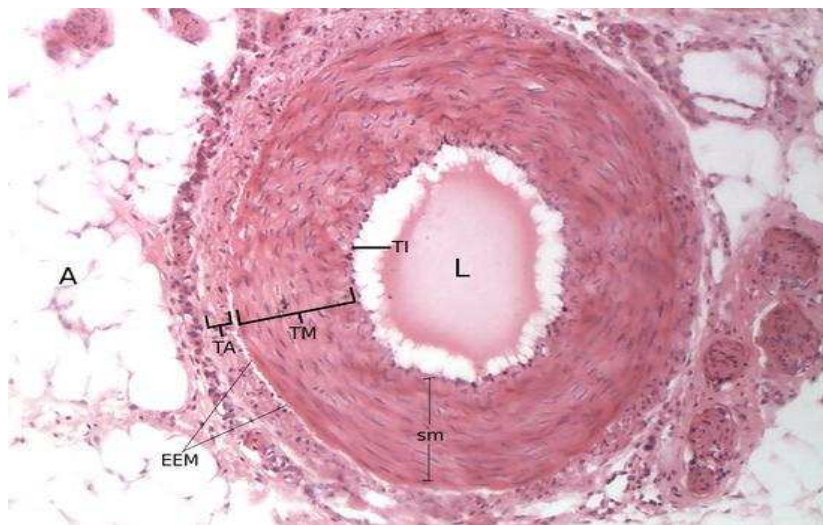
Obrázek 1: Stavba cév [2013-02-06].

<http://didsom.webnode.cz/obehova-soustava>



Obrázek 2: Mikroskopický preparát svalové artérie, zvětšení 100x [2013-02-28].

<http://bcrc.bio.umass.edu/bestofhistology/content/muscular-artery-100x>



Poznámka: L - lumen, A – tuková tkáň, TI – tunica intima, TM – tunica media, TA - tunica adventitia, EEM – membrana elastica externa, sm – hladká svalovina.

2.1.2 Krevní cévy

Artérie

Artérie mají tlustší cévní stěnu než vény a užší lumen [2]. V některých artériích se mohou elastické struktury koncentrovat na hranicích tunica media a vytvářet tak membrana elastica interna a membrana elastica externa, které médii oddělují od intimy a adventicie [3]. Podle průměru lze artérie dělit na několik druhů:

- Artérie velkého kalibru jsou typu elastického a zahrnují aortu, její velké větve a truncus pulmonalis. Tyto artérie mají v nativním stavu na průřezu nažloutlou barvu, která je zapříčiněná vysokým množstvím elastinu. Tunica intima je tlustší oproti artériím typu svalového. Tunica media obsahuje mnoho koncentricky uspořádaných elastických blanek - membranae fenestratae, ve kterých jsou otvory umožňující průnik živin do hlubších partií cévní stěny [3]. Membrana elastica interna, externa jsou přítomné, ale bývají těžko rozeznatelné kvůli velkému obsahu elastinu. Tunica adventitia je poměrně tenká vzhledem k průměru cévy a svou strukturou se od obecné stavby nijak zvlášť neliší [2].

- Artérie středního a malého kalibru jsou nejčastěji artériemi svalového typu [3]. Typické jsou pro artérie břišní dutiny a končetin, například arteria brachialis [2]. Nejvýrazněji se odlišují médií, která je silná a může obsahovat až 40 vrstev hladkých svalových buněk. Buňky hladké svaloviny jsou organizovány do svazků tvořících šroubovici o nízkém závitu. Membrana elastica interna je velmi nápadná. Ve větších artériích tohoto typu je dobře vyvinuta rovněž membrana elastica externa [3].

- Arterioly jsou malé cévy s velmi tenkou stěnou [2]. Tunica media se skládá pouze z jedné až pěti vrstev hladké svaloviny. Membrana elastica interna se vyskytuje jen ve větších arteriolách. Membrana elastica externa rozvinuta není [3].

Vény

Vény mají na rozdíl od artérií vždy tenčí stěnu. Nejsilnější vrstvou stěny vén je tunica adventitia, ale u artérií tunica media [3]. Ve vénách jsou vyvinuty chlopně, které zajišťují návrat krve k srdci a také pomáhají předcházet městnání krve. Chlopně jsou výběžky intimy do lumina, jež tvoří centrálně uložená fibroelastická vazivová tkáň, která je kryta endotelem z obou stran [2]. Vény lze, podobně jako artérie, rozdělit na několik typů podle jejich průměru:

- Velkými vénami jsou například vena cava superior a vena cava inferior [2]. Médie je docela tenká, tvoří ji jen pár vrstev hladkých svalových buněk. Někdy se tu nachází spíše elementy vazivové tkáně, protože svalovina může být poměrně redukována [3]. Adventicie obsahuje kolagen a také svazky longitudinálně uspořádaných buněk hladké svaloviny, které stěnu vén zpevňují a brání její distenzi [2].
- Malé a střední cévy, například vena portae, se vyznačují rovněž tenkou médií. Na rozdíl od velkých vén obsahuje adventicie převážně kolagen. Svalovina bývá přítomna v malém množství, nebo se nevyskytuje žádná [2].
- Venuly jsou velice tenké. Nejmenší venuly se nazývají postkapilární a mají endotelovou výstelku obalenou kontinuální vrstvou pericytů [3].

Kapiláry

Jedná se o nejmenší cévy, jejichž průměr je 7-9 μm a délka většinou kolísá mezi 0,25 a 1 mm. Stěny kapilár jsou tvořeny vrstvou endotelových buněk, které jsou obklopeny tenkou bazální laminou. V tenkých laterálních výběžcích endotelových buněk se vyskytují pinocytotické vezikuly zajišťující transcelulární přenos mnoha látek. Roztroušeně se podél kapilár a malých venul nachází pericyty s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými obklopují endotelové buňky. Pericyty vlastně nahrazují médii, protože obsahují proteiny aktin, myozin a tropomyozin, které jim dávají schopnost kontrakce. Kolem kapilár bývá vyvinuta tenká vrstva longitudinálně uspořádaných kolagenních vláken jako ekvivalent adventicie [3]. Kapiláry, stejně jako ostatní cévy, lze klasifikovat podle struktury stěny:

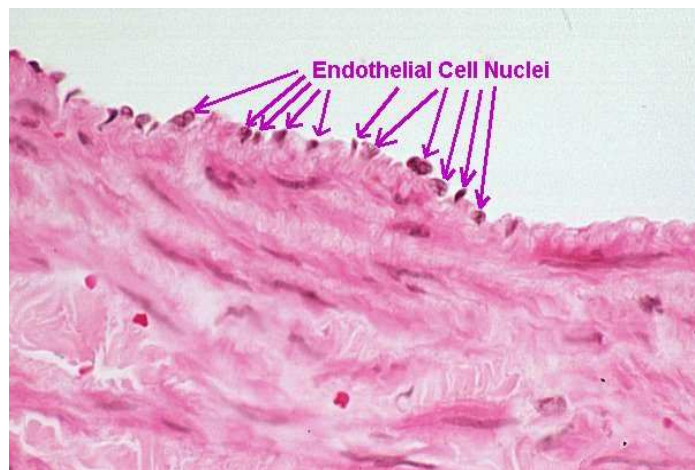
- Kapiláry se souvislou výstelkou jsou tvořeny hladkou endotelovou výstelkou bez pórů a vyskytují se ve svalech, v mozku a v periferních nervech.
- Fenestrované kapiláry se vyznačují endotelovými buňkami s fenestracemi (póry). Nachází se tam, kde je nezbytná rychlá výměna látek mezi tkáněmi a krví, například v ledvinách, střevech a endokrinních žlázách [2].
- Sinusoidní kapiláry mají velmi široké lumen, klikatý průběh a četné fenestrace [2]. Nachází se v játrech a v kostní dřeni [3].

2. 2 Endotel

Endotel je jednovrstevná výstelka krevních cév, lymfatických cév a srdečního endokardu. Je tvořen vysoce specializovanými buňkami a uložen na rozhraní krve (lymfy) a pevných tkání [2, 4].

Obrázek 3: Tunica intima s endotelem a jádry endotelových buněk [2013-03-24].

<<http://www.pathguy.com/histo/096z.jpg>>



2.2.1 Funkce endotelových buněk

Regulace cévní permeability

Endotelové buňky tvoří semipermeabilní membránu mezi krevním řečištěm a cévní stěnou, která zajišťuje obousměrnou a regulovanou propustnost. Endotel usměrňuje průnik nízkomolekulárních látek (vody, elektrolytů či léků), makromolekul (především proteinů a lipoproteinů) i buněk (hlavně monocytů a lymfocytů). Permeabilita je umožněna mnohými transportními mechanismy a lipofilní membrána omezuje pronikání hydrofilních látek [4].

Kontrola optimálního průtoku krve

Endotelové buňky jsou schopny regulovat tonus hladké svaloviny cévní stěny a zajišťovat tak ideální proudění krve. Syntetizují totiž některé vazoaktivní látky, které navozují vazodilataci nebo vazokonstrikci. Nejdůležitějším vazodilatátorem produkovaným endotelovými buňkami je EDRF/NO (endothelium-derived relaxing factor), neboli oxid dusnatý. Dalším významným vazodilatačním faktorem tvořeným endotelem je prostacyklin (PGI₂).

EDRF/NO je nenahraditelnou molekulou. Jeho permanentní sekrece zajišťuje průchodnost cév, inhibuje agregaci trombocytů, brání adhezi leukocytů a dalších krevních buněk a také snižuje permeabilitu endotelu pro aterogenní lipoproteiny a fibrinogen. Další jeho důležitou úlohou je inhibice proliferace a migrace buněk hladké svaloviny cévní stěny. NO je tvořen z L-argininu působením endoteliální NO syntázy (eNOS), jejíž uvolnění je nejvíce podporováno vzájemným působením krevního proudu s mikrofilamenty na povrchu endotelových buněk („shear stress“) nebo hypoxií. Uvolnění eNOS dále stimuluje i řada látek, například acetylcholin, bradykinin, histamin, serotonin, substance P, angiotenzin II, endoteliny a další.

Klíčový vazokonstriktor produkovaný endotelovými buňkami je endotelin-1 (ET-1). Syntéza ET-1 je stimulována shodnými podněty, které podporují uvolnění eNOS, a navíc některými aterogenními proteiny, například trombinem a lipoproteiny. Vazokonstriční účinek je současně tlumen zvýšenou produkcí NO a PGI₂.

Na povrchu endotelových buněk jsou vázány mnohé enzymy, například angiotenzin konvertující enzym (ACE), který štěpí substrát angiotenzin I na další významný vazokonstriktor angiotenzin II [4].

Antikoagulační a fibrinolytické vlastnosti

Endotel zajišťuje nesmáčivý vnitřní povrch cév, protože udržuje rovnováhu mezi hemokoagulačními a fibrinolytickými procesy. Již zmíněnou inhibicí adheze a agregace trombocytů brání EDRF/NO a PGI₂ následné aktivaci koagulačních faktorů [4]. Endotelové buňky vytváří trombomodulin, který je povrchovým receptorem pro trombin. Po obsazení trombomodulin přemění trombin z prokoagulačního proteinu na aktivátor proteinu C. Aktivovaný protein C pak působí významnými antikoagulačními vlastnostmi. Fibrinolýza je endotelem regulována produkcí tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) a inhibitory aktivátoru plazminogenu (PAI-1, 2, 3) [5].

Produkce růstových faktorů

Některé patologické stavy mohou narušit přirozenou strukturu endotelových buněk, které jsou však schopny se do jisté míry bránit a poškození reparovat. Tato funkce je zajišťována produkcí některých růstových faktorů endotelem, například PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor). Tyto látky mají mitogenní účinek na buňky hladké svaloviny. Stimulují je k migraci a proliferaci v médii i v subendoteliálním prostoru. Proliferaci podporuje také endotelin-1

a angiotenzin II. Aby byla zabezpečena rovnováha, je endotel rovněž zdrojem inhibitorů růstu. Nejdůležitějším je již jmenovaný EDRF/NO [4].

