

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

**Sledování exprese vybraných markerů funkce endotelu u
myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu**

Study of the expression of some markers of endothelial function
in mice with high levels of soluble endoglin

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce:
Hradec Králové, 2015

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD
Bc. Sabina Škodová

„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:

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, milou spolupráci a cenné rady při psaní této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Katedry biologických a lékařských věd za jejich ochotu, pomoc a čas, který mi věnovali. V neposlední řadě také rodině a přátelům za podporu a trpělivost.“

Abstrakt

Bc. Sabina Škodová

Sledování exprese vybraných markerů funkce endotelu u myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu.

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratorních metodách

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo popsat změny exprese endotelové NO syntázy a ICAM-1 ve stěně aorty u myši s nízkou a vysokou hladinou solubilního endoglinu (Sol-Eng⁺). Snahou bylo tedy porovnání exprese obou markerů jak z hlediska intenzity, tak z hlediska plochy barvení. K tomuto účelu jsme použili imunohistochemické metody s detekcí ve fluorescenčním mikroskopu.

Metody: Ke studii byly použity transgenní myši s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu (Sol-Eng⁺). Samice myši byly od svých šesti měsíců věku krmeny dietou bohatou na tuky, která obsahovala 1,25% cholesterolu a 40% tuku (Research Diets, Inc, USA). Touto dietou byly myši krmeny následující tři měsíce. Stejně staré samice myši ze stejného vrhu s nízkou hladinou solubilního endoglinu v plazmě byly použity jako kontrolní skupina. Expresse eNOS a ICAM-1 byla na řezech aorty myši stanovena pomocí fluorescenční imunohistochemie.

Výsledky: Imunohistochemická analýza prokázala slabou expresi eNOS u obou skupin myši, a to pouze na cévním endotelu. Expresse ICAM-1 byla velmi podobná u obou skupin myši a prokázána byla pouze na cévním endotelu. V porovnání s expresí eNOS byla expresse ICAM-1 silnější, pravidelnější a zaujímala větší plochu cévního endotelu.

Závěr: Expresse eNOS a ICAM-1 byla pozorována u obou skupin myši pouze na cévním endotelu. Expresse těchto molekul se liší tím, že expresse ICAM-1 byla v porovnání s expresí eNOS výraznější. Mezi Sol-Eng⁺ skupinou a kontrolní skupinou myši nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly v intenzitě nebo lokalizaci exprese obou molekul. Tyto výsledky neprokázali indukci endotelové dysfunkce u myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu z hlediska pozorování exprese eNOS a ICAM-1.

Abstract

Bc. Sabina Škodová

Study of the expression of some markers of endothelial function in mice with high levels of soluble endoglin.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical laboratory technician

Background: The aim of this diploma thesis was to describe changes of expression eNOS and ICAM-1 in the wall of aorta of mice with low and high levels of soluble form of endoglin (*Sol-Eng+*). The attempt was to compare expression of both markers from the position of intensity and also from the position of area of staining. For this purpose we used immunohistochemical methods with detection in fluorescent microscope.

Methods: For this study were used transgenic mice with high levels of human soluble endoglin (*Sol-Eng+*). Female mice were fed from their six months of age with high fat diet, which contained 1.25% of cholesterol and 40% of fat. The mice were fed with this diet for another three months. The same old female mice from the same brood with low level of soluble endoglin in plasma were used as a control group. The expression of eNOS and ICAM-1 was defined on sections of aorta of the mice with fluorescent immunohistochemistry.

Results: Immunohistochemical analysis proved weak expression of eNOS in both groups of mice, and only on vascular endothelium. The expression of ICAM-1 was very similar in both groups of mice and it was proved only on vascular endothelium. The expression of ICAM-1 was stronger, more regular and it occupied bigger area of vascular endothelium in comparison with expression of the eNOS.

Conclusion: The expression of eNOS and ICAM-1 was observed in both groups of mice only on vascular endothelium. The expression of these molecules is different in the expression of ICAM-1 and eNOS, the expression of ICAM-1 was stronger. No significant differences in the intensity or localization of the expression of both molecules were observed between *Sol-Eng+* group and the group of control mice. These results did not prove induction of endothelial dysfunction at the mice with high levels of soluble endoglin from the point of view of expression eNOS and ICAM-1.

Obsah

1	Úvod	8
2	Histologie cév	9
2.1	Specifická struktura cév	10
2.1.1	Arterie	10
2.1.2	Vény.....	11
2.1.3	Kapiláry	13
3	Endotel a jeho fyziologická funkce	14
4	Endotelová dysfunkce	17
5	Adhezní molekuly	20
5.1	Intracelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1)	21
5.1.1	Funkce ICAM-1 a regulace její exprese	21
6	Syntáza oxidu dusnatého	23
6.1	Endotelová NO syntáza.....	23
6.1.1	Struktura eNOS a její signalizace	23
6.1.2	eNOS a oxidační stres.....	24
7	Endoglin	27
7.1	Funkce endoglinu	27
7.2	Solubilní endoglin	29
7.2.1	Myší model s vysokými hladinami solubilního endoglinu.....	30
8	Imunohistochemické metody.....	31
8.1	Přímá a nepřímá imunohistochemie.....	31
8.2	EnVision® a ImmPress™ metodika.....	32
8.3	ABC (Avidin-Biotin-Complex) metodika.....	34
9	Cíl práce, zadání práce	36
10	Experimentální část.....	37
10.1	Použitá zvířata a jejich předepsaná dieta	37

10.1.1	Zvířata	37
10.2	Koncentrace solubilního endoglinu v plazmě	37
10.3	Metodika imunohistochemie	38
11	Výsledky	41
12	Diskuse.....	54
13	Závěr	56
14	Seznam zkratk	57
15	Seznam použitých obrázků	59
16	Seznam použité literatury	61

1 Úvod

Endotel je velmi důležitým orgánem, který se mimo to, že vytváří bariéru mezi proudící krví a cévní stěnou, podílí také na udržení cévní homeostázy díky expresi velkého množství látek.

Za fyziologických podmínek zajišťuje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí, trombogenezí a fibrinolýzou, hraje také důležitou roli pro zajištění prostupu imunitních buněk do tkání a při regulaci proliferace a diferenciací cévních buněk. Tuto jeho fyziologickou funkci ovšem může ovlivňovat řada faktorů, ať už mechanických, chemických nebo fyzikálních. Následkem může být funkční poškození endotelu, a tedy vznik endotelové dysfunkce.

Řada těchto faktorů vedoucích k rozvoji endotelové dysfunkce souvisí mimo jiné také s nezdravým životním stylem a stále zvyšujícím se stresem. Rozvoj endotelové dysfunkce se dnes popisuje jako jistý předstupeň vzniku aterosklerózy a následného rozvoje kardiovaskulárních onemocnění, která jsou příčinou až 50% úmrtí v České republice.

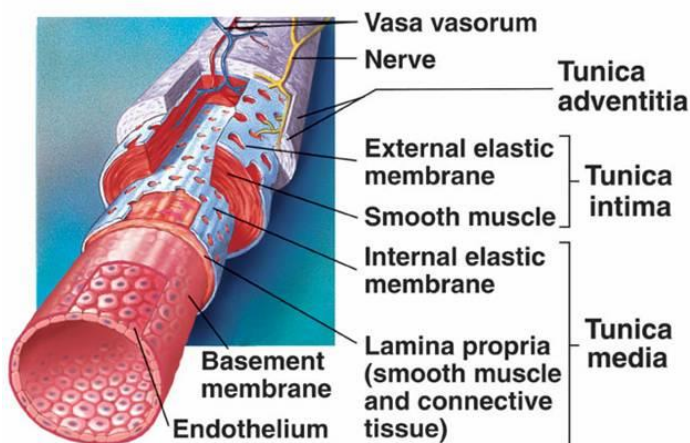
Pro diagnostiku a zhodnocení stavu endotelové dysfunkce je mimo jiné možno použít laboratorní stanovení molekul, které endotel exprimuje na svém povrchu. V této diplomové práci jsme se zaměřili na detekci adhezivní molekuly ICAM-1 a enzymu, který se nazývá endotelová syntáza oxidu dusnatého, u myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu. Již dřívější studie prokázaly, že endotelová dysfunkce je charakteristická snížením exprese endotelové syntázy oxidu dusnatého endotelovými buňkami a naopak zvýšenou expresí adhezních molekul, tedy i molekuly ICAM-1.

Díky stanovení těchto markerů endotelové dysfunkce je tedy možné tento stav nejen diagnostikovat, ale určit i stupeň endotelové dysfunkce. Také je možné je využít k přesnějšímu pochopení mechanismů, ke kterým při tomto stavu dochází.

2 Histologie cév

Všechny cévy sestávají ze tří základních vrstev. Tyto vrstvy se nazývají tunica intima, tunica media a tunica adventitia (viz obr. 1).

- Tunica intima tvoří vnitřní vrstvu stěny cévy. Tato vrstva je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk, bazální laminou, na které endotelové buňky leží, a subendotelovou vrstvou (Konrádová et al. 2000). Tvar endotelových buněk je podlouhlý a vyznačuje se svou nepravidelností. Uspořádání buněk je podélné ve směru proudící krve (Karásek a Vaverková 2004). Řídké kolagenní vazivo pak vytváří subendotelovou vrstvu.
- Tunica media je tvořena především buňkami hladké svaloviny, které produkují mezibuněčnou hmotu, elastickými a retikulárními vlákny. Díky elastickým vláknům zde vznikají blanky s otvory, které slouží k průchodu živin do vnitřní části stěny cévy. Tyto elastické struktury vytváří **membrana elastica interna** a **membrana elastica externa**. Tyto dvě membrány oddělují tuto vrstvu od tunica intima a tunica adventitia (Konrádová et al. 2000). Přítomnost hladké svaloviny dovoluje měnit průsvit cév, regulovat průtok krve a tlak a zajišťuje cévě určitou pružnost (Dylevský 2009).
- Tunica adventitia tvoří kolagenní a elastická vlákna, která jsou longitudinálně uspořádaná. Mohou se zde objevovat i buňky hladké svaloviny, fibroblasty a adipocyty. Cévy, které dosahují průměru většího než 1 milimetr, obsahují v této vrstvě vlastní systém cév (vasa vasorum), které slouží k zásobení cévní stěny živinami (Konrádová et al. 2000). V této vrstvě také probíhají autonomní nervy, které zajišťují inervaci cévní hladké svaloviny (Dylevský 2009).



Obr. 1 Popis cévní stěny. Převzato a upraveno z http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Blood_Vessels.html. [cit. 2015-03-09].

2.1 Specifická struktura cév

Jednotlivé cévy krevního řečiště se liší svou velikostí a také zastoupením jednotlivých vrstev. Cévy se tedy dělí na:

- Arterie
- Vény
- Kapiláry

2.1.1 Arterie

Arterie slouží k vedení krve do tkání a dají se podle jejich struktury a průměru dělit na arterioly, arterie svalového typu a arterie elastického typu.

Arterioly (s průsvitem od 0,5 mm)

Tunica intima je tvořena endotelovými buňkami a tenkou subendotelovou vrstvou, v menších arteriolách může chybět membrana elastica interna.

Tunica media tvoří 1-5 vrstev hladkých svalových buněk, membrana elastica externa chybí

Tunica adventitia je arteriol je velmi tenká

Arterie svalového typu (arterie malé a střední velikosti)

Tunica intima je shodná s tunica intima arteriol, pouze subendotelová vrstva je silnější a membrana elastica interna je lépe vyvinutá.

Tunica media je tvořena až 40 vrstvami buněk hladké svaloviny a větším množstvím elastických a retikulárních vláken.

Tunica adventitia tvoří převážně kolagenní a elastická vlákna. Je zde i malé množství fibroblastů a tukových buněk

Arterie elastického typu (velké arterie, např. aorta)

Tunica intima je zde výraznější, sestává z endotelových buněk a silnější subendotelovou vrstvou s elastickými vlákny.

Tunica media je tvořena hlavně hladkými svalovými buňkami, dále je zde přítomno velké množství elastických blanek s otvory (fenestrace).