2.2.2 Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce

Poškození endotelu vede k mnoha kompenzačním odpovědím – aktivaci, která může vést k endoteliální dysfunkci, tedy rozvratu fyziologických funkcí endotelu [5, 6]. Poranění endotelu a jeho aktivaci může způsobit například přítomnost infekčního agens, stres, mechanické působení krevního proudu, toxické vlivy či zánětlivé reakce. K aktivaci vede také působení některých cytokinů, například IL-1 (interleukin-1) a TNF- α (tumor necrosis factor- α), dále přítomnost oxidovaných lipoproteinů a rovněž faktory vedoucí k aterosogenezi, zejména hyperlipidémie, hypertenze, diabetes mellitus a kouření [4].

Aktivované endoteliální buňky mění svůj tvar na okrouhlé, formují se v buňky mnohjaderné, značně proliferují a jsou významně permeabilnější [7, 8]. Zvýšená propustnost cévní stěny může zapříčinit kumulaci především lipoproteinů v subendoteliálním prostoru a vést tak k iniciaci aterosklerotického procesu [4].

Při běžném fyziologickém stavu endotel inhibuje adhezi leukocytů, monocytů a dalších krevních buněk. Výsledkem aktivace endotelových buněk je zvýšená adheze krevních buněk k povrchu endotelu, která je zapříčiněná patologickou expresí mnoha adhezivních molekul [9]:

- ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1)
- VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
- ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1)
- Selektiny P, L, E [5].

Monocyty zachycené vlivem adhezivních molekul, pronikají endotelem a bazální membránou do intimy, v níž se mění na makrofágy [10]. Ty způsobují uvolnění reaktivních kyslíkových radikálů, zejména superoxidového aniontu $\cdot\text{O}_2^-$. Radikály poškozují dále endotel, protože interagují s molekulami oxidu dusnatého: $\cdot\text{NO} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \cdot\text{ONOO}^-$. Tím jsou inhibovány jeho protektivní účinky [11]. Omezené vazodilatační působení NO vede k dysregulaci tonu hladké svaloviny cévní stěny a vyvolává vazokonstrikci [12], která může zapříčinit až spasmus cévní stěny [11]. Snížení antiagregačních a antiadhezivních účinků NO působí protromboticky. Změny vyplývající z poškození endotelu omezují i jeho aktivitu při regulaci hemokoagulace a fibrinolýzy. Narušení této rovnováhy způsobí převahu prokoagulačních faktorů [12].

Aktivované endoteliální buňky produkují výše zmiňované růstové faktory a indukují tak proliferaci vazivové tkáně. Dále syntetizují IL-1, TNF- α a MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) vedoucí k amplifikaci zánětu a chemoatrakci monocytů. Další cytokiny, původem z aktivovaných endoteliálních buněk, jsou M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) a GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), které přispívají k aktivaci makrofágů [5].

Endoteliální dysfunkce je prvním významným stádiem aterosklerózy, které lze prokázat dlouho před výskytem proliferace hladké svaloviny. Nejčastějším místem rozvoje endoteliální dysfunkce je koronární cirkulace. Rozvrat fyziologických funkcí endotelií se spolupodílí na vzniku ischemické choroby srdeční, případně infarktu myokardu. S projevy endoteliální dysfunkce se lze setkat i v jiných částech krevního řečiště, například v karotidách. [4].

2. 3 Ateroskleróza

Ateroskleróza je multifaktoriální proces v cévní stěně postihující převážně artérie [10]. Charakteristická je ložisková tvorba vazivových plátů v intimě, které mívají v centru kašovitou hmotu bohatou na tukové látky [13]. Tímto dochází ke kornatění tepen projevujícím se ztrátou elasticity a zesilováním arteriální stěny [14]. Aterosklerotický proces způsobuje poškození cévní stěny, jehož důsledkem může být buď rozšíření cévy (ektázie), eventuálně i její ruptura, ale nejčastěji parciální obturace cévního lumen. Poškození artérií se často nemusí klinicky projevit, někdy naopak pacienti trpí chronickými obtížemi. Mohou se vyskytnout i velmi nebezpečné akutní příhody vyplývající z náhlého narušení (ruptury nebo uzávěru) určité části krevního řečiště [10].

Již vzniklou aterosklerózu zcela vyléčit nelze. Následky aterosklerózy jako jsou stenózy a uzávěry tepen však léčitelné jsou. Existuje mnoho rizikových faktorů (budou zmíněny níže), které napomáhají rozvoji aterosklerózy. Jejich ovlivňování může zmírnit progresi onemocnění [15].

2.3.1 Epidemiologie

Ateroskleróza je příčinou naprosté většiny kardiovaskulárních chorob [15]. Podle aktuálních informací zveřejněných Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jsou kardiovaskulární onemocnění na celém světě zodpovědná přibližně za 30 % všech

mortalit. V roce 2000 se jednalo asi o 17 milionů úmrtí, z nichž bylo 7 milionů způsobeno ischemickou chorobou srdeční, která je hlavní příčinou kardiovaskulární mortality a v mnoha případech bývá způsobena právě koronární aterosklerózou. Dalších přibližně 5,5 milionů bylo zapříčiněno onemocněními mozkových cév [16].

Uvádí se, že v České republice je mortalita na kardiovaskulární onemocnění jedna z nejvyšších v Evropě, přestože v posledních několika letech začala klesat [16]. V roce 2000 zemřelo v ČR na tyto choroby 49,6 % mužů a 54,9 % žen [15].

Výskyt aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob se však geograficky značně liší. V rozvojových zemích Afriky, Střední a Jižní Ameriky a Asie jsou tato onemocnění mnohem vzácnější. Je zřejmé, že výrazné geografické rozdíly nejsou zapříčiněny vlivy genetickými, ale převážně zevními faktory a hlavně životním stylem [13].

2.3.2 Rizikové faktory

Stavy, které přispívají ke vzniku a rozvoji aterosklerózy se označují rizikovými faktory. Vzájemně se ovlivňují, takže pacient s několika diagnostikovanými faktory má mnohem vyšší riziko rozvoje tohoto onemocnění [15]. Tyto faktory lze rozdělit na endogenní, které nelze během života ovlivnit a na exogenní, které jsou získané. Zdravým životním stylem jim lze do jisté míry předcházet. Není-li uvedeno jinak, jsou následně jmenované rizikové faktory čerpány z [13].

Endogenní faktory

- Věk má vliv na toto onemocnění, sice časné aterosklerotické změny se objevují už v dětství, ale klinicky se většinou projevují až v dospělosti. Stárnutím se jeho výskyt výrazně zvyšuje.
- Pohlaví zapříčiňuje častější postižení mužů než žen. Důvodem je protektivní vliv ženských pohlavních hormonů, zejména estrogenu. Po menopauze se četnost choroby začíná zvyšovat a v sedmé až osmé dekádě života jsou obě pohlaví postižena zhruba stejně.
- Rodinná predispozice způsobuje, že se v některých rodinách vyskytují předčasné manifestace aterosklerózy a ischemické choroby srdeční. Nejčastěji jsou způsobeny geneticky podmíněnými poruchami metabolismu lipoproteinů projevující se vysokými hladinami krevních lipidů, jako je tomu například u familiární hypercholesterolemie.

Exogenní faktory

- Hyperlipidémie je nejzávažnějším rizikovým faktorem. Nejčastěji se jedná o hypercholesterolémii [13]. Výskyt klinických komplikací aterosklerózy je mnohem nižší u osob s cholesterolémií pod 5 mmol/l. Průměrná cholesterolemie průmyslově rozvinutých států Severní Ameriky a Evropy je mezi 5,5 a 6,0 mmol/l [7]. Vysoké hodnoty plazmatického cholesterolu jsou důsledkem genetických vlivů, ale hlavně nesprávného dietního režimu. Nejzávažnější genetickou poruchou je právě familiární hypercholesterolemie s autosomálně dominantní dědičností. U homozygotů se může klinicky projevit infarktem myokardu již před dvacátým rokem života, u heterozygotů pak ve středním věku [13].

- Hypertenze

- Kouření je dalším aterogenním činitelem, protože v kouři jsou nikotin a oxid uhelnatý působící škodlivě na endotel. Ukončení kouření vede k výraznému snížení rizika.

- Diabetes mellitus je významným rizikovým faktorem, protože vede k hypercholesterolémii. Nebezpečí infarktu myokardu je u diabetiků dvakrát až třikrát vyšší než u nediabetiků.

- Obezita

- Nedostatek tělesné aktivity

- Stres

- Hyperurikémie

- Hyperhomocysteinémie může být způsobena například nedostatkem metylentetrahydrofolátreduktázy. Zvýšená hladina homocysteinu zesiluje adhezi monocytů a trombocytů a tím podporuje tvorbu plaků [11].

K rozvoji aterosklerózy a diabetu mellitu 2. typu vede metabolický syndrom. Jedná se o soubor rizikových faktorů, které se často objevují současně. Postiženým osobám přináší extrémně vysoké riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob [17]. Klinická kritéria pro jeho diagnózu jsou uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1: Metabolický syndrom je diagnostikován zjištěním minimálně tří z těchto kritérií [2013-01-23, upraveno].

<<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/metabolicky-syndrom-a-kardiovaskularni-riziko-450201>>

Zvýšený obvod pasu	≥ 102 cm u mužů ≥ 88 cm u žen
Zvýšené triglyceridy	$\geq 1,7$ mmol/l nebo specifická léčba
Snížený HDL cholesterol	$< 1,0$ mmol/l u mužů $< 1,3$ mmol/l u žen nebo specifická léčba
Zvýšený krevní tlak	$\geq 130/85$ mm Hg nebo antihypertenzní léčba
Zvýšená lačná glykémie	$\geq 5,6$ mmol/l nebo porušená glukózová tolerance nebo diabetes mellitus 2. typu

2.3.3 Patogeneze

Patogeneze aterosklerózy je vysvětlována dle hypotézy „odpověď na poranění“ jako chronické zánětlivé onemocnění arteriální stěny reagující na poškození endotelu [14].

Obrázek 4: Patogeneze aterosklerózy [2013-03-25].

<<http://obezita.org/?page=prednasky&menu=6>>



Poškození a aktivace endotelu

Viz kapitola 2.2.2, strana 15.

Patogenní vliv aterogenních lipoproteinů

Lipoproteiny (LP) jsou kulovité makromolekulární komplexy umožňující transport lipidů v krevní plazmě. Skládají se z pláště, který tvoří amfifilní lipidy (fosfolipidy a cholesterol) a jádra obsahujícího silně hydrofobní lipidy (triacylglyceroly a estery cholesterolu). LP také obsahují bílkovinné součásti apolipoproteiny, které slouží jako ligandy (například ApoB₁₀₀) pro LP-receptory v membránách LP-cílových buněk. LP se liší svou velikostí, densitou, obsahem lipidů a rovněž typy apolipoproteinů. Hlavní třídy lipoproteinů jsou:

- Chylomikrony
- Chylomikronová remnanta
- VLDL (very low density LP)
- LDL (low density LP)
- HDL (high density LP) [18].

Aterogenními LP jsou zejména LDL a VLDL [10]. Funkcí LDL je dodávat cholesterol periferním tkáním (kosterní svalstvo, tuková tkáň), čímž dochází k vzestupu intracelulární koncentrace cholesterolu. Funkcí VLDL je transport triacylglycerolů a cholesterolu rovněž z jater do periferních tkání. Prostřednictvím aktivace endotelové lipoproteinové lipázy zde dochází k odštěpení volných mastných kyselin, které přijímají svalové a tukové buňky. Takto z VLDL vznikají IDL (intermediate density LP). Část IDL je stykem s jaterní lipázou přeměněna na LDL. HDL naopak přenáší nadbytek cholesterolu z extrahepatálních buněk a z krve. Prostřednictvím LCAT (lecitin-cholesterol acyltransferáza) dochází k částečné esterifikaci cholesterolu a následnému transportu do jater a žláz produkujících steroidy (například nadledviny) [18]. Účinek HDL je tedy vůči ateroskleróze protektivní.

Nadměrná koncentrace aterogenních LP v krvi způsobuje jejich zvýšené pronikání do arteriální stěny i přesto, že endotel působí jako částečná bariéra. Průnik vzrůstá se zvýšenou permeabilitou endoteliálních buněk a se stoupající koncentrací LP v plazmě [7]. Akumulace LP v intimě artérií je zásadní příčinou vývoje aterosklerotických lézí [8]. Aterogenicita malých LDL je větší, protože snáze vstupují do arteriální stěny a jsou rychleji oxidovatelné [7]. Velikost a komplexnost lézí se zvyšuje s hromaděním LP. Ve zdravých cévách jsou v intimě přítomny lipoproteiny stejné, ale nachází se zde v menších koncentracích. Prahová koncentrace indukující jejich akumulaci a buněčné patologické reakce není známa [8].

Shromážděné LP mohou být následně strukturně modifikovány vlivem nadbytku kyslíkových radikálů, případně i neenzymovou glykací navázáním glukózy. Uvádí se, že LP přítomné v intimě cévní stěny mají vyšší riziko oxidačního poškození kyslíkovými radikály, protože ve srovnání s krevní plazmou, je v intimě menší aktivita antioxidantních procesů [10]. Oxidované molekuly LP přispívají k poškození a aktivaci endotelu, podporují expresi adhezivních molekul a indukují proliferaci buněk hladké svaloviny [11].

Role makrofágů během aterogeneze

Makrofágy jsou buňky imunitního systému vzniklé z myeloidní vývojové větve krvetvorby. Díky M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) jsou vytvořeny monocyty. Ty se přestupem z krve do tkání mění na tkáňové makrofágy, které jsou schopny fagocytózy a slouží tak k obraně [19] před nadměrným množstvím LP.

V intimě zdravých jedinců se makrofágy vyskytují izolovaně a roztroušeně. Mnohem více monocytů vstupuje z krevního oběhu do intimy při hypercholesterolémii. Za tento pohyb mohou nahromaděné oxidované LP, které působí na monocyty chemotakticky [8] a zvýšená adheze monocytů k aktivovaným endoteliálním buňkám [7].

Makrofágy fagocytující LP jsou schopny migrovat zpátky do krve, a tím tyto LP z intimy odstraňovat [10]. Makrofágy na svém povrchu exprimují mimo specifických LDL receptorů [12] také „scavenger“ („odklízecí“) receptory, díky nimž zachycují oxidované LP a cholesterol [10]. Protože počet „scavenger“ receptorů není regulován hladinou cholesterolu, vede velké množství LP k jejich nadměrnému pohlcování makrofágy. Buňky makrofágů se tím rychle zvětšují, čímž je bráněno jejich migraci do krve. Zadržované makrofágy se v intimě mění na pěnové buňky, které jsou základním buněčným elementem v aterosklerotickém plátu. Pěnové buňky se vyznačují svou nestabilitou a možným rozpadem, který podporuje vznik extracelulární masy ateromu [12].

Právě makrofágy jsou velmi aktivní v průběhu aterogeneze, protože v intimě cév produkují řadu částic. Tvoří různé enzymy, růstové faktory, například VEGF (vascular endothelial growth factor), dále zánětlivé mediátory – cytokiny, k nimž patří mimo jiné IL-1 (interleukin-1), IL-2 (interleukin-2), TNF- α (tumor necrosis factor- α), IFN- γ (interferon- γ). Syntéza těchto struktur aktivuje další buňky z monocyto-makrofágové linie a z endotelu, což aterosklerotický proces amplifikuje [12].

Úloha buněk hladké svaloviny v patogenezi aterosklerózy

Dalším významným znakem aterogeneze je migrace buněk hladké svaloviny z médiu do intimy, která je způsobená chemotaktickými faktory adhezaních monocytů a trombocytů. Buňky hladké svaloviny jsou prostřednictvím růstových faktorů (z makrofágů, trombocytů, aktivovaných endoteliálních buněk a samotných svalových buněk) významně stimulovány k proliferaci a sekreci komponent extracelulární matrix (kolagen, elastin, proteoglykany), čímž je podpořena tvorba ateromů [11]. Buňky hladké svaloviny se v intimě rovněž podílí na příjmu lipoproteinů buď prostřednictvím specifických lipoproteinových receptorů, nebo „scavenger“ receptory [8]. Důsledkem těchto patologických změn je hromadění pěnových buněk a hladkých svalových buněk s následným poškozením bazální membrány intimy [10].

2.3.4 Predilekční místa pro rozvoj aterosklerotických lézí

V cévním řečišti byla nalezena specifická místa, která jsou pro tvorbu aterosklerotických lézí predilekční [9]. Nejvíce aterosklerotických změn bývá (v sestupném pořadí) v dolní břišní aortě, iliackých tepnách, v počátečních úsecích koronárních tepen srdce, také ve femorálních a popliteálních tepnách, ve vnitřních krkavicích a v tepnách Willisova okruhu báze mozku. Méně často bývají zasaženy tepny horních končetin, mamární a renální tepny, vzestupná aorta a její oblouk. Stárnutím organismu počet aterosklerotických plátů narůstá, zvětšují se a sílí. Často se mohou spojovat a postihnout tak značné části intimy [13]. U jedinců s těžkou hypercholesterolemií se mohou pokročilé léze vyskytovat nejen v těchto predilekčních místech, ale téměř ve všech regionech aorty a v mnoha dalších artériích [9].

2.3.5 Patologie aterosklerotických lézí

Vývoj aterosklerotických lézí lze rozlišit podle patologickoanatomického hlediska na tři základní stádia aterosklerózy. Není-li uvedeno jinak, jsou následně jmenovaná stádia čerpána z [20].

- Časné léze, tukové proužky (fatty streaks) jsou nejčastější formou aterosklerózy, kterou lze pozorovat již u dětí, a někdy i u novorozenců. Tukové proužky bývají přítomné v intimě především velkých cév a makroskopicky je lze detekovat díky žluté barvě. Jejich strukturu tvoří hlavně pěnové buňky a T-lymfocyty. Tukové proužky mohou v průběhu života ustupovat, nebo se vyvíjet v další aterosklerotické léze.

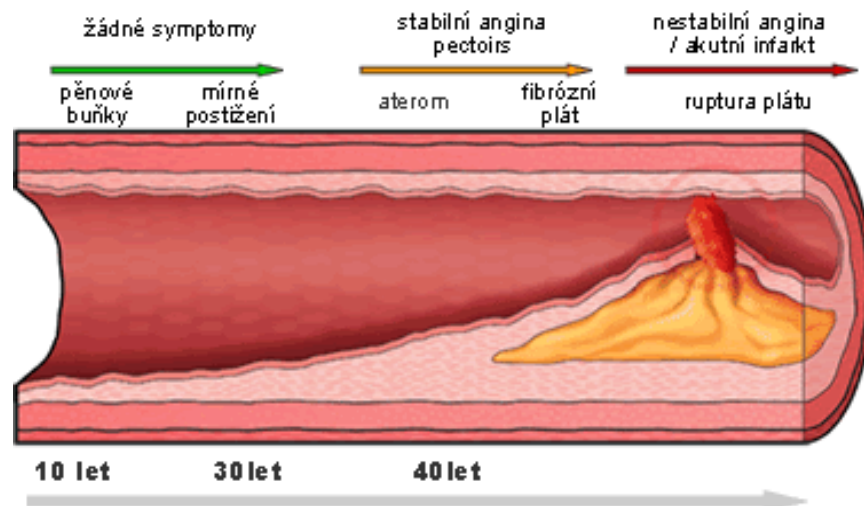
- Fibrózní a ateromové pláty jsou větší, tužší, někdy dokonce chrupavčité konzistence, bledě šedé nebo žluté barvy, záleží na obsahu tuků. Pláty prominují do cévního lumina, což vede k jeho parciálnímu nebo komplexnímu uzavření. Základem plátů je hmota tvořená kolagenní matrix a nánosy tuků. Buněčnými elementy fibrózních plátů jsou proliferující buňky hladké svaloviny, makrofágy, pěnové buňky i lymfocyty. Typická bývá nekróza některých vrstev fibrózních plátů doprovázená kalcifikací a formováním krystalů cholesterolu.

- Komplikované léze jsou důsledkem masivních kalcifikací fibrózních plátů a hlavně klinicky významných degenerativních změn [20], mezi které patří ruptura a ulcerace, hemoragie a aneuryzmata. Ruptura a ulcerace aterosklerotických plátů vyvolávají protrombotický stav způsobující organizaci trombu. Vzniklý trombus částečně nebo úplně uzavírá cévní lumen a vede k ischemii dané tkáně či orgánu [14]. Typickým příkladem parciálního zúžení cévního průsvitu koronárních tepen je

ischemická choroba srdeční [11]. Naopak kompletní uzavření lumen vede k nejzávažnějším komplikacím aterosklerózy, jimiž jsou infarkt myokardu [14] a mozkový infarkt [11]. Hemoragie do plátů je dalším vážným následkem aterosklerotických lézí. Je velmi nebezpečná, protože vznikající hematom může expandovat a způsobit tak rupturu plátu. Formování aneuryzmat bývá navozeno tlakem aterosklerotického plátu na cévní stěnu [14]. Jedná se o patologickou dilataci arteriální stěny. Nejčastěji bývá postižena břišní aorta. Katastrofální komplikací je ruptura aneuryzmatu [11].

Obrázek 5: Průřez artérií postiženou aterosklerózou, vpravo je znázorněno komplexní uzavření lumen trombem nasedajícím na aterosklerotický plát. [2013-03-25].

<<http://www.infarktmyokardu.info/main.html>>

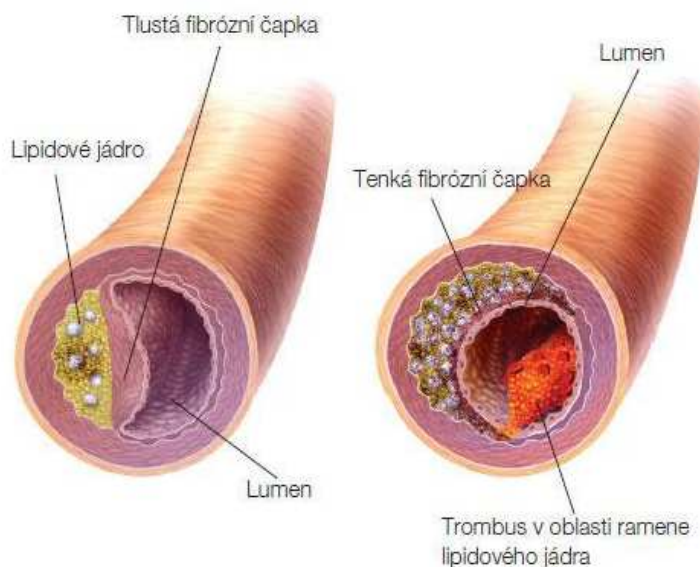


2.3.6 Typy aterosklerotických plátů

Pro určení rozsahu aterosklerotického postižení a možných klinických komplikací je důležité znát složení a charakter plátu. Stabilní plát se vyznačuje nízkým obsahem tuků. Většinou není náchylný k ruptuře, protože mívá silnou vazivovou čepičku. Nestabilní plát je bohatý na lipidy. Jeho ruptura je častá, protože jej tvoří jen tenká vazivová čepička prostoupená četnými makrofágy [15, 20].

Obrázek 6: Typy aterosklerotických plátů [2013-03-11].

<<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fosfolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141>>



2.4 Endoglin

Endoglin (CD 105) je homodimerní transmembránový glykoprotein, který byl poprvé identifikován na konci osmdesátých let v endoteliálních buňkách. Významně ovlivňuje angiogenezi [21] a homeostázu cévní stěny [22]. Je jedním z mnoha receptorů pro TGF- β (transforming growth factor- β) a jeho signalizační dráhy [21]. Bylo zjištěno, že je velmi důležitým markerem v mnoha patologických procesech zahrnujících hereditární hemoragickou teleangiektázií [23] a několik dalších onemocnění. V nedávné době byla odhalena jeho role také u kardiovaskulárních chorob, například u těhotenské preeklampsie [24] a jiných stavů.