Tunica adventita je velmi tenká, tvořená převážně kolagenními a elastickými vlákny (Konrádová et al. 2000).

2.1.2 Vény

Hlavním rozdílem mezi arteriemi a vénami spočívá v tom, že vény mají větší lumen a tenčí cévní stěnu. Tunica media je tenčí a je v ní přítomno menší množství buněk hladké svaloviny. Tunica adventitia je naopak širší (viz obr. 2). Vény dolních končetin jsou vybaveny chlopněmi, které jsou tvořeny dvěma poloměsíčitými záhyby tunica intima, a slouží k nasměrování toku krve k srdci (Ulfig 2011).

Venuly (průměr 0,2-1mm)

Tunica intima tvoří endotel s velmi tenkou subendotelovou vrstvou.

Tunica media je tenká s malým množstvím hladkých svalových buněk.

Tunica adventitia je nejsilnější vrstvou tvořenou vazivem, které je bohaté na kolagenní vlákna.

Malé a střední větvy (průměr 1-9mm)

Tunica intima je velmi podobná venulám, přítomno je zde také malé množství chlopní

Tunica media je tvořena plochými svazky buněk hladké svaloviny, přítomna jsou také retikulární a elastická vlákna

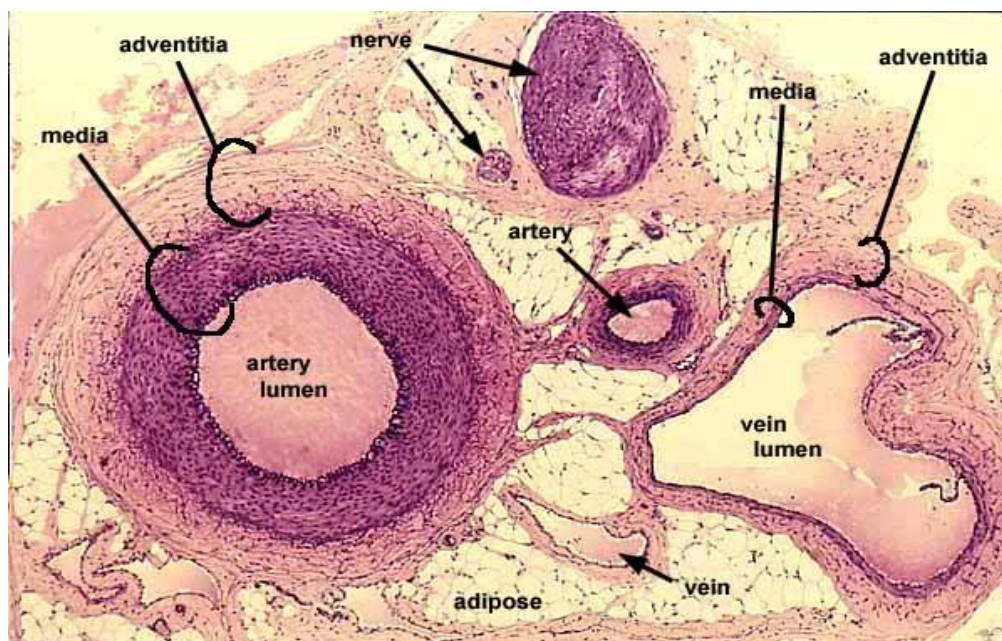
Tunica adventita je velmi dobře vyvinutá, přítomná jsou především kolagenní vlákna.

Velké větvy

Tunica intima je charakteristická silnější subendotelovou vrstvou než předchozí větvy, a tato subendotelová vrstva zde vytváří chlopně

Tunica media je tenká, tvořená pouze několika vrstvičkami hladkých svalových buněk

Tunica adventita je nejsilnější vrstvou s longitudinálně uspořádanými buňkami hladké svaloviny (Konrádová et al. 2000).



Obr. 2 Rozdílná stavba cévní stěny u arterie a větvy. Převezato a upraveno z <http://medicalschoool.tumblr.com/post/19840017791/cross-section-of-an-artery-and-vein>. [cit. 2015-03-09].

Poznámka: Arterie mají oproti vénám tenčí lumen a silnější cévní stěnu. Tunica media arterií je silnější a jejich tunica adventitia naopak užší než tyto vrstvy u vény.

2.1.3 Kapiláry

Jedná se o jednoduché trubice, které jsou vystlány endotelem, a slouží k propojení venózního a arteriálního oběhového systému. Průměr kapilár je přibližně 7-9 μm a dosahují délky maximálně do 1 mm. Stěnu kapilár obklopují buňky s četnými dlouhými výběžky vytvářející vlastní bazální membránu. Tyto buňky se nazývají pericyty. Jsou charakteristické tím, že mají kontraktilní schopnost, díky čemuž dokáží regulovat průsvit kapilár.

Podle struktury endotelové výstelky a bazální membrány se kapiláry rozdělují do tří skupin:

Kapiláry se souvislou výstelkou (somatického typu):

se souvislou endotelovou výstelkou a bazální membránou, převážně v mozku, plicích, svalové tkáni.

Kapiláry fenestrované (viscerálního typu):

v cytoplazmě endotelu se nachází charakteristické otvory (fenestrace), které jsou přepaženy diafragmou. Tyto kapiláry jsou přítomné převážně v orgánech s rychlou výměnou látek mezi krví a tkáněmi, jako např. střevní sliznice a endokrinní žlázy.

Kapiláry sinusoidní:

u tohoto typu kapilár není bazální membrána souvislá a sinusoidní kapiláry se také vyznačují nepravidelným lumen. Pro tento typ kapilár jsou charakteristické četné póry a fenestrace, které se nachází ve výběžcích endotelových buněk. Sinusoidní kapiláry jsou přítomné především v kostní dřeni a játrech (Konrádová et al. 2000).

3 Endotel a jeho fyziologická funkce

Endotel je tvořen jednou vrstvou buněk, která vystýlá vnitřní povrch cévního lumen. Tvar těchto buněk je podlouhlý a vyznačuje se svou nepravidelností. Uspořádání buněk je podélné ve směru proudící krve.

Je již dlouho známým faktem, že endotel je jakousi buněčnou bariérou oddělující krevní proud od cévní stěny a zajišťuje nesmáčivý povrch vnitřní části cévy. V posledních letech však bylo prokázáno, že se jedná o orgán zajišťující celou řadu funkcí (Karásek a Vaverková 2004).

Endotel hraje klíčovou roli v průchodnosti cév, v udržení a kontrole optimálního krevního toku a výši krevního tlaku. Endotelové buňky leží na rozhraní cirkulující krve a hladké svaloviny cévní stěny a kontrolují vazodilataci a vazokonstrikci, srážecí procesy a fibrinolýzu a další důležité procesy pomocí uvolňování různých humorálních působků (Karetová 2002).

Další fyziologickou funkcí endotelu je zajistit řízenou propustnost mezi krví a okolními tkáněmi. Nutná je kontrola prostupu jak buněčných elementů, tak nebuněčných krevních komponent. U prostupu nebuněčných komponent se využívají paracelulární i transcelulární transportní mechanismy. Pro vstup buněčných elementů, např. leukocytů, se uplatňují adhezivní molekuly (VCAM-1, ICAM-1, P- a E-selektin), které endotel exprimuje na svém povrchu (Karásek a Vaverková 2004).

Pro zajištění kontroly optimálního proudění krve cévou je důležité, aby pro zachování rovnováhy endotel produkoval látky s vazodilatačním i vazokonstrikčním účinkem.

Mezi nejdůležitější látky s vazodilatačním účinkem patří oxid dusnatý (NO) a prostacyklin.

- **NO** je syntetizován endotelovou syntázou oxidu dusnatého (eNOS) z L-argininu (Ward a Linden 2010). Tímto mechanismem je zajištěno, že si céva udrží dostatečný průsvit, pokud jí protéká krev. Pokud proud krve ustane a endotelová výstelka je narušena, dojde ke zvýšení přítomnosti vazokonstrikčních působků (Štejf 2007). NO má výrazný vazodilatační a protizánětlivý účinek. Uplatňuje se při inhibici apoptózy endotelových buněk, inhibici exprese adhezivních

molekul, tlumí adhezi a agregaci trombocytů (Karásek a Vaverková 2004). Dále NO brání oxidaci LDL cholesterolu (Davignon a Ganz 2004).

- **Prostacyklin** je syntetizován pomocí enzymu cyklooxygenázy z kyseliny arachidonové (Ward a Linden 2010). Prostacyklin je uvolňován za stejných situací jako NO, a jejich účinky se navzájem zesilují (Karásek a Vaverková 2004).

Po nalezení NO a popsání jeho vazodilatační funkce byly objeveny i látky vyznačující se funkcí opačnou – vazokonstrikcí (Karetová 2002) Mezi tyto látky patří tromboxan 2 (TXA₂), který vzniká působením enzymu cyklooxygenázy, a kyslíkové radikály, které mimo jiné vznikají také při syntéze TXA₂ (Štejfa 2007).

Ovšem mezi nejdůležitější látky, které spadají do této skupiny, patří endotelin – 1 (ET-1).

- **Endotelin – 1** je peptid, který je tvořen výhradně endotelovými buňkami (Karetová 2002). Vyznačuje se silným vazokonstrikčním účinkem a z endotelu je uvolňován za přítomnosti řady dalších látek, jako jsou např. angiotenzin II, antidiuretický hormon nebo noradrenalin. Ke zvyšování jeho hladiny může také docházet při přítomnosti nemoci nebo při hypoxii (Ward a Linden 2010).

Endotel se podílí také na kontrole fibrinolýzy. Pro tento proces je nezbytný plasmin, který slouží ke štěpení fibrinu. Endotel produkuje tkáňový aktivátor plasminogenu (t-PA), který je nezbytný pro přeměnu cirkulujícího plasminogenu na plasmin. Zároveň však také produkuje inhibitor tohoto aktivátoru (PAI-1). Endotel syntetizuje a produkuje tyto dvě látky v různém poměru a tím zajišťuje fyziologický průběh fibrinolýzy.

Endotel se může podílet i na reparativních procesech a angiogenezi. Kontrolu těchto pochodů ve stěně cévy má na starost řada cytokinů a růstových faktorů endotelového původu. Mezi ně se řadí například transformující růstový faktor beta (TGF-β), interleukin-1, destičkový růstový faktor a další. Tyto látky slouží ke stimulaci

růstu buněk hladké svaloviny cévy a podporují jejich migraci do subendotelového prostoru. Velmi významný je zde také NO, který naopak brání proliferaci buněk hladké svaloviny, a tím zamezuje zbytnění cévní stěny (Karásek a Vaverková 2004).

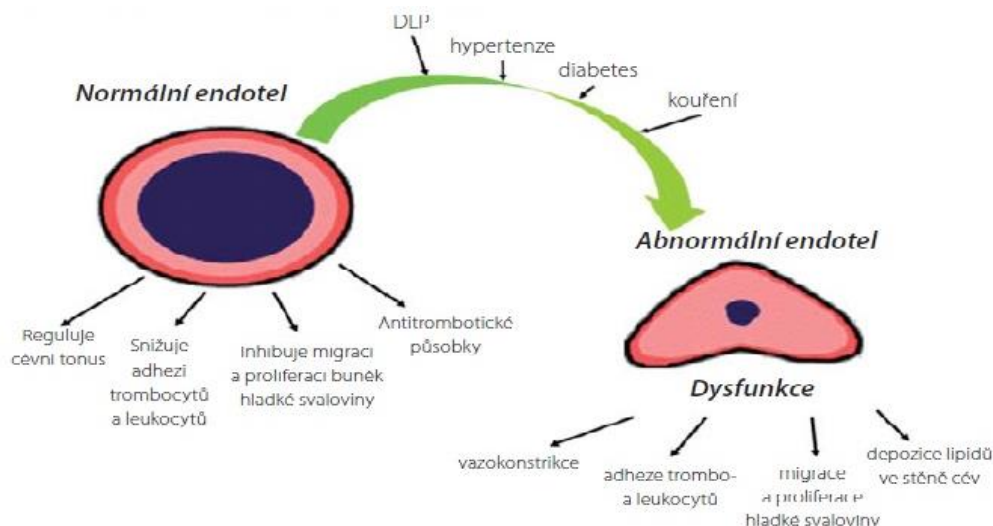
4 Endotelová dysfunkce

Endotelová dysfunkce by se dala charakterizovat jako funkční poškození endotelu, kdy dochází ke zvýšení propustnosti cévní stěny a ztrátě rovnováhy mezi produkcí vazodilatačních a vazokonstrikčních faktorů a dále látek, které inhibují nebo podporují srážecí procesy krve (Karásek a Vaverková 2004).

Endotelová dysfunkce může být lokální nebo generalizovaná. Nejčasnějším projevem je snížená biologická dostupnost NO způsobená sníženou expresí eNOS, což se projeví hlavně snížením vazodilatace, zvýšenou tvorbou adhezních molekul jako jsou VCAM-1, ICAM-1, P- a E-selektin a dalších stavů, za které NO zodpovídá (Davignon a Ganz 2004). Výsledkem je navození podmínek, které působí hlavně ve prospěch zvýšené konstrikce cév, tvorbě trombů a díky zvýšené propustnosti endotelu a zvýšené tvorbě adhezních molekul je umožněn prostup pro chemické substance – hlavně lipidy, ale i pro buněčné elementy- např. lymfocyty a monocyty.

Důsledkem endotelové dysfunkce je na začátku zúžení průsvitu cév, po čase však díky zvýšené aktivitě lymfocytů, trombocytů a monocytů spojené s nesprávnou funkcí endotelu, dochází k aktivaci proliferačních procesů v cévní stěně a k ireverzibilní změně lumina cév (Kölbel 2011).

K vzniku a rozvoji endotelové dysfunkce mohou přispívat stavy, jako je diabetes mellitus a přítomnost glykovaných LDL (lipoproteiny o nízké hustotě), přítomnost oxidovaných LDL, kouření, stres, hypertenze a oxidační stres (viz obr. 3). Kromě těchto faktorů mohou vést k endotelové dysfunkci také genetické poruchy srážení a fibrinolýzy.



Obr. 3 Endotelové dysfunkce. Převzato a upraveno z <http://www.medicinapraxi.cz/pdfs/med/2011/03/05.pdf>. [cit. 2015-03-09].

V následujícím textu jsou krátce popsány některé faktory, které přispívají k rozvoji endotelové dysfunkce:

- **Diabetes mellitus (DM)**, především II. typu, je charakteristický chronicky zvýšenými hladinami glukózy a tvorbou glykovaných proteinů. Při glykaci dochází k reakci glukózy s volnými aminoskupinami aminokyseliny lysinu. Tato glykace nevede pouze ke ztrátě funkčnosti proteinů, ale podporuje i jejich oxidaci a oxidaci LDL. Glykované LDL patří mezi agresivní cytotoxické substance přispívající k rozvoji endotelové dysfunkce.
- **Stres** podporuje lipolýzu, případně glykogenolýzu, a vede ke zvýšení hladin glukózy a volných mastných kyselin v krvi. Tento stav má také negativní vliv na funkci endotelu.
- **Proces srážení krve**, především faktory, které vedou k aktivaci tohoto procesu a agregaci trombocytů, mohou také podpořit vznik endotelové dysfunkce. Zdravý endotel tvoří tzv. ochranou stěnu a brání aktivaci a adhezi trombocytů. Při endotelové dysfunkci, především vyvolané hypercholesterolémií, dochází k vazbě trombocytů k endotelovým buňkám díky přítomnosti adhezivní

molekuly P- selektinu. Při aktivaci trombocytů dochází k uvolnění látek, které jsou uloženy v jejich granulích – tromboxan, endotelin, destičkový růstový faktor (PDGF), cytokiny, arachidonová kyselina a další. Při chronickém trvání tohoto stavu dochází k trvalému poškození endotelu (Kostner 2003).

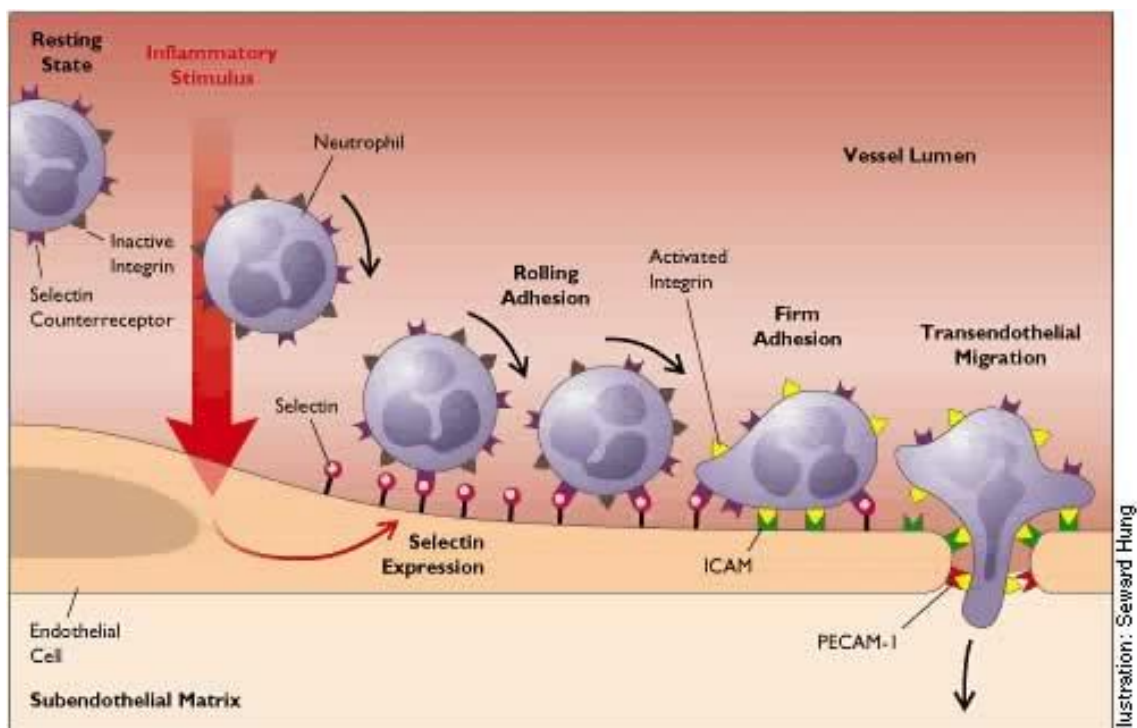
- **Kouření** je jednou z nejzávažnějších příčin kardiovaskulárních chorob (KVCH). Mezi klíčové patologické procesy spojené s kouřením patří endotelová dysfunkce, protrombotické stavy, rozvoj zánětu, změna metabolismu lipidů a hypoxie (Kim et al. 2014). Při kouření cigaret dochází k nadměrné zátěži organismu volnými radikály. Kromě toho má nikotin obsažený v cigaretovém kouři vazokonstrikční účinky a oxid uhelnatý, který je také součástí cigaretového kouře, má ischemický efekt (Kostner 2003).
- **Hypertenze** způsobuje odlupování buněk endotelu a v důsledku toho endotel ztrácí svou celistvost. Dojde ke ztrátě selektivní bariéry oddělující krevní proud od cévní stěny, což může vést ke zvýšení pravděpodobnosti vniknutí monocytů (Ošťádal a Vízek 2003).

5 Adhezní molekuly

Adhezní molekuly jsou glykoproteiny exprimované na buněčném povrchu. Slouží ke zprostředkování kontaktu mezi dvěma buňkami nebo mezi buňkou a mimobuněčnou hmotou. Jsou nezbytné pro regulaci imunitní odpovědi buňky a zajištění migrace imunitních buněk z krevního řečiště do místa zánětu (Hua 2013).

Migrace buněk probíhá v několika krocích (viz obr. 4):

1. Nejprve dochází k tzv. kutálení leukocytů po endotelu. Následně díky působení molekul selektinu dochází k přilnutí leukocytů k endotelu.
2. Pomocí chemokinů dochází k aktivaci integrinů přítomných na leukocytárním povrchu.
3. Následuje upevnění vazby leukocytů na endotel díky adhezivním molekulám ICAM-1 a VCAM-1.
4. Leukocyty prostupují skrz endotel do subendotelového prostoru (Lawson a Wolf 2009).

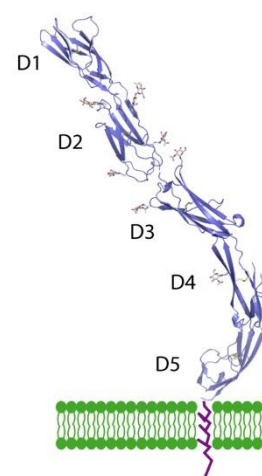


Obr. 4 Schéma přestupu leukocytů přes endotel do subendotelového prostoru. Převzato a upraveno z https://perso.curie.fr/Patricia.Bassereau/PhD_Streicher.pdf. [cit. 2015-03-09].

Tyto molekuly hrají také významnou roli v patofyziologii kardiovaskulárních onemocnění. Vzniku některých KVCH, jako je např. ateroskleróza nebo ischemická choroba srdeční, předchází rozvoj endotelové dysfunkce, stavu, který je mimo jiné charakteristický zvýšenou tvorbou adhezních molekul (Golias et al. 2007).

5.1 Intracelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1)

Tato molekula, exprimovaná na povrchu endotelových buněk, spadá do imunoglobulinové rodiny adhezních molekul. Jedná se o transmembránový protein složený z extracelulární části, která tvoří pět Ig domén, a tyto domény jsou stabilizovány pomocí disulfidických můstků. Extracelulární část je tvořena 453 aminokyselinami, které jsou převážně hydrofobní. Následuje hydrofobní transmembránová doména a krátká intracelulární doména, kterou tvoří 28 aminokyselin (Wolf a Lawson 2012), (viz obr. 5). Přítomné extracelulární domény jsou důležité pro upevnění vazby leukocytů na endotel (Rahman a Fazal 2009).



Obr. 5 Struktura ICAM-1: Převzato a upraveno z http://www.jin-lab.org/doku.php?id=labmembers:intercellular_adhesion_molecule-1._binding_to_cellular_and_viral_ligands_with_implications_for_biotherapeutics. [cit. 2015-03-09].

5.1.1 Funkce ICAM-1 a regulace její exprese

ICAM-1 je potřebný k upevnění vazby leukocytů na endotel a umožňuje jejich přestup do subendotelového prostoru. Aby k tomuto prostupu leukocytů mohlo dojít, je nezbytná vazba ICAM-1 na jeho ligand (Macías et al. 2003). Tyto ligandy se nazývají β_2 integriny a jsou exprimovány na povrchu leukocytů (Golias et al. 2007).

ICAM-1 exprimují na svém povrchu především leukocyty, fibroblasty a endotelové buňky. Za normálních okolností je tato exprese nízká, ale působením různých stimulačních podnětů může docházet k jejímu nárůstu (Hua 2013).

Zvýšená exprese ICAM-1 endotelovými buňkami byla prokázána v přítomnosti prozánětlivých cytokinů. Do této kategorie cytokinů spadá především tumor

nekrotizující faktor- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ) a interleukin 1 (IL-1) (Golias et al. 2007).

Dále bylo zjištěno, že za zvýšenou expresi ICAM-1 může také přítomnost trombinu, lipopolysacharidu, zvýšené hladiny glukózy v krvi a VEGF. Zvýšení endotelové exprese ICAM-1 byla také prokázána u oxidačního stresu (Rahman a Fazal 2009). Naopak tvorba ICAM-1 je tlumena glukokortikoidy a interleukinem 4 (IL-4) (Wolf a Lawson 2012).

Vzhledem k tomu, že všechny výše uvedené stavy, které podporují zvýšenou tvorbu ICAM-1, se uplatňují také při rozvoji endotelové dysfunkce, a ta je mimo jiné charakteristická zvýšenými hladinami adhezních molekul, používá se laboratorní stanovení míry exprese ICAM-1 na povrchu endotelových buněk k diagnostice endotelové dysfunkce (Steyers a Miller 2014).