2.4.1 Struktura endoglinu

Endoglin je tvořen dvěma podjednotkami o velikosti 95 kDa, které jsou spojeny disulfidickými můstky. Každá podjednotka se skládá z extracelulární domény čítající 561 aminokyselin, hydrofobní transmembránové domény s obsahem 25 aminokyselin a cytosolické domény se 47 aminokyselinami [25]. Byly popsány dvě izoformy endoglinu, které se liší sekvencí právě cytosolické domény. Dominantní L-izoforma se skládá ze 47 aminokyselin, minoritní S-izoforma však pouze ze 14 aminokyselin [26]. Ukázalo se, že se obě izoformy liší nejen strukturou, ale také některými účinky. L-endoglin podporuje angiogenezi, naopak S-endoglin ji potlačuje. Dalším rozdílem je

stimulace exprese endoteliální NO syntázy (eNOS) L-endoglinem a snížená exprese eNOS S-endoglinem [27].

2.4.2 Exprese endoglinu

Endoglin je nejvýznamněji exprimován endoteliálními buňkami, monocyty a makrofágy, také trofoblasty a různými mezenchymálními buňkami, mezi které patří například fibroblasty a buňky hladké svaloviny cév [28].

Exprese endoglinu významně ovlivňuje vývoj kardiovaskulárního systému, reguluje angiogenezi, cévní homeostázu a integritu. K nadměrné expresi dochází během reakce organismu na zánětlivý proces a také při neoangiogenezi související s růstem tumoru [29].

Buňky hladké svaloviny cév jsou během aterogeneze prostřednictvím růstových faktorů významně stimulovány k proliferaci a sekreci komponent extracelulární matrix (kolagen, elastin, proteoglykany). Tím je podporována tvorba ateromů [11]. Právě endoglin je potřebný pro správný vývoj buněk hladké svaloviny v cévách [28], což potvrdila studie myší, které byly geneticky modifikovány tak, že postrádaly jednu, nebo obě kopie genu pro endoglin. Myši s absolutním deficitem endoglinu podlely mortalitě již v embryonálním stádiu. Smrt byla způsobená poruchami angiogeneze a kardiovaskulárními, a navíc abnormálním vývojem buněk hladké svaloviny cév [30].

2.4.3 Exprese endoglinu u myších modelů aterosklerózy

Na rozdíl od lidí, je u myší exprese endoglinu lokalizovaná téměř výlučně v lumenálních endoteliálních buňkách u zdravých i aterosklerózou zasažených cév [31]. Tento fakt umožňuje studium účinků endoglinu na endotel během aterogeneze [32].

Exprese endoglinu endotelovými buňkami aorty může souviset s plazmatickou hodnotou cholesterolu a rovněž s fází aterosklerózy. Podávání aterogenní potravy myšímu kmeni C57BL/6J vedlo ke zvýšení plazmatického cholesterolu spolu se zvýšenou expresí endoglinu v endotelu aorty. U těchto myší nebyly detekovány aterosklerotické léze [33]. U myší apoE/LDLR deficientních způsobila zvýšená hladina plazmatického cholesterolu a již progredující aterosklerotické léze sníženou expresi endoglinu v aortě. Protože hodnota endoglinu v krevní plazmě byla naopak zvýšená, předpokládá se, že hypercholesterolemie zvyšuje endoglin v krevní plazmě, ale snižuje jeho expresi v cévách. Právě jeho inhibovaná exprese během rozvíjející se aterosklerózy způsobuje utlumení na endoglinu závislé TGF- β signalizace v cévách, což může být jedním z faktorů podporujících endoteliální dysfunkci a aterogenezi [34].

Expresi endoglinu rovněž ovlivňují nejčastěji užívaná hypolipidemika, tedy statiny. Atorvastatin snižuje hladinu cholesterolu a VLDL také u myší, ale pouze u těch, které byly krmeny aterogenní dietou [33]. U myší apoE/LDLR deficientních s progredující aterosklerózou atorvastatin způsobil významné snížení celkového, VLDL i LDL cholesterolu, regresi aterosklerotických lézí a také pokles hladiny endoglinu v plazmě. Současně atorvastatin způsobil zvýšení exprese endoglinu v aortě, což by mohlo znamenat, že tato aktivace endoglinu podporuje antiaterogenní efekty atorvastatinu [35].

2.4.4 Vliv endoglinu na endoteliální NO syntázu

V kapitole 2.2.1, strana 14 již byla zmínka o klíčovém enzymu umožňujícím produkci NO endotelovými buňkami, tedy eNOS.

Expresi a aktivita eNOS je velmi zásadní, protože syntetizovaný NO svými protektivními účinky udržuje fyziologické funkce endotelu. Snížená exprese eNOS navozuje stav endoteliální dysfunkce, která je iniciálním faktorem aterogeneze [32].

Výzkumem endoglin-haploinsuficientních myší (Eng^{+/-}) byla zjištěna přímá souvislost mezi expresí endoglinu a eNOS. Deficit jediného genu pro endoglin totiž vedl k redukované expresi eNOS, jejímž důsledkem byla omezená NO-dependentní vazodilatace u těchto myší [36].

Endoglin je nezbytnou komponentou pro aktivaci eNOS. Stěžejní funkcí endoglinu je tedy podpora fyziologického fungování endotelových buněk a regulace tonu cévní stěny [37].

Další *in vitro* studie vysvětlila mechanismus, kterým endoglin up-reguluje expresi eNOS. Endoglin totiž prostřednictvím TGF- β aktivace podporuje Smad2 specifickou signalizaci zvýšením stability a hladiny Smad2 proteinu. Výsledkem je zesílená exprese eNOS v endoteliálních buňkách [38].

2.4.5 Vztah endoglinu k ateroskleróze

Expresi endoglinu buňkami endotelu, buňkami hladké svaloviny a makrofágy, naznačuje jeho roli při aterogenezi [32]. Většina buněk hladké svaloviny v lidských aterosklerotických lézích exprimuje vysoké hladiny endoglinu, zatímco u cévních stěn nezasazených aterosklerózou je jeho exprese nízká. Proto se předpokládá, že zvýšená exprese endoglinu buňkami hladké svaloviny je reakcí na poranění cévní stěny, které je způsobeno aterogenními stimuly [28].

Endoglin svým působením přispívá ke stabilizaci aterosklerotických plátů. Aktivace endoglinu a jeho signalizačních cest totiž zvyšuje hladinu transkripčního faktoru EGR-1 (early growth response-1), který stimuluje proliferaci buněk hladké svaloviny cév a syntézu kolagenu, což pláty stabilizuje [39].

Předpokládá se, že příčinou zvýšené exprese endoglinu v cévách na počátku aterosklerotického procesu je reakce endotelu na stres a hypercholesterolémii. Naopak při pokročilých stádiích aterosklerózy, je exprese redukována v důsledku inhibice na endoglinu závislé TGF- β signalizace v cévách. Výzkumy tedy naznačují, že by endoglin a s ním související signalizační cesty mohly mít během aterogeneze protektivní účinky. Tato hypotéza však musí být objasněna a potvrzena v budoucích studiích [32].

2.5 Myší modely aterosklerózy

Definovat aterogenní mechanismy a proces postupně se vyvíjejících lézí přímo u pacientů nelze, protože chybí možnosti neinvazivní detekce. Z tohoto důvodu jsou již více než dvě desetiletí nejčastěji využívanými modely aterosklerózy myší kmeny [40]. Myši jsou vůči ateroskleróze velmi rezistentní. Identifikací genů, které byly následně modifikovány, se docílilo rychlejšího nástupu a progresu aterosklerózy [41]. Těchto modifikací bylo objeveno mnoho a právě kvůli genetické rozmanitosti kmenů se začaly tolik využívat k výzkumu. Všechny současné myší modely vznikají díky genovému inženýrství a také odchylkám od fyziologických hladin lipoproteinů, které jsou vyvolané potravou [40].

2.5.1 Model C57BL/6

Pokud jsou myši krmeny nízkotučnou potravou s malým obsahem cholesterolu, tak se jejich cholesterolémie pohybuje pod 5,5 mmol/l. Převažuje antiaterogenní HDL lipoproteinová frakce a ke vzniku aterosklerózy nedochází. Prvním modelem s rozvinutými aterosklerotickými lézemi, byl kmen C57BL/6. Vznik aterosklerózy byl u těchto myší docílen několikaměsíčním podáváním nefyziologické a aterogenní potravy (1,25 % cholesterolu, 15 % tuků a 0,5 % kyseliny cholové), která způsobila dvojnásobné až trojnásobné zvýšení cholesterolémie. HDL lipoproteiny byly naopak zastoupeny podstatně méně a převažovaly aterogenní LDL a VLDL [41].

Myší model C57BL/6 měl však dvě negativa. Jedním byl fakt, že oproti lidským lézím byly ty myší velmi malé, objevovaly se pouze v okolí semilunární aortální chlopně a neprogredovaly. Druhým problémem byla aterogenní potrava podávaná tomuto kmeni, protože způsobila chronický zánětlivý stav [42].

Tato studie byla velkým pokrokem, protože odhalila vliv genetické výbavy na vývoj aterosklerózy. Stejnou potravou bylo totiž krmeno několik dalších myších kmenů, avšak ateroskleróza se vyvinula jen u některých [41].

2.5.2 Model s deficitem apolipoproteinu E

Apolipoprotein E je glykoprotein syntetizovaný jak u myší, tak u lidí v játrech, mozku a dalších tkáních [43]. Je ligandem pro receptory umožňující clearance chylomikronových remnant a VLDL. Nedostatek apolipoproteinu E způsobuje akumulaci těchto částic bohatých na cholesterol v plazmě, jejichž prodloužená cirkulace v plazmě má významný proaterogenní efekt [44].

ApoE-deficientní myši (ApoE^{-/-}) jsou prvním myším kmenem, u kterého se během několika týdnů vyvinuly aterosklerotické pláty velmi podobné lidským a bylo zachyceno kompletní spektrum lézí objevujících se během aterogeneze. Pokud byly myši krmeny tzv. „Western-type diet“, tedy potravou obsahující 0,15 % cholesterolu a 21 % tuku, došlo k ještě rychlejšímu vzniku aterosklerotických lézí a větší manifestaci onemocnění. Tento kmen se stal základem pro studium patogeneze a terapie aterosklerózy v malých, geneticky modifikovaných zvířatech [45].

2.5.3 Model s deficitem LDL receptoru

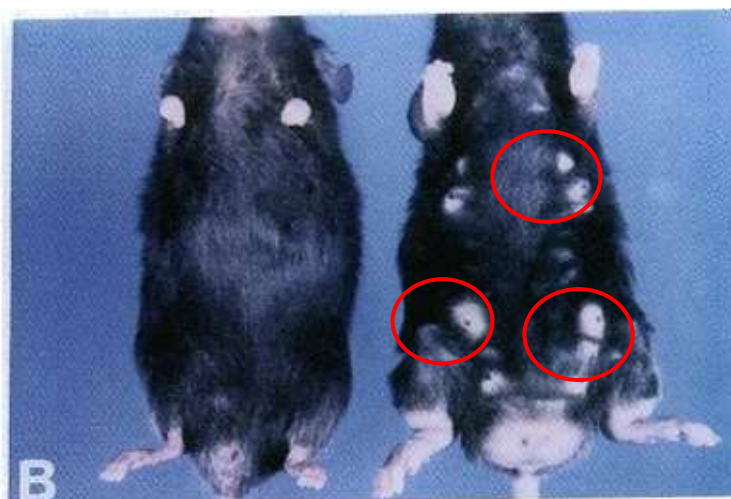
Dalším významným modelem byly myši s deficitem LDL receptoru (LDLR^{-/-}) [46]. Tento receptor je schopen identifikovat apolipoprotein B 100, který je zakotvený ve fosfolipidové vnější stěně LDL částic a apolipoprotein E nacházející se v chylomikronových remnantech a VLDL částicích. LDL receptor zprostředkuje odstranění těchto lipoproteinových partikulí z krevního oběhu [47].