6 Syntáza oxidu dusnatého

Jsou známy tři izoformy tohoto enzymu. Neurální NO syntáza (nNOS), indukibilní NO syntáza (iNOS) a endotelová NO syntáza (eNOS). Všechny tři tyto izoformy katalyzují stejným mechanismem přeměnu L-argininu a kyslíku (O_2) na L-citrulin a NO (Mattila a Thomas 2014). Pro úspěšný průběh této reakce je nezbytná přítomnost dostatečného množství substrátu, tedy L-argininu, a mnoha kofaktorů, jako je nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD) a tetrahydrobiopterin (BH_4) (Förstermann 2010).

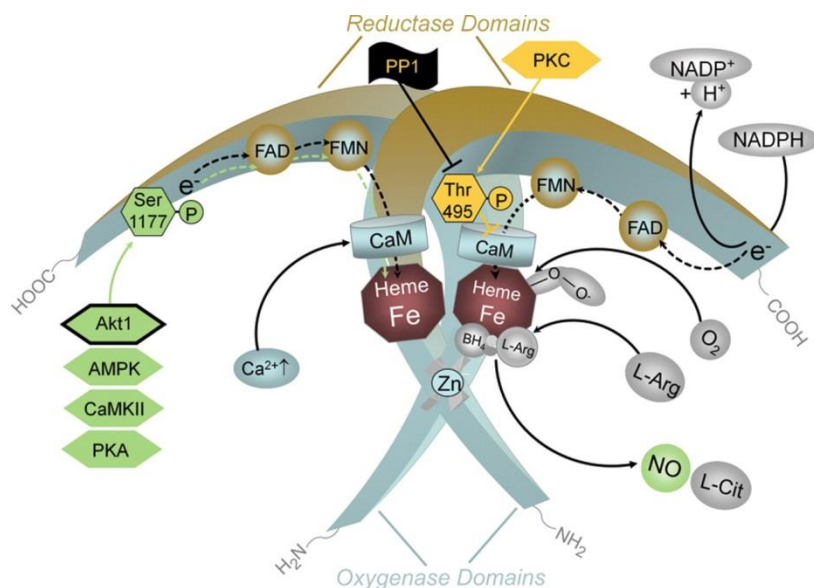
6.1 Endotelová NO syntáza

Endotelová NO syntáza je hlavním zdrojem produkce NO, který je nezbytný pro zajištění normální funkce kardiovaskulárního systému (Andrew a Mayer 1999). Hlavním zdrojem této izoformy jsou endotelové buňky. Její přítomnost byla kromě těchto buněk prokázána i u kardiomyocytů nebo např. u krevních destiček (Förstermann a Sessa 2012).

6.1.1 Struktura eNOS a její signalizace

Endotelová NO syntáza je dimer složený ze dvou stejných monomerních podjednotek. Každý z monomerů tvoří dvě domény. Jednou z těchto domén je reduktáza, která obsahuje vazebná místa pro NADPH, FMN a FAD. Druhá doména je tvořena oxidázou, která obsahuje vazebná místa pro hemové železo, BH_4 a L-arginin (Dias et al. 2011). Tyto dvě domény pojí proteinové vlákno (viz obr. 6).

Díky tomu, že reduktázová doména katalyzuje dehydrogenaci NADPH, dochází k tvorbě elektronů potřebných pro syntézu NO (Davignon a Ganz 2004). Elektrony přestupují přes FAD a FMN a díky proteinovému vláknu na hem přítomný na oxidázové doméně. Zde je substrát (L-arginin) oxidován na L-citrulin a NO (Förstermann a Sessa 2012). Tento přenos elektronů je aktivován vazbou kalmodulinu na jeho vazebné místo přítomné na proteinovém vlákne (Davignon a Ganz 2004).



Obr. 6 Strukturální uspořádání eNOS. Převzato a upraveno z <http://circ.ahajournals.org/content/113/13/1708/F2.expansion.html>. [cit. 2015-03-09].

Enzymatická aktivita eNOS je tedy regulována hladinou vápenatých iontů (Ca^{2+}) a molekulou zvanou kalmodulin, který váže Ca^{2+} a podílí se na regulačních procesech, v nichž je Ca^{2+} zapojen (Förstermann a Sessa 2012). Pokud je hladina intracelulárního Ca^{2+} zvýšená, dochází také ke zvýšení aktivity eNOS. Aktivitu eNOS mohou nicméně ovlivňovat i jiné podněty, které nesouvisí s hladinami intracelulárního vápníku. Mezi tyto podněty patří například zvýšené smykové napětí proudící krve, estrogény nebo VEGF. Aktivace touto cestou je zprostředkována fosforylací tohoto enzymu (Förstermann 2010). K této fosforylaci dochází v místě serinového zbytku 1177 a je nutná přítomnost tzv. proteinů tepelného šoku Hsp90 (z anglického názvu Heat shock proteins 90) a proteinkinázy Akt. Místo fosforylace je velmi důležité, protože pokud je eNOS fosforylována např. v místě threoninu 495, dochází k její inaktivaci (Davignon a Ganz 2004). K inaktivaci eNOS může různými mechanismy docházet také při oxidačním stresu.

6.1.2 eNOS a oxidační stres

Oxidační stres je stav popisovaný jako nerovnováha mezi vznikem volných radikálů a schopností organismu neutralizovat jejich škodlivý účinek pomocí antioxidantů. V důsledku toho dochází ke zvýšení hladin oxidovaných molekul, které poškozují tkáň, ale také ke snižování biologické dostupnosti NO. Mnoho studií

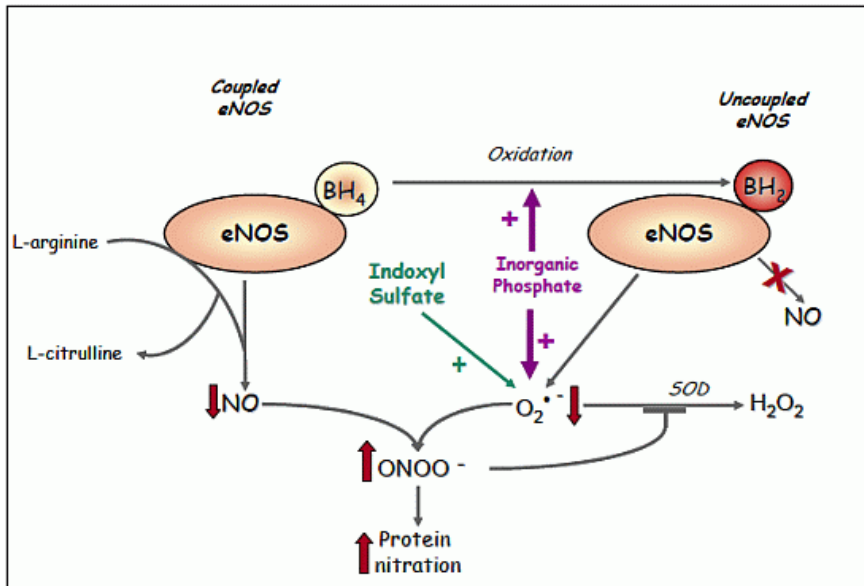
prokázalo, že oxidační stres je zapojen do patogeneze mnoha kardiovaskulárních onemocnění.

U tohoto stavu dochází k tomu, že reaktivní formy kyslíku (ROS, z anglického názvu Reactive oxygen species) mají schopnost poškozovat makromolekuly, tedy DNA, proteiny a lipidy. Pod souhrnné označení ROS spadají jak volné radikály, tak i látky, které volnými radikály nejsou, ale mají charakteristické účinky, které také vedou k rozvoji oxidačního stresu. Jako volný radikál je označena molekula obsahující minimálně jeden nepárový elektron. Do této skupiny patří superoxid radikál ($O_2^{\cdot-}$) a hydroxylový radikál (HO^{\cdot}). Dalšími molekulami spadajícími pod označení ROS jsou peroxid vodíku (H_2O_2), peroxynitrit ($ONOO^-$) a kyselina chlorná ($HOCl$) (Cai a Harrison 2000).

Mezi potenciální zdroje ROS, které jsou nejčastějším předmětem studií zabývajících se kardiovaskulárním systémem, patří mimo jiných enzymů také eNOS (Pennathur a Heinecke 2007). Tento enzym je, jak již bylo řečeno, nezbytný pro tvorbu NO a tato molekula je důležitá pro zachování správné funkce endotelu.

K zajištění správné funkce eNOS je nezbytný její kofaktor BH_4 . Při oxidaci tohoto kofaktoru zapříčiněné $ONOO^-$ vzniká biologicky neaktivní BH_2 (Förstermann a Sessa 2012). Za těchto podmínek tvoří eNOS superoxid a peroxid vodíku (Cai a Harrison 2000). Nenahraditelnost BH_4 byla také prokázána studii, která potvrdily, že množství NO tvořeného pomocí eNOS koreluje s intracelulárními hladinami BH_4 , a snížené hladiny tohoto kofaktoru byly prokázány u pacientů s endotelovou dysfunkcí. K tomu, aby eNOS místo NO vytvářela $O_2^{\cdot-}$ dochází také při spotřebování L-argininu, a nebo nahromaděním endogenního asymetrického dimethylargininu, který se uplatňuje jako inhibitor eNOS (Förstermann a Sessa 2012), (viz obr. 7).

Existují tedy tři způsoby, kterými se eNOS může podílet na oxidačním stresu s následným rozvojem endotelové dysfunkce. V první řadě dochází k poklesu tvorby NO a tím se kromě jiného sníží i ochranná funkce NO před oxidací LDL cholesterolu, dále k tomu, že tento enzym vytváří ve zvýšené míře $O_2^{\cdot-}$, který reaguje s NO za vzniku $ONOO^-$, což prohlubuje oxidační stres. V poslední řadě může docházet k tomu, že část eNOS přítomné na endotelových buňkách produkuje NO a část $O_2^{\cdot-}$. A opět jejich společnou reakcí dochází ke vzniku $ONOO^-$ (Cai a Harrison 2000).



Obr. 7 Narušení funkce eNOS při oxidačním stresu. Převzato a upraveno z <http://www.mdpi.com/2072-6651/6/6/1742>. [cit. 2015-03-09].

7 Endoglin

Endoglin je transmembránový homodimerní glykoprotein, který je tvořen dvěma identickými podjednotkami, které jsou spojeny disulfidickou vazbou. Sestává ze tří domén- dlouhé extracelulární domény, transmembránové domény a krátké intracelulární domény.

Byly identifikovány dvě izoformy endoglinu. Obě izoformy mají společnou schopnost vázat své přirozené ligandy, liší se ale délkou intracelulární domény, stupněm fosforylace a jejich schopností ovlivnit signalizaci TGF- β . Intracelulární doména L-izoformy je tvořena 47 aminokyselinami, zatímco u S-izoformy tuto doménu tvoří pouze 14 aminokyselin (Jang a Choi 2014). L-izoforma (predominantní forma) se vyznačuje proangiogenním efektem a zvyšuje hladiny eNOS, kdežto S-izoforma (minoritní forma) je charakteristická tím, že snižuje expresi eNOS a má antiangiogenní účinky. (López-Novoa a Bernabeu 2010). Také bylo prokázáno, že větší množství S-izoformy vzniká ve stárnoucích endotelových buňkách, což může poukazovat na její roli u KVCH souvisejících se stárnutím a vyšším věkem (Nachtigal et al. 2012).

Endoglin je tvořen převážně buňkami cévního endotelu, ale jeho tvorby jsou schopny i monocyty, fibroblasty a buňky hladké svaloviny cév. Za klidových podmínek je jeho exprese buňkami nízká. K jejímu zvýšení dochází při zánětu tkáně a při stavech spojených s angiogenezí, jako např. hojení poraněné cévy a při cévních nebo nádorových onemocněních. Ke zvýšení exprese endoglinu dochází také při ischemii (López-Novoa a Bernabeu 2010).

7.1 Funkce endoglinu

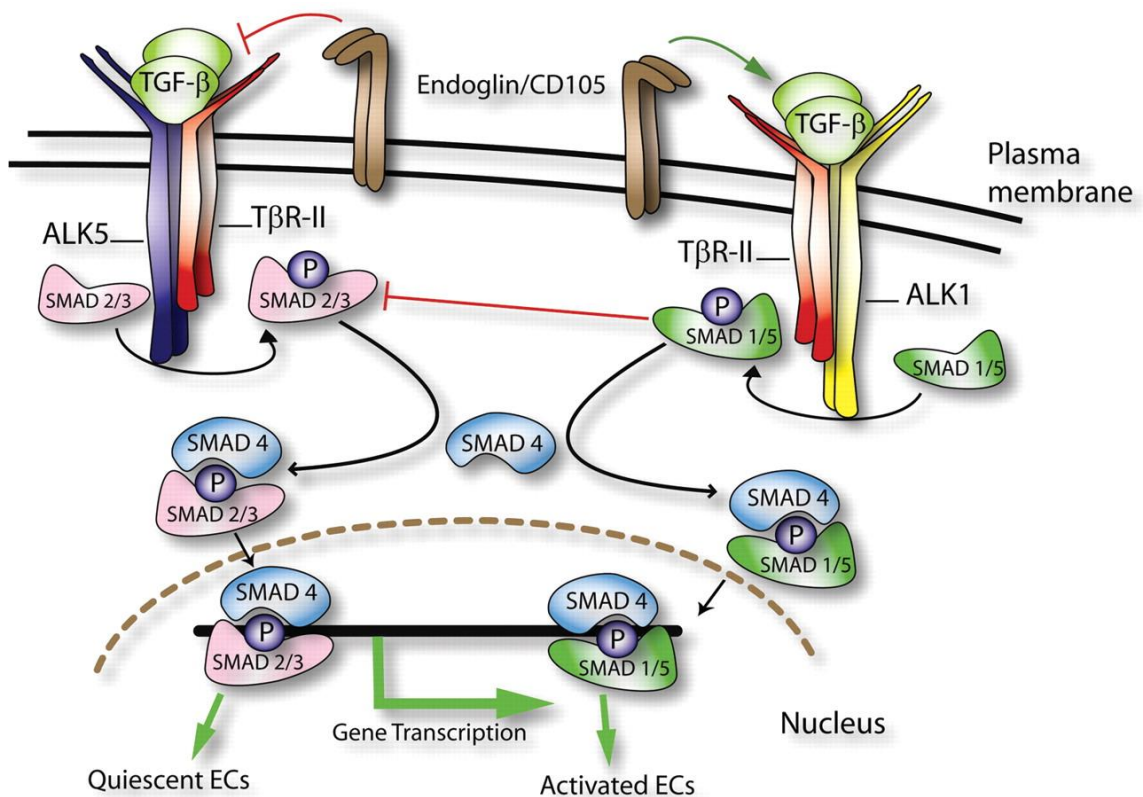
Endoglin hraje důležitou roli pro správný vývoj kardiovaskulárního systému a v udržení cévní homeostázy (Nachtigal et al. 2012). Tato molekula je mimo jiné zapojena do signální dráhy transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β). Signalizace zprostředkovaná tímto cytokinem reguluje proliferaci a diferenciaci buněk, jejich migraci a přežívání. Dále je TGF- β také zodpovědný za regulaci novotvorby cév a cévní přestavby (Bobik 2006).

Signalizace TGF- β cytokinu je umožněna díky jeho vazbě na dva membránové receptory (TGF- β receptor typu I a II). Molekula endoglinu se zde uplatňuje jako tzv.

přídavný receptor, a je schopna regulovat jejich fosforylaci a následně i jejich schopnost signalizace.

Na endotelových buňkách mohou probíhat dvě signalizační cesty, které jsou zprostředkované TGF- β receptorem typu I, a mají vzájemně opačný efekt. Receptor ze skupiny I- ALK 1 (active receptor like kinasa 1) způsobí fosforylaci intracelulárních signalizačních proteinů Smad1 a Smad5. Tyto Smad proteiny přenášejí signál do jádra buňky, kde dochází k ovlivnění genového přepisu a v důsledku toho dochází ke zvýšení proliferace a migrace endotelových buněk. Oproti tomu ALK 5 (active receptor like kinasa 5) slouží k fosforylaci Smad2 a Smad3, což má za následek inhibici buněčné odpovědi (viz obr. 8).

Endoglin je potřebný pro TGF- β /ALK 1 signalizaci a uplatňuje se jako modulátor k udržení rovnováhy mezi TGF- β /ALK 1 a TGF- β /ALK 5 signalizační dráhy tak, že pozitivně ovlivňuje TGF- β /ALK 1 a spíše negativně působí na TGF- β /ALK 5 signalizaci (Fonsatti et al. 2010).

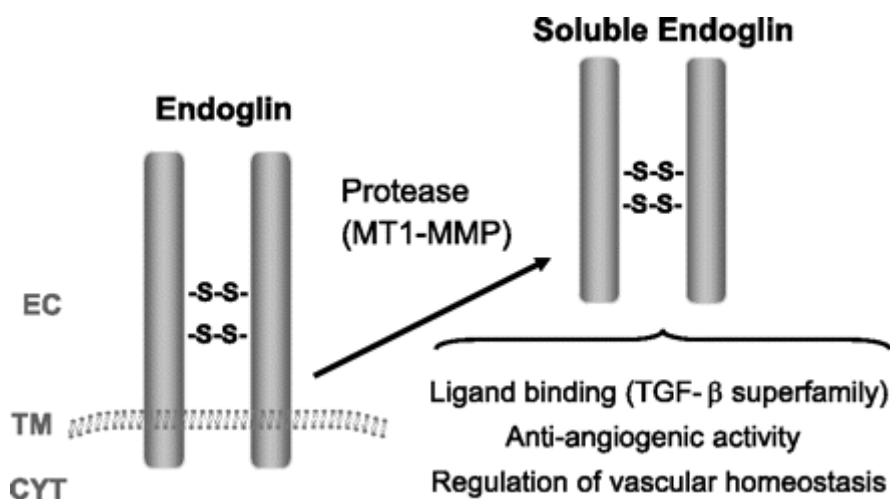


Obr. 8 Schéma předpokládané role endoglinu v TGF- β /ALK-1 a TGF- β /ALK-5 signalizační kaskádě buněk endotelu. Převzato a upraveno z <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/86/1/12>. [cit. 2015-03-09].

Bylo také prokázáno spojení mezi endoglinem a eNOS. Tento fakt byl pozorován na modelu endoglin haploinsuficientních myší, u kterého byly zjištěny snížené hladiny eNOS, což mělo za následek narušenou cévní vazodilataci. Endoglin také stabilizuje molekulu eNOS. Všechna tato fakta poukazují na to, že endoglin má zásadní roli pro správnou funkci endotelových buněk a lokální regulaci cévního tonu (Nachtigal et al. 2012).

7.2 Solubilní endoglin

Solubilní endoglin (sEng) je tvořen pouze extracelulární doménou, která byla z tkáňové formy endoglinu odštěpena působením membránově vázané metaloproteinázy (MMP-14) (Nachtigal et al. 2012), (viz obr. 9). Zvýšené hladiny této solubilní formy byly nalezeny u pacientek trpících preeklampií. Tento stav rozvíjející se v těhotenství je mimo jiné charakteristický přítomností bílkovin v moči, endotelovou dysfunkcí a hypertenzí. (López-Novoa a Bernabeu 2010).



Obr. 9 Vznik solubilního endoglinu pomocí působení metaloproteinázy. Převzato a upraveno z <http://ajpheart.physiology.org/content/299/4/H959/F7>. [cit. 2015-03-09].

Zvýšené hladiny sEng byly prokázány také u hypertenze a diabetes mellitus. Rovněž se předpokládá, že zvýšená hladina sEng může být spojena s endotelovou

dysfunkcí, která se často u těchto stavů rozvíjí. U pacientů s hypercholesterolemií hladiny sEng úzce korelují s hladinami cholesterolu.

Při studiích *in vitro* bylo také prokázáno, že vyšší hladiny sEng zvyšují expresi adhezních molekul, a tím i adhezi leukocytů k endotelu. Předpokládá se, že tento rozvoj endotelové dysfunkce při vysokých hladinách sEng by mohl souviset s jeho schopností zamezovat buněčné signalizaci zprostředkované pomocí TGF- β v cévní stěně (Nachtigal et al. 2012).

7.2.1 Myší model s vysokými hladinami solubilního endoglinu

Jako model s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu slouží transgenní myší model, který má svůj původ v myším kmeni CBAxC57BL/6J. Pro tvorbu takového transgenního organismu se využívají metody genového inženýrství, které slouží k vložení konkrétních genů jednoho organismu do druhého.

V tomto případě došlo k vložení zkráceného genového konstruktů pro endoglin do oplodněných vajíček myšího kmene CBAxC57BL/6J pomocí metody zvané mikroinjekce. Pro získání linie myší se zcela homozygotním genem je nutné další křížení. Gen kódující endoglin byl u tohoto druhu myší prokázán pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) až v jejich sedmé generaci. U této generace byl myším měřen tlak krve a množství bílkovin v moči, aby se potvrdilo, že u těchto myší bylo dosaženo stejných podmínek, které doprovází zvýšené hladiny solubilního endoglinu (hypertenze, přítomnost bílkovin v moči) (Valbuena-Diez et al. 2012).

8 Imunohistochemické metody

Imunohistochemie se využívá k lokalizaci určité molekuly v tkáních a buňkách za použití specifických protilátek. Základním principem je zde reakce antigenu s protilátkou, kdy je možno použít protilátky polyklonální nebo monoklonální.

Polyklonální protilátky jsou charakteristické tím, že reagují s řadou antigenních epitopů, které má na svém povrchu jedna určitá molekula. Zde se velmi často využívá sérum získané z imunizovaného zvířete (Paulík a Bartůňková 2011).

Monoklonální protilátky jsou charakteristické tím, že je vytváří potomstvo, tedy klon, jedné buňky. K jejich tvorbě jsou tedy využívány stejné geny pro imunoglobuliny. Dnes se tyto protilátky připravují metodami hybridomové technologie (Jílek 2014).

8.1 Přímá a nepřímá imunohistochemie

Imunohistochemické metody se dají rozdělit podle počtu kroků na přímé a nepřímé metody (viz obr. 10).

Přímá imunohistochemie

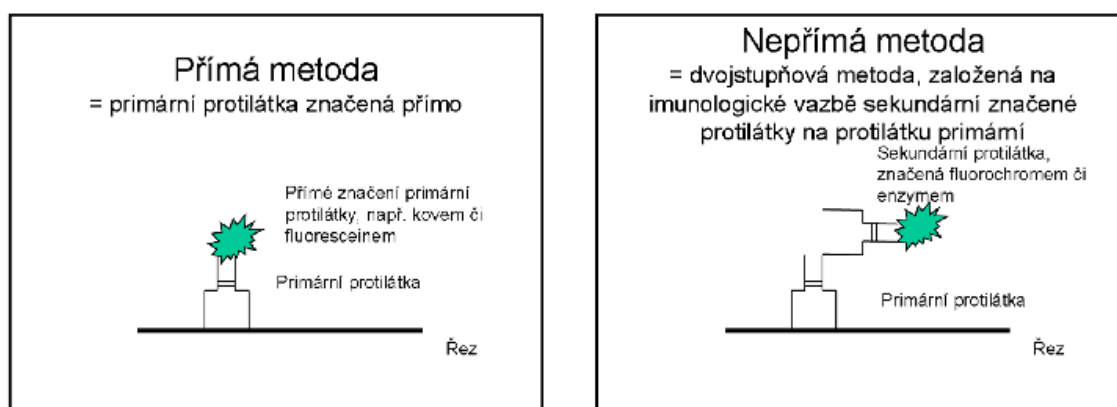
U této metody dochází k přímé detekci antigenu ve tkáni pomocí primární specifické protilátky. Je nutné, aby tato protilátka byla značená. Jako značku je možné použít enzym, kov nebo fluochrom. Následuje detekce vazby primární protilátky na antigen. Tyto metody jsou vhodné především tehdy, pokud je antigen ve tkáni přítomen v dostatečné koncentraci. Výhodou těchto metod je jejich jednoduchost a rychlost. K nevýhodám patří jejich nízká citlivost.