Model s knockoutovaným LDL receptorem se vyznačuje zvýšenými hladinami aterogenních lipoproteinů, které jsou následkem jejich zpožděné clearance z plazmy. Tyto myši byly krmeny potravou obsahující 1,25 % cholesterolu, 7,5 % kakaového másla, 7,5 % kaseinu a 0,5 % kyseliny cholové, což v průběhu měsíců způsobilo zvýšení celkového plazmatického cholesterolu až na 83,3 mmol/l. U tohoto kmene se vyvinuly masivní aterosklerotické léze a mohutné prosakující xantomy, viz Obrázek 7 a 8. Podávání stejné potravy geneticky nemodifikovanému divokému kmenu zapříčinilo

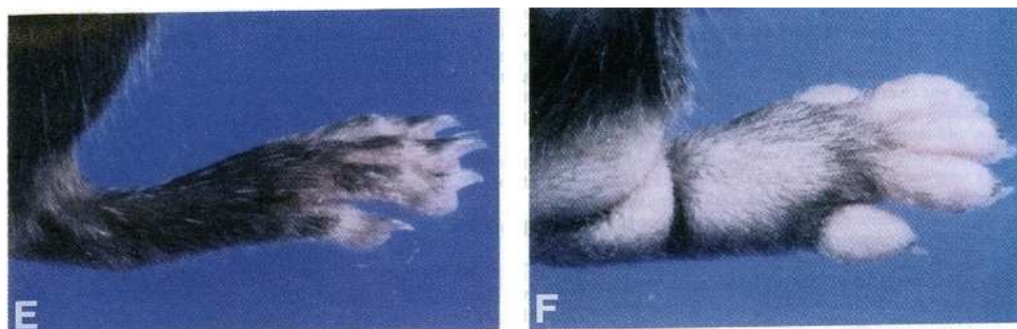
přibližně dvojnásobné zvýšení cholesterolemie (160 mg/dl) ve srovnání s krmením běžnou nízkotučnou stravou. Aterosklerotické změny se neobjevily [46].

Obrázek 7: Xantomy, patrné vpravo.

Vlevo je srovnání s geneticky nemodifikovaným, zdravým divokým kmenem. Obě myši jsou samice a při pořizování fotografie jim bylo dvanáct měsíců [46].



Obrázek 8: Srovnání tlapky s xantomy (F) a bez nich (E) [46].



Díky rozvíjejícímu genovému inženýrství bylo vyvinuto mnoho dalších modelů, například myši se zvýšenou expresí apolipoproteinu B nebo i kombinace mutant. Výše jsou zmíněny kmeny historicky nejstěžejnější, které se staly základem pro další výzkum v této oblasti.

2.5.4 Využití myších modelů

Myši jsou nyní běžně využívány k výzkumu aterosklerózy. Umožňují studium patogeneze a molekulárního dění, vlivů prostředí, léků, hormonů [48]. Jak přesně

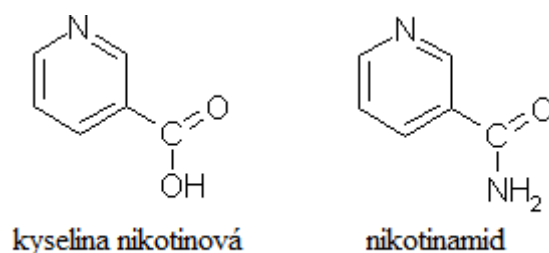
napodobují nemoc u lidí, je těžké zjistit, protože chybí detailní znalosti průběhu lidské choroby [40]. Rozsáhlé klinické manifestace a komplikace způsobené aterosklerózou (například infarkt myokardu), ke kterým u lidí bohužel často dochází, se u myši objevily pouze v několika případech [49]. Přesto byly objeveny velmi blízké morfologické podobnosti lézí vyvinutých v myších i lidech, a tak se ke studiu nejen aterosklerózy budou myší modely používat i nadále [40].

2.6 Kyselina nikotinová

Kyselina nikotinová (niacin) je provitamin nikotinamidu, tedy vitamínu B₃. V minulosti byla využívána jako vazodilatans, ale dnes je v medicíně uplatňována pouze k terapii hyperlipidemií [50].

Obrázek 9: Chemické strukturní vzorce [2013-04-22, upraveno].

<<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/ff/8/Niacin.png>>



2.6.1 Mechanismus účinku

Kyselina nikotinová inhibuje lipolýzu, čímž snižuje transport volných mastných kyselin do jater. Jejím dalším významným účinkem je inhibice enzymu (jaterní diacylglycerol acyltransferáza-2) nezbytného pro syntézu triacylglycerolů. Omezená syntéza triacylglycerolů způsobuje degradaci apolipoproteinu B v játrech, což vede ke snížené tvorbě VLDL a LDL. Hodnoty HDL cholesterolu niacin naopak zvyšuje.

Hypolipidemický účinek je patrný od dávek 1 g/den, ale pro dosažení plného efektu jsou zpravidla nutné dávky 1,5-2 g/den. Podávání terapeutických dávek niacinu snižuje hladiny LDL cholesterolu (LDL-C), triacylglycerolů a lipoproteinu(a) (Lp[a]) asi o 20 % a zvyšuje hodnoty HDL cholesterolu (HDL-C) taktéž přibližně o 20 % („pravidlo 20“).

Existuje mnoho studií, které dokazují, že kyselina nikotinová (v monoterapii, či v kombinaci s dalšími hypolipidemiky) omezuje kardiovaskulární morbiditu a mortalitu a inhibuje rozvoj aterosklerotického procesu [51].

2.6.2 Fixní kombinace ER niacin/laropirant

Ačkoli je niacin jedním z nejstarších hypolipidemik, jeho širší využívání v klinické praxi bylo v minulosti značně omezeno výskytem častého a velmi nepříjemného nežádoucího účinku – flush (zarudnutí kůže, návaly horka, pálení, svědění). Podávání formy kyseliny nikotinové s prodlouženým uvolňováním (ER – extended release) flush sice zmírnilo, ale tato inhibice byla nedostatečná a nadále bránila adherenci k léčbě. Flush je vyvolán interakcí vazodilatačně působícího prostaglandinu D₂ (PGD₂) se specifickým receptorem (prostaglanin D₂ receptor 1). Aby došlo k ještě většímu omezení tohoto nežádoucího účinku, byl vyvinut selektivní antagonist zmiňovaného receptoru – laropirant, který brání vazodilataci po syntéze PGD₂ inhibicí vazby PGD₂ na tento receptor. Laropirant koncentrace plazmatických lipidů neovlivňuje a má minimální nežádoucí účinky. Jedna tableta této fixní kombinace obsahuje 1000 mg niacinu s řízeným uvolňováním (ER) a 20 mg laropirantu [51].

Indikace

Kombinovaný přípravek ER niacin/laropirant je vhodný k léčbě pacientů se smíšenou dyslipidémií (zvýšená koncentrace LDL-C, triacylglycerolů a nízká hladina HDL-C), dále u pacientů s primární hypercholesterolémií v kombinaci se statiny, pokud statiny sami o sobě k úpravě hodnot cholesterolu nestačí. Tento přípravek lze použít i v monoterapii [51].

Kontraindikace

Přípravek nesmějí užívat pacienti hypersenzitivní na léčivé a pomocné látky v něm obsažené, dále jedinci se závažnou poruchou funkce jater. Zvýšená opatrnost je zapotřebí u osob požívajících větší množství alkoholu nebo majících v anamnéze postižení jater. Preparát je dále kontraindikován u osob s aktivní vředovou chorobou. Opatrnosti je také třeba u pacientů s poruchou funkce ledvin, protože se kyselina nikotinová a její metabolity ledvinami vylučují [51].

Nežádoucí účinky

Mimo flush může dojít ke zvýšení hladin kyseliny močové a lačné glykémie, které vyžadují zvýšenou pozornost u pacientů s anamnézou dny a diabetes mellitus. Opatrnosti je zapotřebí také u osob s nestabilní anginou pectoris či s akutním infarktem myokardu, obzvlášť jsou-li léčeni nitráty, blokátory kalciových kanálů či adrenergními blokátory [51].

Dávkování

Léčba bývá zahajována jednou tabletou denně. Po čtyřech týdnech se dávkování zvýší na dvě tablety jednou denně (tedy 2000 mg/40 mg). Tablety je nutno užívat v celku, spolu s jídlem, večer nebo před ulehnutím. Před spolknutím se tableta nesmí dělit, drtit ani žvýkat, aby nebyly narušeny vlastnosti způsobující řízené uvolňování. Během léčby je nezbytné vyhýbat se požívání alkoholu a konzumaci kořeněných jídel, čímž se omezí riziko flush [51].

2.7 Imunohistochemie

Imunohistochemie je metoda, která umožňuje detekci proteinů ve tkáňových řezech. Je využívána především k hodnocení progresu a léčby mnoha nemocí, například nádorových chorob.

Při vlastním imunohistochemickém barvení se používají protilátky rozpoznávající cílový protein. Protilátky jsou velmi specifické, což umožní jejich navázání pouze na studovaný protein. Tato interakce antigen-protilátka je následně vizualizovaná pomocí chromogenní detekce, při níž se využívá enzymu konjugovaného s protilátkou, který štěpí substrát za vzniku barevné sraženiny v místě sledovaného proteinu. Druhým způsobem vizualizace je fluorescenční mikroskopie detekující fluorofor konjugovaný s protilátkou [52].

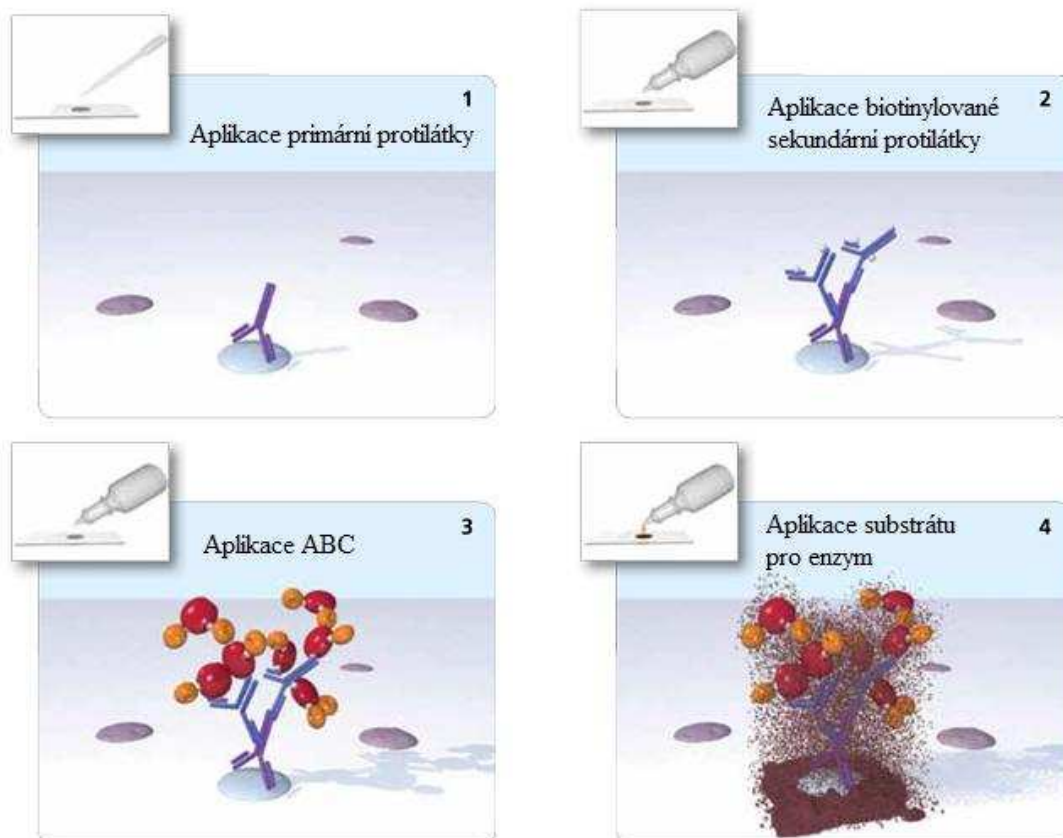
2.7.1 Avidin-biotin metoda (ABC)

Jedná se o velmi citlivou, ekonomickou a spolehlivou metodu, která využívá mimořádně vysoké afinity glykoproteinu avidinu k vitamínu biotinu. Tato afinita je více jak milionkrát vyšší ve srovnání s afinitou protilátek k většině antigenům. Další výhodou jsou čtyři vazebná místa avidinu pro biotin.

Principem metody je aplikace biotinylované sekundární protilátky k neznačené primární protilátce. Následně se aplikuje makromolekulární komplex (ABC), tedy avidin s biotinylovaným enzymem, který je poté vizualizován [53].

Obrázek 10: Jednotlivé kroky ABC metodiky [2013-04-11, upraveno].

<<http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=42>>



3 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE

Záměrem této diplomové práce bylo nastavit metodiku na detekci exprese endoglinu v aterosklerotických plátech arteria brachiocephalica. Dále jsme se chtěli zabývat potencionálními změnami v expresi endoglinu po podávání kyseliny nikotinové, přičemž studie byla koncipována jako pilotní experiment. Pro tyto účely jsme použili kmen apoE/LDL-receptor deficientních myší krměných specifickou dietou s nízkým obsahem sacharidů a vysokým množstvím proteinů, dále pak imunohistochemické a stereologické metody.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu

4.1.1 Zvířata a jejich chov

Pro tuto studii byly použity ApoE/LDLR^{-/-} myší samice s předem stanovenou aterosklerózou stáří 16-18 týdnů. Kolonie myší byly chovány v klecích při kontrolované teplotě (22-25 °C) a byly dodržovány 12hodinové cykly - světlo/tma. Zvířata měla volný přístup k vodě a potravě.

Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny v souladu s Guidelines for Animal Care and Treatment of the European Union a schváleny lokální etickou komisí pro zvířata.

4.1.2 Potrava a krmení

Do věku 16-18 týdnů bylo myším podáváno granulované krmivo prosté cholesterolu (Sniff M-Z Spezialdiäten GmbH; Soest, Německo). Ve věku 16-18 týdnů byly myši rozděleny podle váhy do skupin po šesti a krmeny upravenou AIN-93G-based dietou. Skupině LCHP byla podávána AIN-93G s nízkým obsahem sacharidů a vysokým množstvím proteinů po dalších osm týdnů. Skupina LCHP + kyselina nikotinová byla krmena potravou s nízkým obsahem sacharidů a vysokým množstvím proteinů po dobu čtyř týdnů. Následně byla této skupině podávána LCHP dieta s přidavkem 1% kyseliny nikotinové a to po další čtyři týdny. Z levé srdeční komory byly myším odebrány vzorky krve, které byly umístěny do zkumavek a centrifugovány pro získání krevního séra. Vzorky byly hluboce zmrazeny a až do vlastní analýzy uchovávány při teplotě -80 °C. Pro zjištění frakcí celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerolů byly použity dostupné kity (Horiba). Výsledky byly vyjádřeny v mmol/l.

4.2 Imunohistochemie

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

4.2.1 Použité protilátky

- Primární monoklonální protilátka - rat anti-mouse CD 105 (BD Pharmingen; USA), ředění v BSA (bovine serum albumin; Vector Laboratories; USA) 1:50
- Sekundární monoklonální protilátka - biotinylated goat anti-rat IgG (Vector Laboratories; USA), ředění v BSA 1:400 + 8 μ l mouse serum

4.2.2 Příprava roztoků a činidel

PBS (phosphate buffered saline) pufr:

80,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nebo 10,21 g Na_2HPO_4 , 2,0 g KH_2PO_4 ad 1000 ml Aqua bidestilata, upravení pH na 6,8. Takto byl připraven zásobní roztok PBS, který byl 10krát koncentrovanější než ředěný PBS používaný při imunohistochemické analýze.

BSA (bovine serum albumin)

5 g BSA + 95 g ředěný PBS, rozpustit, rozdělit po 1 ml a zmrazit

4.2.3 Postup

1. Prvním úkonem experimentu byla fixace tkáňových řezů, která byla provedena jejich vložením do roztoku acetonu při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut.
2. Řezy se nechaly 15 minut oschnout.
3. Poté bylo použito olejové pero (PAP pen). Pomocí něj byly kolem namontovaných tkání nanoseny hydrofobní prstence, které zabránily ztrátám a zředění důležitých reagenčních činidel.
4. Následovalo umístění vzorků na 5 minut do PBS.
5. Vlastní imunohistochemická analýza byla zahájena nanesením odtučněného sušeného mléka v PBS (0,5 g sušeného mléka do 10 g ředěného PBS), aby došlo k zablokování nesespecifických vazebných míst.
6. Po 30 minutách byly preparáty opláchnuty v PBS.
7. Dalším blokačním krokem byla 15minutová inkubace s roztokem anti-avidinu (Vector Laboratories; USA).
8. Dále se vzorky vložily do PBS (2x5 minut).
9. Poté proběhl opět 15minutový blokační krok, tentokrát s roztokem anti-biotinu.
10. Řezy byly opláchnuty v PBS.
11. Následovala hodinová inkubace s primární protilátkou při pokojové teplotě zakončená zopakováním kroku 8.

12. Dalším úkonem bylo provedení kroku 5 a 6.
13. Potom byla nanášena sekundární protilátka a inkubace probíhala 30 minut.
14. Byl znovu proveden krok 4.
15. Následující 15minutové působení 3% roztoku H₂O₂ (8 ml H₂O₂ + 70 ml ředěného PBS) způsobilo zablokování endogenní peroxidázy.
16. Zopakoval se krok 8.
17. Další fází experimentu bylo nanášení ABC (12 µl činidla A + 12 µl činidla B do 600 µl ředěného PBS; Vector Laboratories; USA), který byl připraven po kroku 13. Inkubace probíhala 30 minut.
18. Zopakoval se krok 8.
19. Poté byl přidán roztok diaminobenzidinu – DAB (12 µl DAB do 600 µl buffer; Dako; Dánsko), který se nechal působit 45 vteřin a umožnil vizualizaci.
20. Řezy byly opláchnuty nejprve v PBS a následně v destilované vodě.
21. Dalším krokem bylo barvení řezů uskutečněné pomocí bazického barviva hematoxylinu (5 vteřin).
22. Experiment pokračoval umístěním vzorků na 1 minutu pod tekoucí vodu z kohoutku.
23. Následovalo opláchnutí řezů v acetonu.
24. Dále proběhlo projasňování a odvodňování vzorků v aceton-xylenu (10:1, 3 minuty), aceton-xylenu (1:10, 3 minuty) a v xylenu (3x2 minuty).
25. Na závěr byly pomocí montovacího média Eukittu vytvořeny trvalé preparáty.
26. Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu byla realizována pomocí digitální kamery Pixelink PL-A642 (Vitana Corp.; Ottawa, Kanada) a softwaru NIS (Laboratory Imaging; Česká republika).

4.3 Stereologická analýza

Kvantifikace endoteliální exprese endoglinu 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 barvením na endoglin 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 [Nachtigal, 2004 #2248].

4.4 Statistická analýza

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

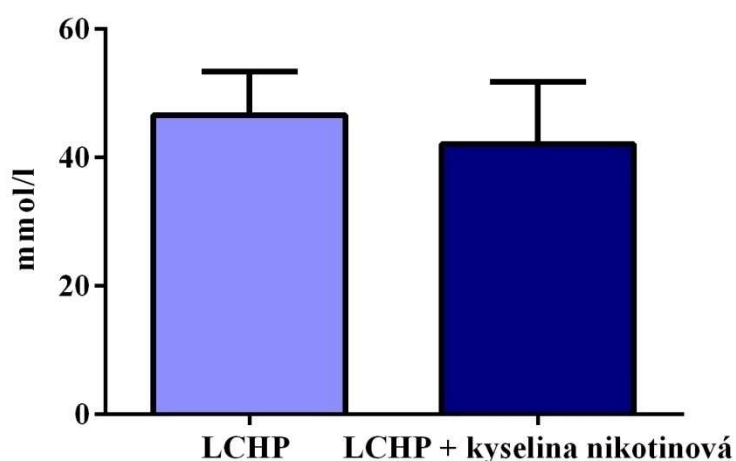
5 VÝSLEDKY

5.1 Biochemická analýza

Podle výsledků biochemické analýzy byly určeny hladiny celkového cholesterolu u studovaných myší. Podávání kyseliny nikotinové nemělo žádný efekt na hladiny celkového cholesterolu ($46,61 \pm 2,792$ mmol/l vs. $42,11 \pm 3,946$ mmol/l, viz Graf 1).

Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší.

Čtyřtýdenní podávání kyseliny nikotinové statisticky významně neovlivnilo hladiny celkové koncentrace cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou myší ($P = 0,3762$).

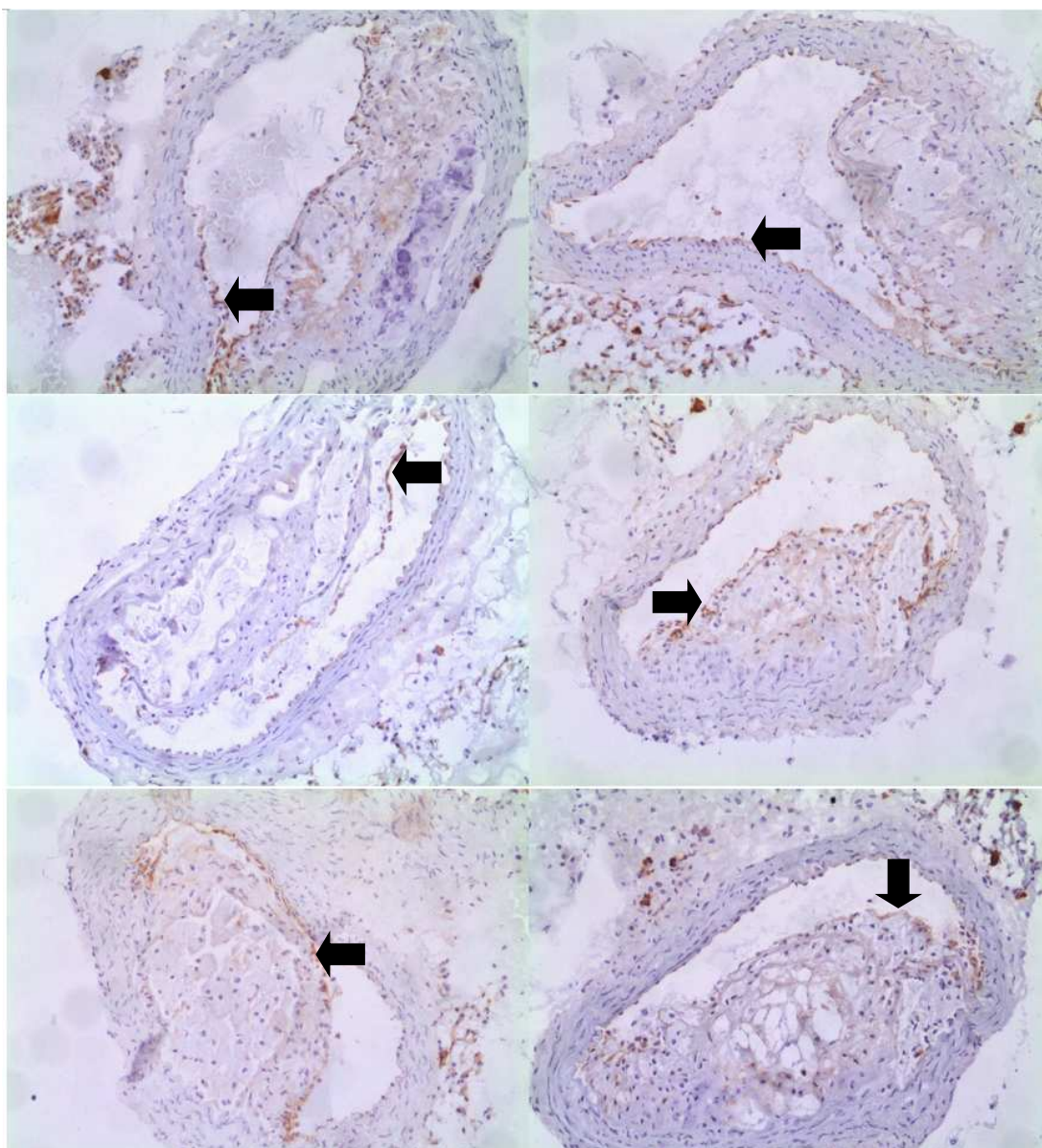


5.2 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemická detekce endoglinu byla provedena na 96 sklíčkách s řezy z obou skupin myší. Expres endoglinu byla nalezena u všech zvířat v obou skupinách. Pozitivita byla viditelná pouze na cévním endotelu. Expres se objevovala zejména na endotelu aterosklerotických plátů, kdežto intaktní endotel byl mnohem slaběji pozitivní na expresi endoglinu. Prohlížením všech řezů jsme nepozorovali nějaké zásadní rozdíly v expresi endoglinu mezi studovanými skupinami (Obrázek 11 a 12). Všechny 96 řezů bylo použito pro stereologickou analýzu.