Nepřímá imunohistochemie

Častěji používané a mnohem citlivější jsou nepřímé metody. Dochází zde k tomu, že k neznačené primární protilátce, která se specificky váže na antigen přítomný ve tkáni, se přidává protilátka sekundární. Tato sekundární protilátka musí být schopna specificky reagovat s primární protilátkou a tvořit s ní komplex. Sekundární protilátka je značená

enzymem (křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou), kdy se využívá toho, že po specifické vazbě protilátky na antigen a po přidání enzymatického substrátu dojde k barevné změně, a tím ke zviditelnění reakce. Protilátka může být kromě enzymu značená i fluorochromem, čehož se využívá při fluorescenční mikroskopii. Fluorochrom je molekula schopná absorbovat světlo o určité vlnové délce, a následně emitovat záření o delší vlnové délce. (Brychtová a Hlobilková 2008).

Nevýhodou při použití fluorochromu je to, že vzniklý preparát není možné připravit jako preparát trvalý, a také orientace v tomto preparátu může být obtížnější. Ke zlepšení obtížné orientace je možné použít látky, které specificky rozpoznávají DNA a díky tomu dochází ke zviditelnění jader buněk. K tomuto účelu se nejčastěji využívá látka DAPI (4',6-diamidin-2-fenyindol) (Paulík a Bartůňková 2011).



Obr. 10 Znárodnění přímé a nepřímé imunohistochemie. Převezato a upraveno z <https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/img2.png>. [cit. 2015-03-09].

8.2 EnVision[®] a ImmPress[™] metodika

EnVision[®] metodika

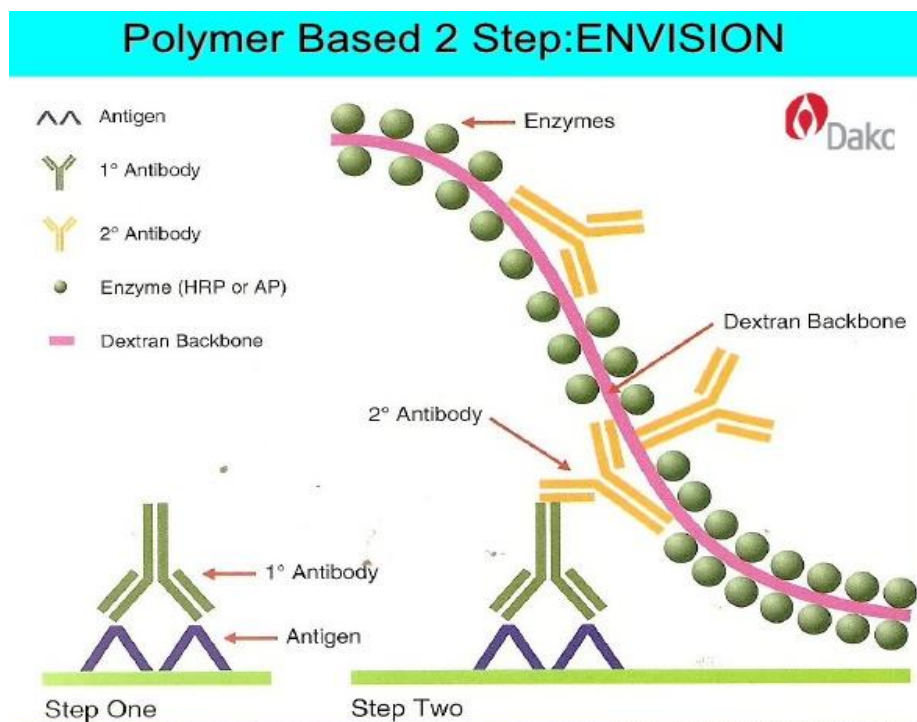
Patří, stejně jako všechny dále popsané metodiky, mezi nepřímé imunohistochemické metody. Tato metoda je vysoce citlivá, a je tedy vhodná k detekci antigenů, které jsou ve tkáních jen ve velmi nízkých koncentracích bez toho, aby docházelo k nespecifickému barvení pozadí.

Metoda EnVision je charakteristická použitím sekundární protilátky, na které je navázán polymerový nosič, tvořený nejčastěji dextranskem.

Přes tento nosič může být na sekundární protilátce přítomno velké množství enzymu

(<http://www.dako.com/dist/download.pdf?objectid=107802003> 2007),

(viz obr. 11).



Obr. 11 Znázornění principu barvení metodou EnVision®. Převzato a upraveno z <http://image.slidesharecdn.com/ihtechology-100327142240-phapp02/95/ihtechology-21-728.jpg?cb=1269717843>. [cit. 2015-03-09].

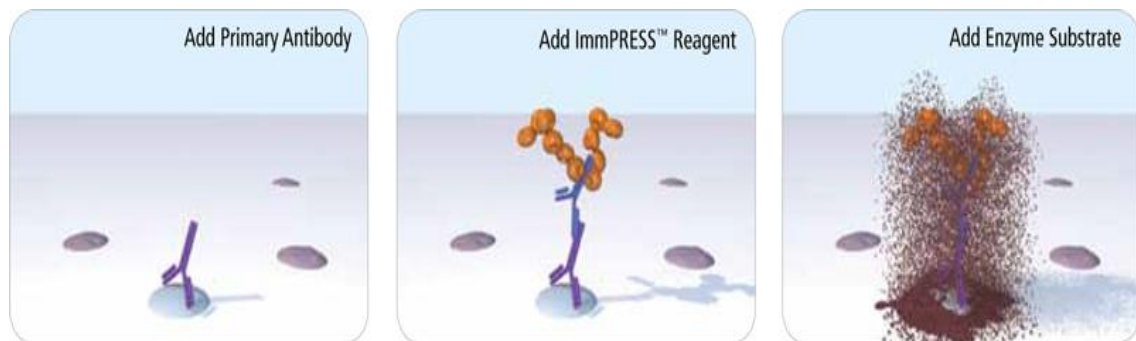
Poznámka: Krok č.1 - na antigen přítomný ve tkáni se váže neznačená primární protilátka.
Krok č.2 - následuje vazba sekundární protilátky s navázaným polymerem, který je značený nejčastěji křenuvou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou.

Metodika ImmPress™ (Polymerized reporter enzyme staining system)

Vysoké citlivosti této metody a minimálního nespecifického barvení pozadí je dosaženo pomocí vytvoření enzymových mikropolymerů a jejich připojení k sekundární protilátce bez nutnosti použití dextransku nebo jiné makromolekuly jako nosiče (viz obr. 12).

Jako enzym se zde nejčastěji využívá křenová peroxidáza s vysokou aktivitou navázaná k sekundární protilátce, která se vyznačuje vysokou afinitou k primární protilátce.

(<https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=1729> 2010)



Obr. 12 Znárodnění principu barvení metodou ImmPress™. Převezato a upraveno z <https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=1729>. [cit. 2015-03-09].

Poznámka: Nejprve dojde k navázání primární protilátky na detekovaný antigen, následně se přidá ImmPress™ reagentie a enzymový substrát pro zviditelnění reakce.

8.3 ABC (Avidin-Biotin-Complex) metodika

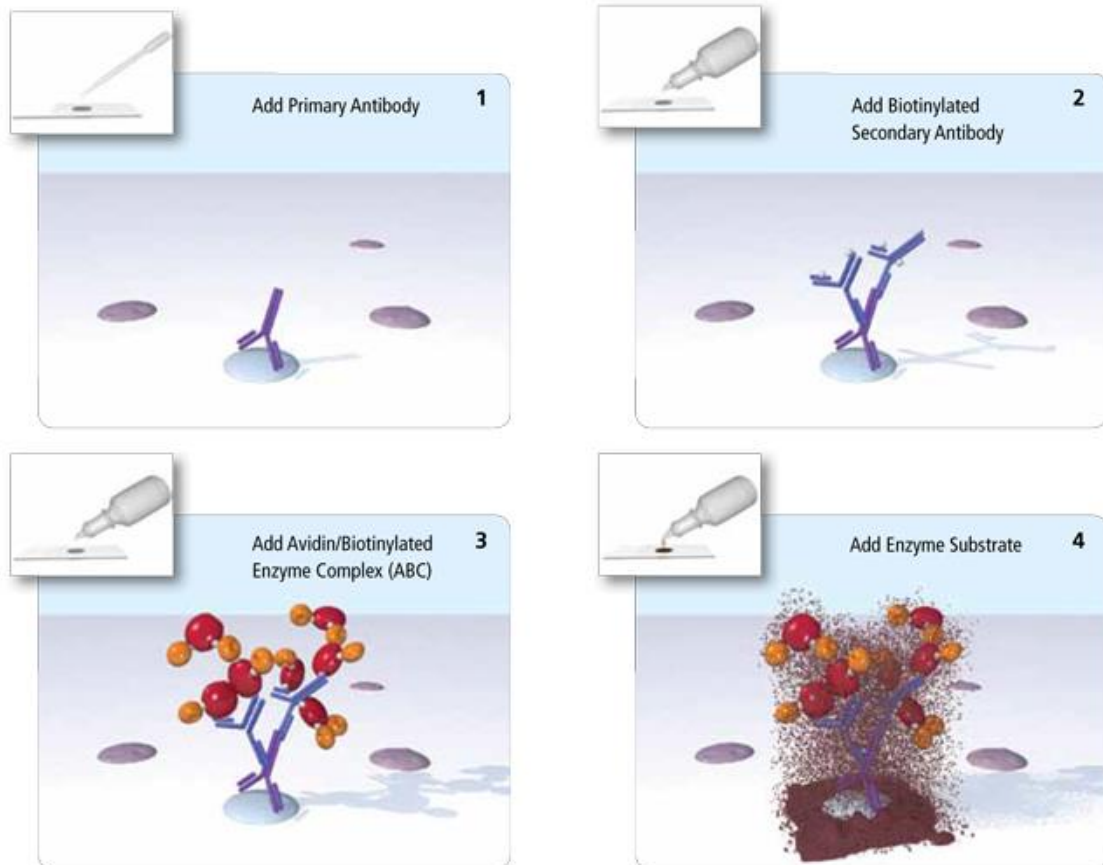
Zde se jedná se o tříkrokovou metodu. Díky přidání třetího kroku dojde k zesílení signálu, což umožňuje průkaz přítomnosti antigenu, který se nachází ve tkáni i ve velmi malém množství. ABC metodika využívá vysoké afinity mezi glykoproteinem avidinem, popřípadě streptavidinem, a vitamínem biotinem. Tato afinita je mnohokrát vyšší než afinita protilátky k antigenu, a díky tomu je vazba mezi avidinem a biotinem (na rozdíl do vazby antigenu s protilátkou) nevratná (viz obr. 13).

Značnou výhodou je to, že avidinu má na svém povrchu hned čtyři vazebná místa pro biotin, a že na molekule biotinu může být navázáno větší množství proteinů, včetně enzymu nebo protilátky (<https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=42>).

Místo avidinu je také možné použít molekulu streptavidin, který se získává z bakterie *Streptomyces avidinii*. Tato metoda se nazývá SABC (streptavidin-biotin-complex). Technické provedení je stejné, jako u předchozí popsané metodiky, pouze se místo ABC komplexu přidá streptavidin s navázanou křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou. Pokud jsou řezy barveny pro fluorescenční mikroskopii, je na

streptavidinu navázán fluorochrom. Tato metoda je 5-10x citlivější než standardní ABC metoda. (http://www.ihcworld.com/_intro/ihc-methods.htm 2011)

Using the ABC System:



Obr. 13 Znázornění principu barvení ABC metodou. Převzato a upraveno z <https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=42>. [cit. 2015-03-09].