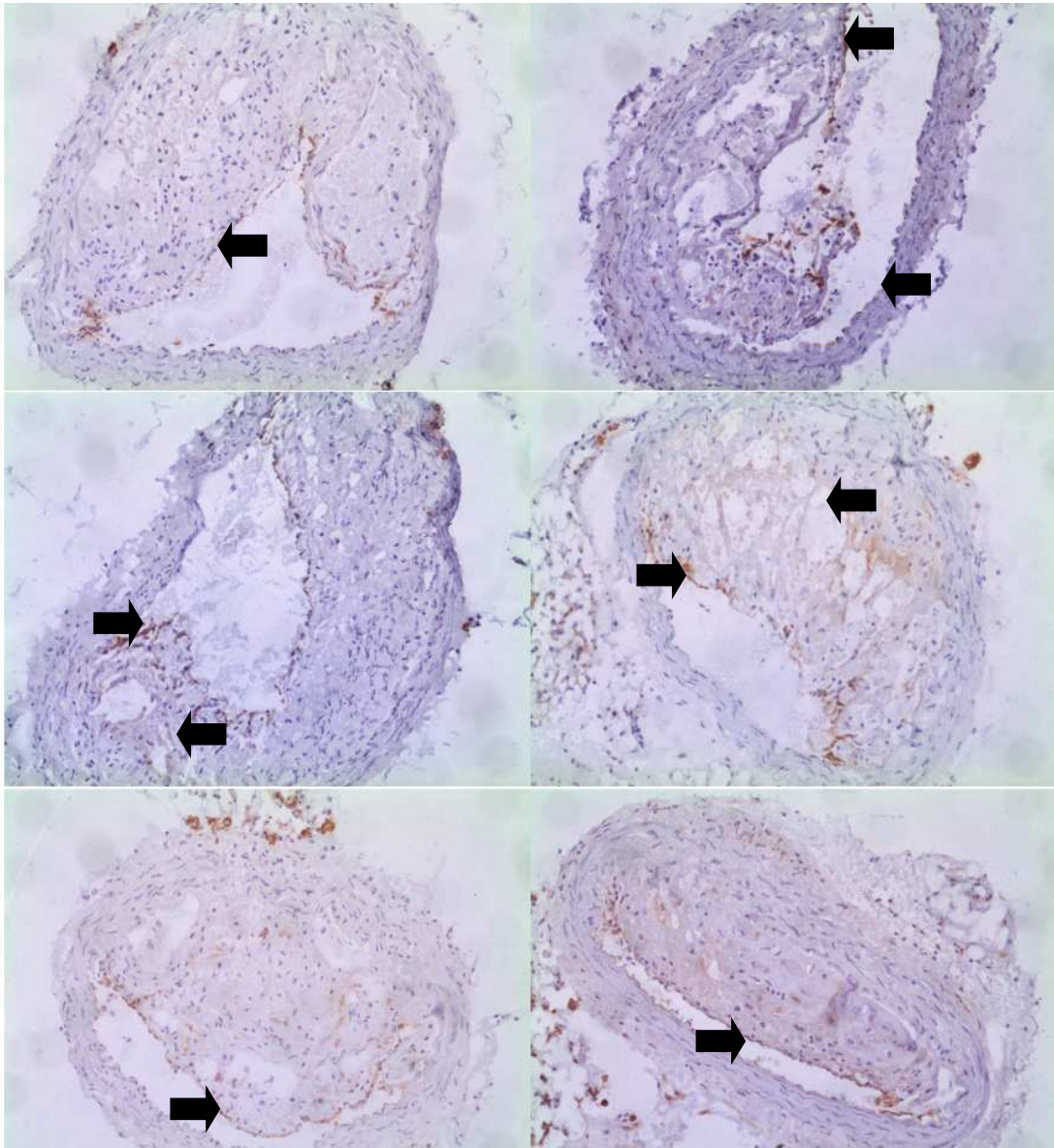
Obrázek 11: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení endoglinu u LCHP skupiny zvířat.

Hnědá barva znamená pozitivní reakci na endoglin zejména na povrchu aterosklerotických plátů (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.



Obrázek 12: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení endoglinu u LCHP + kyselina nikotinová skupiny zvířat.

Hnědá barva znamená pozitivní reakci na endoglin zejména na povrchu aterosklerotických plátů (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

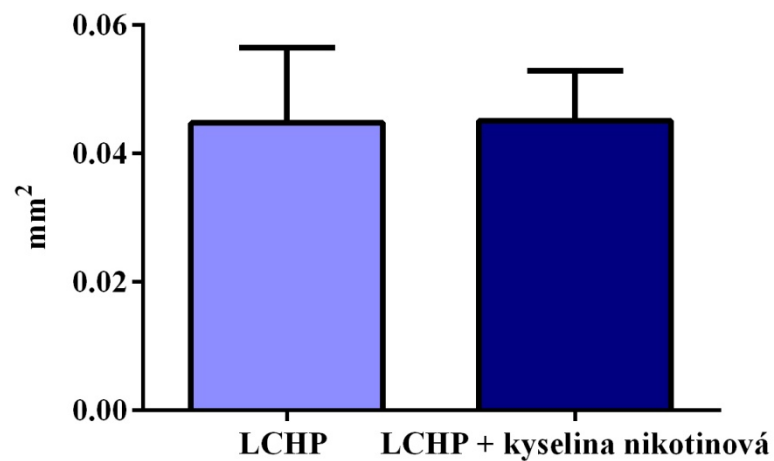


5.3 Stereologická analýza endoteliální exprese endoglinu v arteria brachiocephalica

Stereologická analýza neprokázala statisticky významné rozdíly v expresi endoglinu u myší, kterým byla podávána LCHP dieta ve srovnání se skupinou, kde byla přidávána kyselina nikotinová ($0,04475 \pm 0,0048 \text{ mm}^2$ vs. $0,04513 \pm 0,003189 \text{ mm}^2$, viz Graf 2).

Graf 2: Stereologická analýza exprese endoglinu v arteria brachiocephalica.

Podávání LCHP diety s přidavkem kyseliny nikotinové nevedlo k signifikantnímu ovlivnění exprese endoglinu na cévním endotelu ve srovnání s LCHP skupinou ($P = 0,9485$).



6 DISKUSE

Během výzkumu epidermálního a destičkového růstového faktoru (EGF – epidermal growth factor, PDGF – platelet-derived growth factor) ve fibroblastech potkanů byl v roce 1983 objeven nový cytokin schopný transformovat fibroblasty. TGF- β (transforming growth factor- β) byl poprvé izolován z neoplastické myší tkáně vyvinuté působením Moloney sarcoma viru, a proto byl původně pojmenován SGF (sarcoma growth factor) [54]. Během následujících let byla rodina TGF- β detailně zkoumána. Zahrnuje několik členů včetně BMPs (bone morphogenic proteins), AMH (anti-Muellerian hormone), aktiviny, myostatiny a další proteiny kontrolující buněčné dělení, diferenciaci, migraci, adhezi, organizaci a programovanou buněčnou smrt (apoptózu) [55]. V současnosti je v lidském těle potvrzena existence tří izoform TGF- β a to TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3.

Endoglin (CD 105) je homodimerní transmembránový glykoprotein, který interaguje s TGF- β 1 a TGF- β 3, ale pouze pokud je asociován s T β R β II [56]. Endoglin není pravým receptorem, ale významně ovlivňuje aktivity TGF- β R β II [57], ALK-1 [57, 58] a ALK-5 [57].

Exprese endoglinu byla prokázána několika studii v aterosklerotických plátech u lidí i laboratorních zvířat. U myší je exprese endoglinu téměř výlučně lokalizovaná v lumenálních endoteliálních buňkách u zdravých i aterosklerózou zasažených cév, ale v buňkách hladké svaloviny nebyla zjištěna [31, 33, 34].

Exprese endoglinu endotelovými buňkami aorty může souviset s plazmatickými hodnotami cholesterolu a rovněž se stádiem aterosklerózy (endotel nezasazený aterosklerózou a endotel kryjící aterosklerotický plát). Podávání potravy s vysokým obsahem cholesterolu myšímu kmeni C57BL/6J vedlo ke zvýšení hladin celkového cholesterolu spolu se zvýšenou expresí endoglinu v endotelu aorty. U těchto myší nebyly detekovány aterosklerotické léze [33]. Naproti tomu, u myší apoE/LDLR deficientních způsobily zvýšené hladiny celkového cholesterolu a již progredující aterosklerotické léze sníženou expresí endoglinu, Smad2 (má protizánětlivé účinky a přispívá ke stabilizaci aterosklerotických plátů) [39, 59] a Smad1 proteinů v pokročilých aterosklerotických plátech aorty. V důsledku toho se předpokládá, že endoglin a s ním související signalizace jsou během progredující aterosklerózy inhibovány [34].

Expresi endoglinu v arteria brachiocephalica dosud nebyla zkoumána. Pro studium experimentální aterosklerózy u myší je doporučen aortální sinus. Po několika letech se zjistilo, že se v arteria brachiocephalica mohou vyvinout pokročilá stádia aterosklerózy, a dokonce může dojít k rupturám plátů [60].

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit expresi endoglinu v arteria brachiocephalica po podání diety s nízkým obsahem sacharidů a vysokým množstvím proteinů (LCHP), která byla vyvinuta jako více aterogenní a prozánětlivá alternativa k „Western-type diet“ [61]. Dále jsme se chtěli zabývat možným ovlivněním těchto myší po léčbě kyselinou nikotinovou.

Imunohistochemické analýzy dokázaly expresi endoglinu u všech myší pouze na cévním endotelu, zejména na endotelu aterosklerotických plátů, tedy v souladu s předchozími výsledky detekujícími expresi endoglinu u myší krmených aterogenní dietou [31].

Účinky niacinu na hladiny plazmatických lipoproteinů byly poprvé popsány před více než padesáti lety. Podávání terapeutických dávek niacinu snižuje hladiny LDL cholesterolu (LDL-C), VLDL cholesterolu (VLDL-C) a lipoprotein(a) (Lp[a]). Navíc se jedná o léčivo se schopností zvyšovat HDL cholesterol (HDL-C) až o 25 %, tedy nejvíce ze všech dosud známých hypolipidemik [62]. Niacin byl prvním léčivem s prokázanou schopností redukovat kardiovaskulární morbiditu a mortalitu u pacientů s prodělaným infarktem myokardu [63]. V minulosti byla léčba přípravky s niacinem značně omezena kvůli výskytu častých a velmi nepříjemných nežádoucích účinků (nejvýznamnějším je kožní flush). Byl proto nahrazen nově objevenými hypolipidemiky statiny, které jsou velmi účinné a pacienti je dobře snášejí [64].

Výsledky této diplomové práce prokázaly, že léčba kyselinou nikotinovou nemá vliv na hladiny celkového cholesterolu. Bylo také zjištěno, že kyselina nikotinová je schopna ovlivnit zánětlivé markery, aniž by se snížila koncentrace plazmatických lipidů. Rovněž byly prokázány účinky tohoto léčiva na prozánětlivé markery zahrnující C-reaktivní protein (CRP), adiponektin, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [63]. Nicméně analýzy této práce nezaznamenaly žádné změny v expresi endoglinu po léčbě kyselinou nikotinovou.

Výsledky této práce dokládají, že kyselina nikotinová v použitém designu experimentu aterosklerotický proces neovlivňuje. V budoucnu tedy bude nezbytné design experimentu změnit a postupy zopakovat, aby se zjistilo, zda toto léčivo působí na zánětlivý stav a progresi lézí u tohoto experimentálního modelu [65].

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nastavit metodiku na detekci exprese endoglinu v arteria brachiocephalica u myší krmených dietami LCHP a LCHP s přídavkem kyseliny nikotinové.

Kyselina nikotinová neovlivnila hladiny celkového cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou myší.

Expresi endoglinu byla detekována u obou skupin myší pouze na cévním endotelu, zejména na endotelu aterosklerotických plátů.

Imunohistochemické barvení a stereologická analýza neprokázaly žádný vliv léčby kyselinou nikotinovou na expresi endoglinu.

Výsledky uvedené v této práci dokládají, že toto léčivo aterosklerotický proces neovlivňuje v daných experimentálních podmínkách. V budoucnu bude nezbytné design experimentu změnit a postupy zopakovat, aby se zjistilo, zda kyselina nikotinová působí na zánětlivý stav a progresi lézí u tohoto experimentálního modelu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČIHÁK R. *Anatomie 3*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1997. 655 s. ISBN 80-7169-140-2. Stavba cév, s. 69.
- [2] PAULSEN, D. F. *Histologie a buněčná biologie*. 1. vyd. Jinočany: Nakladatelství H & H Vyšehradská, s.r.o., 2004. 433 s. ISBN 80-7319-024-9. Kapitola 11: Oběhový systém, s. 157-162.
- [3] KONRÁDOVÁ, V. – UHLÍK, J. – VAJNER, L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: Nakladatelství H & H Vyšehradská, s.r.o., 2000. 291 s. ISBN 80-86022-80-3. Kardiovaskulární systém, s. 115-122.
- [4] BULTAS, J. Endoteliální dysfunkce. In *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční, Symposium 2*. Praha: Nakladatelství Galén, 1999. 127 s. ISBN 80-7262-026-6. Sekce I, s. 11-24.
- [5] VOJÁČEK, J. – FIEDLER, J. Úloha endotelu. In *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 276 s. ISBN-10 80-247-0501-X. Kapitola 2, s. 22-30.
- [6] KEANEY, J. F. Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. 2000, roč. 21, s. 99-166.
- [7] POLEDNE, R. Ateroskleróza. In OŠŤÁDAL, B. – VÍZEK, M. - a kol. *Patologická fyziologie srdce a cév*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2003. 168 s. ISBN 80-246-0597-X. Kapitola 4, s. 47-49.
- [8] STARY, H. C. – CHANDLER, A. B. – GLAGOV, S. - et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. *Circulation*. 1994, roč. 89, s. 2462-2478.
- [9] STARY, H. C. – BLANKENHORN, D. H. – CHANDLER, A. B. - et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1992, roč. 12, s. 120-134.
- [10] NEČAS, E. Ateroskleróza. In *Patologická fyziologie orgánových systémů, Část I*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2006. 379 s. ISBN 80-246-0615-1. Kapitola 2.2.5, s. 162-166.
- [11] SILBERNAGL, S. Srdce a krevní oběh. In *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001. 390 s. ISBN 80-7169-968-3. Kapitola 7, s. 236-239.

- [12] ALAN, D. – OŠŤÁDAL, P. Patogeneze aterosklerózy. In VOJÁČEK, J. – MALÝ, M. - a kol. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. ISBN-10 80-247-0501-X. Kapitola 3, s. 39-40.
- [13] ŠTEINER, I. – POVÝŠILOVÁ, V. Patologie oběhového ústrojí. In *Speciální patologie*. 2. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2007. 430 s. ISBN 978-80-7262-494-2 (Galén), ISBN 80-246-1442-7 (Karolinum). Kapitola 1, s. 1-3.
- [14] KUMAR, V. – ABBAS, A. K. – FAUSTO, N. – MITCHELL, R. N. *Robbins Basic Pathology*. 8. vyd. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 960 s. ISBN 978-1-4160-2973-1. Chapter 10: The Blood Vessels, s. 343-351.
- [15] KULIČ, F. Ateroskleróza. In VLČEK, J. – FIALOVÁ, D. - a kol. *Klinická farmacie I*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010. 368 s. ISBN 978-80-247-3169-8. Kapitola 5.3, s. 108-110.
- [16] MACEK, K. - RUDOLF, K. Ischemická choroba srdeční. In VLČEK, J. - FIALOVÁ, D. - a kol. *Klinická farmacie I*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010. 368 s. ISBN 978-80-247-3169-8. Kapitola 5.4, s. 117.
- [17] TILŠER, I. Diabetes mellitus. In VLČEK, J. - FIALOVÁ, D. - a kol. *Klinická farmacie I*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010. 368 s. ISBN 978-80-247-3169-8. Kapitola 6.1, s. 192.
- [18] SILBERNAGL, S. Metabolismus. In *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001. 390 s. ISBN 80-7169-968-3. Kapitola 8, s. 246, 247.
- [19] JÍLEK, P. *Základy imunologie*. 1. vyd. Praha: Ewopharma, 2008. 79 s. ISBN 978-80-254-2422-3. Kapitola 1: Struktura imunitního systému, s. 9, 13.
- [20] MALÍK, M. - ČEŠKA, R. - a kol. Kardiologie. In *Interna*. 1. vyd. Praha: Triton, 2010. 876 s. ISBN-13 978-80-7387-423-0. Kapitola 4.2, s. 62-63.
- [21] GARCÍA-POZO, L. – MIQUILENA-COLINA, M. E. – LOZANO RODRÍGUEZ, T. – GARCÍA-MONZÓN, C. Endoglin: structure, biological functions and role in fibrogenesis. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008, roč. 100, s. 355-360.
- [22] BERNABEU, C. – CONLEY, B. A. – VARY, C. P. H. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem*. 2007, roč. 102, s. 1375-1388.

- [23] LLORCA, O. – TRUJILLO, A. – BLANCO, F. J. – BERNABEU, C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol.* 2007, roč. 365, s. 694-705.
- [24] DE VIVO, A. – BAVIERA, G. – GIORDANO, D. - et al. Endoglin, PIGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008, roč. 87, s. 837-842.
- [25] GOUGOS, A. – LETARTE, M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1990, roč. 265, s. 8361-8364.
- [26] BELLÓN, T. – CORBÍ, A. – LASTRES, P. - et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol.* 1993, roč. 23, s. 2340-2345.
- [27] BLANCO, F. J. – GRANDE, M. T. – LANGA, C. - et al. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res.* 2008, roč. 103, s. 1383-1392.
- [28] CONLEY, B. A. – SMITH, J. D. – GUERRERO-ESTEO, M. – et al. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2000, roč. 153, s. 323-335.
- [29] LÓPEZ-NOVOA, J. M. – BERNABEU, C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010, roč. 299, s. H959-H974.
- [30] BOURDEAU, A. – DUMONT, D. J. – LETARTE, M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 1999, roč. 104, s. 1343-1351.
- [31] NACHTIGAL, P. – VEČEŘOVÁ, L. – POSPÍŠILOVÁ, N. – et al. Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol.* 2009, roč. 24, s. 1499-1506.
- [32] NACHTIGAL, P. – ZEMÁNKOVÁ, L. – PFEIFEROVÁ, J. – STRÁSKÝ, Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012, roč. 224, s. 4-11.
- [33] NACHTIGAL, P. – POSPÍŠILOVÁ, L. – JAMBOROVÁ, G. – et al. Endothelial expression of endoglin in normocholesterolemic and hypercholesterolemic

- C57BL/6J mice before and after atorvastatin treatment. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007, roč. 85, s. 767-773.
- [34] STRÁSKÝ, Z. - VEČEŘOVÁ, L. – RATHOUSKÁ, J. – et al. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J.* 2011, roč. 75, s. 1747-1755.
- [35] RATHOUSKÁ J. - VEČEŘOVÁ L. – STRÁSKÝ Z. – et al. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 2011, roč. 64, s. 53-59.
- [36] JERKIC, M. – RIVAS-ELENA, J. V. – PRIETO, M. – et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 2004, roč. 18, s. 609-611.
- [37] TOPORSIAN, M. – GROS, R. – KABIR, M. G. – et al. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res.* 2005, roč. 96, s. 684-692.
- [38] SANTIBANEZ, J. F. – LETAMENDIA, A. – PEREZ-BARRIOCANAL, F. – et al. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF- β signaling. *J Cell Physiol.* 2007, roč. 210, s. 456-468.
- [39] BOT, P. T. – HOEFER, I. E. – SLUIJTER, J. P. - et al. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke.* 2009, roč. 40, s. 439-447.
- [40] DAUGHERTY, A., Mouse model of atherosclerosis. *Am J Med Sci.* 2002, roč. 323, s. 3-10.
- [41] PAIGEN, B. – MORROW, A. – BRANDON, C. - et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis.* 1985, roč. 57, s. 65-73.
- [42] LIAO, F. – ANDALIBI, A. – DE BEER, F. C. - et al. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B- like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest.* 1993, roč. 91, s. 2572-2579.
- [43] MAHLEY, R. W. – INNERARITY, T. L. – RALL, S. C. Jr. - WEISGRABER, K. H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984, roč. 25, s. 1277-1294.
- [44] ZHANG, S. H. – REDDICK, L. R. – PIEDRAHITA, J. A. – MAEDA, N. Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Science.* 1992, roč. 258, s. 468-471.

- [45] NAKASHIMA, Y. – PLUMP, A. S. – RAINES, E. W. - et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994, roč. 14, s. 133-140.
- [46] ISHIBASHI, S. – GOLDSTEIN, J. L. – BROWN, M. S. - et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 1994, roč. 93, s. 1885-1893.
- [47] YAMAMOTO, T. – DAVIS, C. G. – BROWN, M. S. - et al. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell.* 1984, roč. 39, s. 27-38.
- [48] BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. *Science.* 1996, roč. 272, s. 685-689.
- [49] CALIGIURI, G. - LEVY, B. - PERNOW, J. - et al. Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, roč. 96, s. 6920-6924.
- [50] OPLETALOVÁ, V. Antihyperlipidemika. In *Farmaceutická chemie III.* Praha: Nakladatelství Karolinum, 2008. 117 s. ISBN 978-80-246-0195-3. Kapitola 1.4, s. 43.
- [51] VAVERKOVÁ, H. Fixní kombinace ER niacin/laropiprant. *Remedia.* 2010, roč. 20, s. 214-222.
- [52] ABCAM. *IHC paraffin staining protocol* [online]. 2007 [cit. 2013-04-12]. <<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11384>>.
- [53] VECTOR LABORATORIES. *Vectastain Elite ABC Kit* [online]. 2011 [cit. 2013-04-12]. <<http://www.vectorlabs.com/Protocols/VECTASTAIN/PK-6100.pdf>>.
- [54] ASSOIAN, R. K. – KOMORIYA, A. – MEYERS, C. A. – MILLER, D. M. – SPORN, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983, roč. 258, s. 7155-7160.
- [55] MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1983, roč. 67, s. 753-791.
- [56] LASTRES, P. – LETAMENDÍA, A. – ZHANG, H. - et al. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol.* 1996, roč. 133, s. 1109-1121.
- [57] GUERRERO-ESTEO, M. – SANCHEZ-ELSNER, T. – LETAMENDIA, A. – BERNABEU, C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact

- with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* 2002, roč. 277, s. 291-297.
- [58] LEBRIN, F. – GOUMANS, M. J. – JONKER, L. – et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004, roč. 23, s. 4018-4028.
- [59] DICHIARA, M. R. – KIELY, J. M. – GIMBRONE, M. A. Jr. – et al. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *J Exp Med.* 2000, roč. 192, s. 695-704.
- [60] BOND, A. R. – JACKSON, C. L. The fat-fed apolipoprotein E knockout mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture. *J Biomed Biotechnol.* 2011, roč. 2011, s. 379069.
- [61] KOSTOGRYS, R. B. – FRAN CZYK-ZAROW, M. – MASLAK, E. – et al. Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR(-/-)). *Atherosclerosis.* 2012, roč. 223, s. 327-331.
- [62] RUPARELIA, N. – DIGBY, J. E. – CHOUDHURY, R. P. Effects of niacin on atherosclerosis and vascular function. *Curr Opin Cardiol.* 2011, roč. 26, s. 66-70.
- [63] YU, B. L. – ZHAO, S. P. Anti-inflammatory effect is an important property of niacin on atherosclerosis beyond its lipid-altering effects. *Med Hypotheses.* 2007, roč. 69, s. 90-94.
- [64] BORGES, J. L. [Drug combinations: statins and niacin]. *Arq Bras Cardiol.* 2005, roč. 85 Suppl 5, s. 36-41.
- [65] NACHTIGAL, P. – SEMECKÝ, V. – KOPECKÝ, M. – et al. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract.* 2004, roč. 200, s. 219-229.