Poznámka: Jako první se aplikuje primární protilátka, poté následuje přidání biotinylované sekundární protilátky tvořící tzv. můstek, následně dojde k přidání komplexu avidin-biotin-enzym (ABC komplex) a v posledním kroku se přidá enzymatický substrát ke zviditelnění reakce.

9 Cíl práce, zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo popsat změny exprese endotelové NO syntázy a ICAM-1 ve stěně aorty u myší s nízkou a vysokou hladinou solubilního endoglinu (*Sol-Eng+*). Snahou bylo tedy porovnání exprese obou markerů jak z hlediska intenzity, tak z hlediska plochy barvení. K tomuto účelu jsme použili imunohistochemické metody s detekcí ve fluorescenčním mikroskopu.

10 Experimentální část

10.1 Použitá zvířata a jejich předepsaná dieta

10.1.1 Zvířata

Ke studii byly použity transgenní myši s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu (*Sol-Eng*⁺), které mají svůj původ v myším kmeni CBAxC57BL/6J, a pochází z Oddělení pro vývoj geneticky modifikovaných organizmů (Univerzita Salamanca, Španělsko).

Samice myši byly od svých šesti měsíců věku krmeny dietou bohatou na tuky, která obsahovala 1,25% cholesterolu a 40% tuku (Research Diets, Inc, USA). Touto dietou byly myši krmeny následující tři měsíce. Stejně staré samice myši ze stejného vrhu s nízkou hladinou solubilního endoglinu v plazmě byly použity jako kontrolní skupina. Zvířata byla chovaná v prostředí s dvanácti hodinovým cyklem světla a tmy, se stálou teplotou a vlhkostí a s volným přístupem k vodě.

Tyto zvířecí studie splňují etická kritéria pro zacházení s laboratorními zvířaty. Všechny experimenty byly prováděny v souladu se směrnicí ECC(86/609/EEC) a všechny protokoly schválila Etická komise na ochranu zvířat proti týrání na Farmaceutické fakultě Karlovy Univerzity v Praze (číslo povolení: 21558/2013-2) a Bioetická komise na Univerzitě v Salamance (číslo povolení: 006-201400038812).

Veškeré chirurgické zákroky se prováděly za použití anestezie vyvolané kombinací ketaminu s xylazinem a bylo vyvinuto veškeré úsilí k minimalizaci utrpení zvířat.

10.2 Koncentrace solubilního endoglinu v plazmě

Krevní vzorky byly myším odebrány ze špičky ocasu a plazmatická hladina lidského solubilního endoglinu byla stanovena za využití Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA) podle pokynů výrobce.

10.3 Metodika imunohistochemie

Aorty byly odebrány ze zvířat, ihned zmrazeny v tekutém dusíku a poté uchovány v -80°C . Pro imunohistochemické stanovení molekuly ICAM-1 a eNOS byly použity histologické příčné řezy aorty myši o tloušťce $7\ \mu\text{m}$, které byly pořízeny krájením zmrazené tkáně na zmrazovacím mikrotomu.

Pro pořízení fotodokumentace a digitalizaci snímků z mikroskopu Olympus AX 70 byla použita kamera Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa, Kanada) a počítačový software NIS (Laboratory imaging, Česká Republika).

Imunohistochemická detekce exprese ICAM-1

Pro detekci exprese ICAM-1 na endoteliálních buňkách byla použita metodika SABC (princip této metodiky je blíže popsán v kapitole 8.3 ABC metodika). Zde se používá neoznačená primární protilátka vážící se specificky na antigen, který detekujeme. Následuje přidání sekundární protilátky značené biotinem, která se specificky váže na protilátku primární. Poté se přidává streptavidin s navázaným fluorochromem Cy3.

Jako primární protilátka byla použita hamster anti-mouse ICAM-1 naředěná bovinním sérovým albuminem v poměru 1:50 (BD Pharmingen, USA).

Jako sekundární protilátka byla použita goat anti-hamster Ig ředěná bovinním sérovým albuminem v poměru 1:400 s přídavkem $8\ \mu\text{l}$ myšního séra (Vector laboratories, USA).

Ke zvýraznění jader byla použita látka DAPI, která se specificky váže na nukleové kyseliny a vykazuje modrou fluorescenci (Invitrogen, Česká Republika).

- **pracovní postup**

Nejprve byla sklíčka s tkáňovými řezy ponechána 20 minut při laboratorní teplotě. Poté se sklíčka vložila do acetonu uchovávaném při teplotě -20°C . V něm byla ponechána 30 minut. Po uplynutí této doby se sklíčka z acetonu vyndala a nechala se při laboratorní teplotě oschnout po dobu 20 minut.

Sklíčka byla vložena do roztoku fosfátového pufru (PBS), kde byla ponechána 4 minuty. Dále se na sklíčka napipetovalo $50\ \mu\text{l}$ mléka, které se připravilo rozpuštěním

0,5g sušeného mléka v 10 ml PBS. Po 30 minutách inkubace s mlékem se sklíčka krátce opláchl v PBS. Následovala 15 minutová inkubace s anti-avidinem, který se používá pro zablokování avidinu přirozeně se vyskytujícího ve tkáni.

Poté se sklíčka oplachovala v roztoku PBS po dobu 2x4 minuty. Pro zablokování přirozeně se vyskytujícího biotinu ve tkáni byla nutná 15 minutová inkubace s anti-biotinem. Po tomto kroku následoval opět oplach v PBS 2x4 minuty.

Poté byla na řezy napipetována primární protilátka v množství 50 μ l na jeden řez. Po inkubaci trvající 60 minut se zbytek nenavázané protilátky odstranil ze sklíček jejich ponořením do PBS na 2x4 minuty.

Následovalo přidání 50 μ l sekundární protilátky na každý tkáňový řez. Po 30 minutové inkubaci se zbytek nenavázané protilátky opět odstranil ponořením sklíček do PBS na 2x4 minuty.

Dále se na řezy přidalo 50 μ l streptavidinu konjugovaný s fluorochromem Cy3 ředěného s bovinním sérovým albuminem v poměru 1:300. Po 30 minutách následovalo opět ponoření sklíček do kyvety s PBS držené ve tmě 2x4 minuty. Poté se na řezy napipetovalo 50 μ l DAPI ředěného PBS v poměru 1:5000 a nechala se proběhnout 10 minutová inkubace. Následovalo poslední ponoření sklíček do kyvety s roztokem PBS ve tmě na 2x4 minuty a montování krycího sklíčka pomocí montovacího media DABCO.

Imunohistochemická detekce exprese eNOS

Pro detekci exprese eNOS na endoteliálních buňkách byla použita nepřímá metoda s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou. K detekci antigenu, který stanovujeme, byla použita neznačená primární protilátka. Poté byla přidána fluorescenčně značená sekundární protilátka, která se specificky naváže na primární protilátku.

Jako primární protilátka byla použita rabbit anti-mouse eNOS ředěná bovinním sérovým albuminem v poměru 1:50 (Santa Cruz biotechnology, USA).

Jako sekundární protilátka byla použita goat anti-rabbit Alexa488 ředěná s bovinním sérovým albuminem v poměru 1:100 (Life Technologies, Česká Republika).

Ke zvýraznění jader byla použita látka DAPI, která se specificky váže na nukleové kyseliny a vykazuje modrou fluorescenci (Invitrogen, Česká Republika).

- **Pracovní postup**

Nejprve byla sklíčka s tkáňovými řezy ponechána 20 minut při laboratorní teplotě. Poté se sklíčka vložila do acetonu, který je uchováván při teplotě -20 °C, kde byla ponechána 30 minut. Po uplynutí této doby se sklíčka z acetonu vyndala a nechala se při laboratorní teplotě oschnout.

Sklíčka byla vložena do roztoku PBS, kde byla ponechána 4 minuty. Poté se na sklíčka napipetovalo 50 µl mléka. Mléko bylo na sklíčkách ponecháno 30 minut. Po krátkém oplachu sklíček v PBS se na ně aplikovalo 50 µl primární protilátky.

Po proběhlé inkubaci, která trvala 60 minut, se zbytek nenavázané protilátky odstranil pomocí ponoření sklíček do roztoku PBS na 2x4 minuty. Dále se na sklíčka nanoslo 50 µl značené sekundární protilátky. Po 30 minutách se sklíčka opět oplachovala v roztoku PBS po dobu 2x4 minuty.

Dalším krokem byla aplikace DAPI ředěném v PBS v poměru 1:5000 na každý řez po 50 µl. DAPI bylo ponecháno na sklíčkách 10 minut. Po uplynutí této doby byla sklíčka ponořena do PBS na dobu 2x4 minuty. Posledním krokem bylo ukotvení řezů pomocí montovacího média DABCO a jejich překrytí krycím sklíčkem.

11 Výsledky

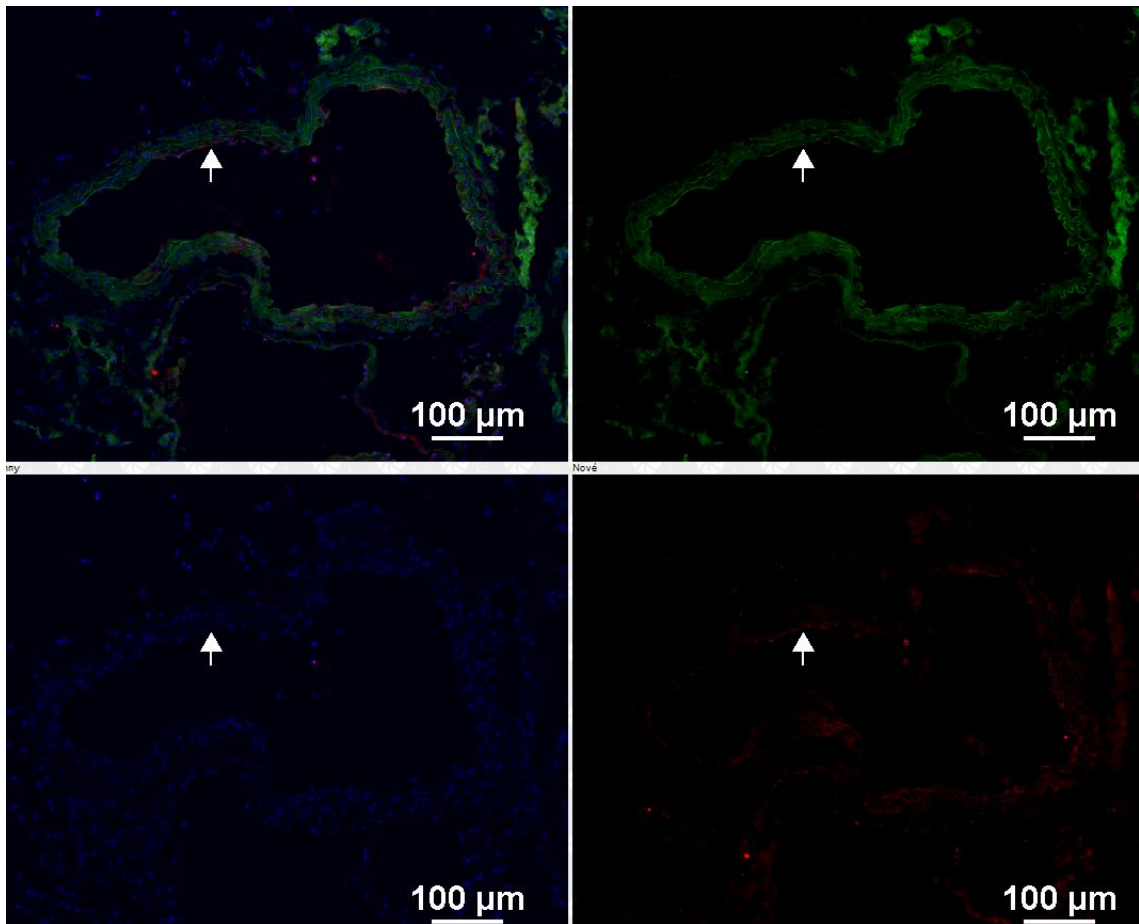
Expres eNOS, prokázána imunohistochemickou analýzou, byla u kontrolní skupiny myší pozorována pouze na cévním endotelu (viz obr. 14). Tato expres byla slabá a nepravidelná a zaujímala pouze malou plochu cévního endotelu (viz obr. 16). U některých řezů nebyla expres eNOS endotelovými buňkami prokázána vůbec (viz obr. 15).

U myší *Sol-Eng*⁺ byla prokázána expres eNOS také pouze endotelovými buňkami. Tato expres není přítomna na celém povrchu cévního endotelu, ale v tomto případě je charakteristická svým nepravidelným rozmístěním (viz obr. 17 a obr. 18). U některých řezů nebyla expres prokázána vůbec (viz obr. 19).

Lze tedy shrnout, že expres eNOS se mezi oběma studovanými skupinami nelišila ani z hlediska intenzity a plochy barevní ani z hlediska lokalizace exprese (barvení).

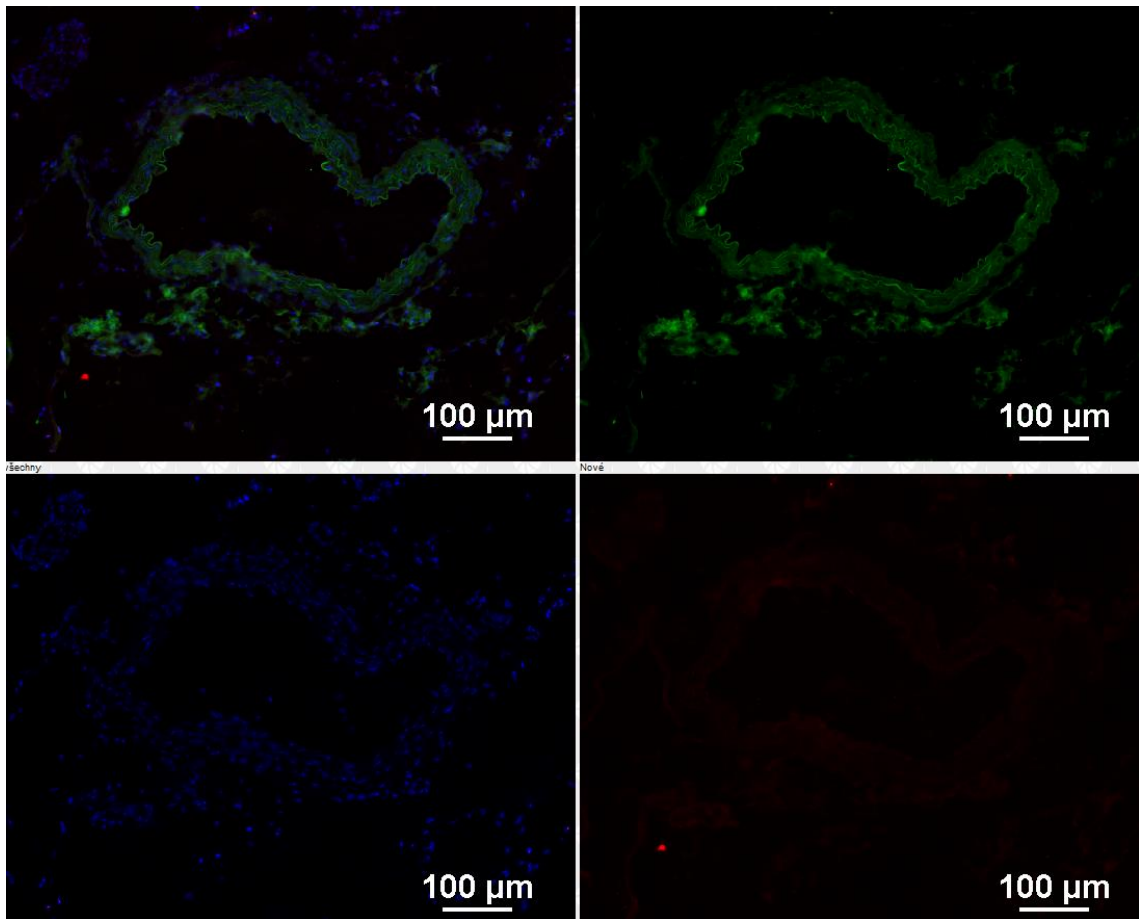
Expres adhezní molekuly ICAM-1 u kontrolní skupiny myší byla prokázána především na cévním endotelu (viz obr. 20). Expres této adhezní molekuly je v porovnání s expresí molekuly eNOS u této skupiny myší výraznější a mnohem pravidelnější, zaujímá větší plochu cévního endotelu (viz obr. 21 a obr. 22).

U skupiny myší *Sol-Eng*⁺ je expres molekuly ICAM-1 opět velmi podobná jako u kontrolní skupiny (viz obr. 23). Přítomnost exprese ICAM-1 zde byla prokázána především na endotelu cévy, kde zaujímá její větší část (viz obr. 24 a obr. 25).



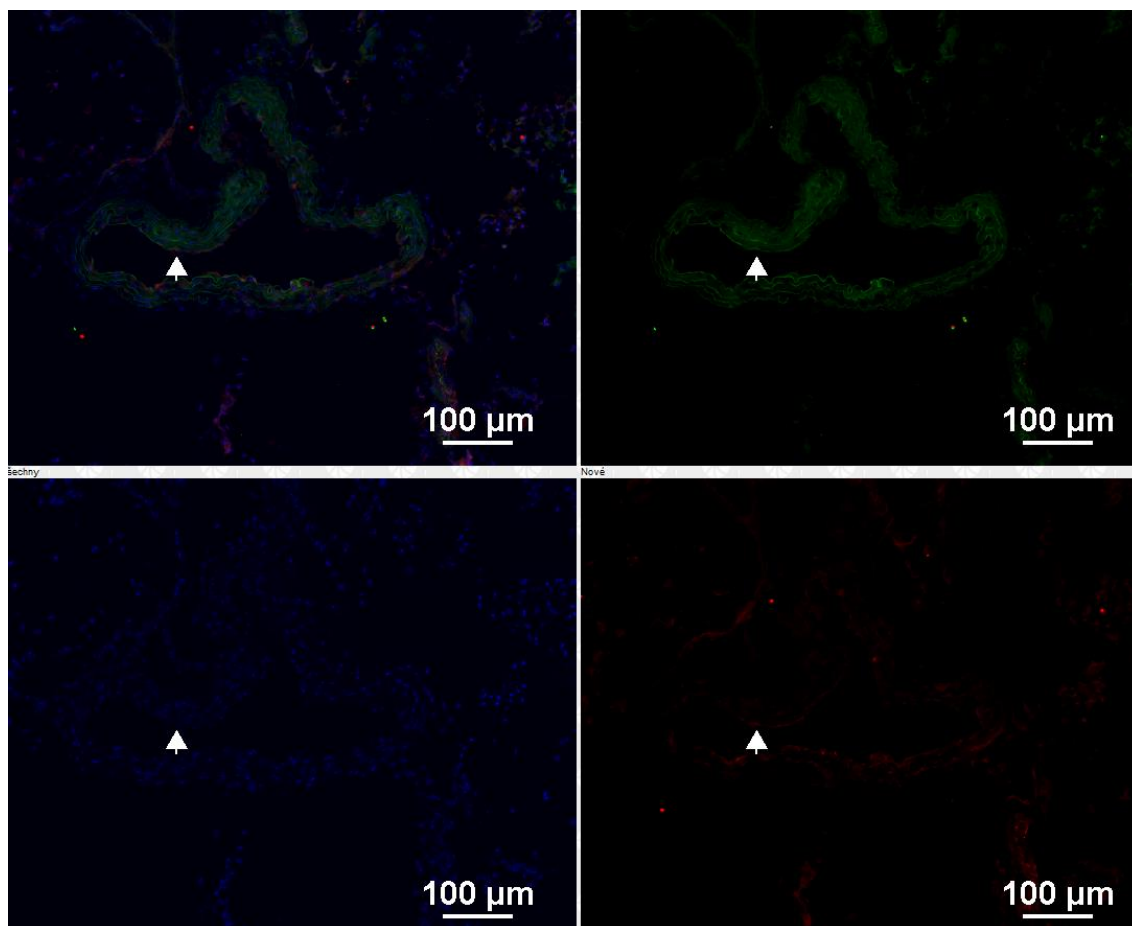
Obr. 14 Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u kontrolní skupiny myší.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení eNOS pouze na cévním endotelu. Místo exprese eNOS je znázorněno šipkou. Meřítko je 100 μm .



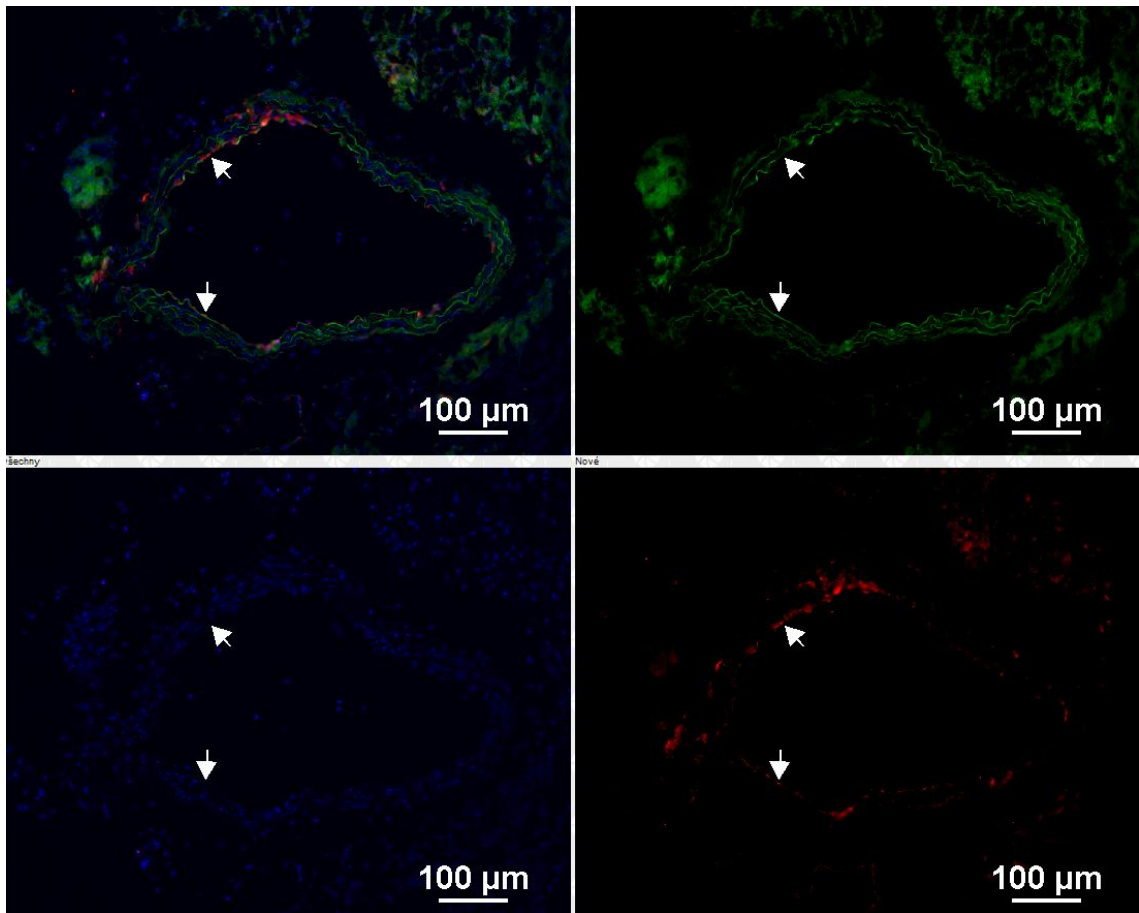
Obr. 15 Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u kontrolní skupiny myši.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a pozitivita na eNOS zde nebyla pozorována. Meřítko je 100 µm.



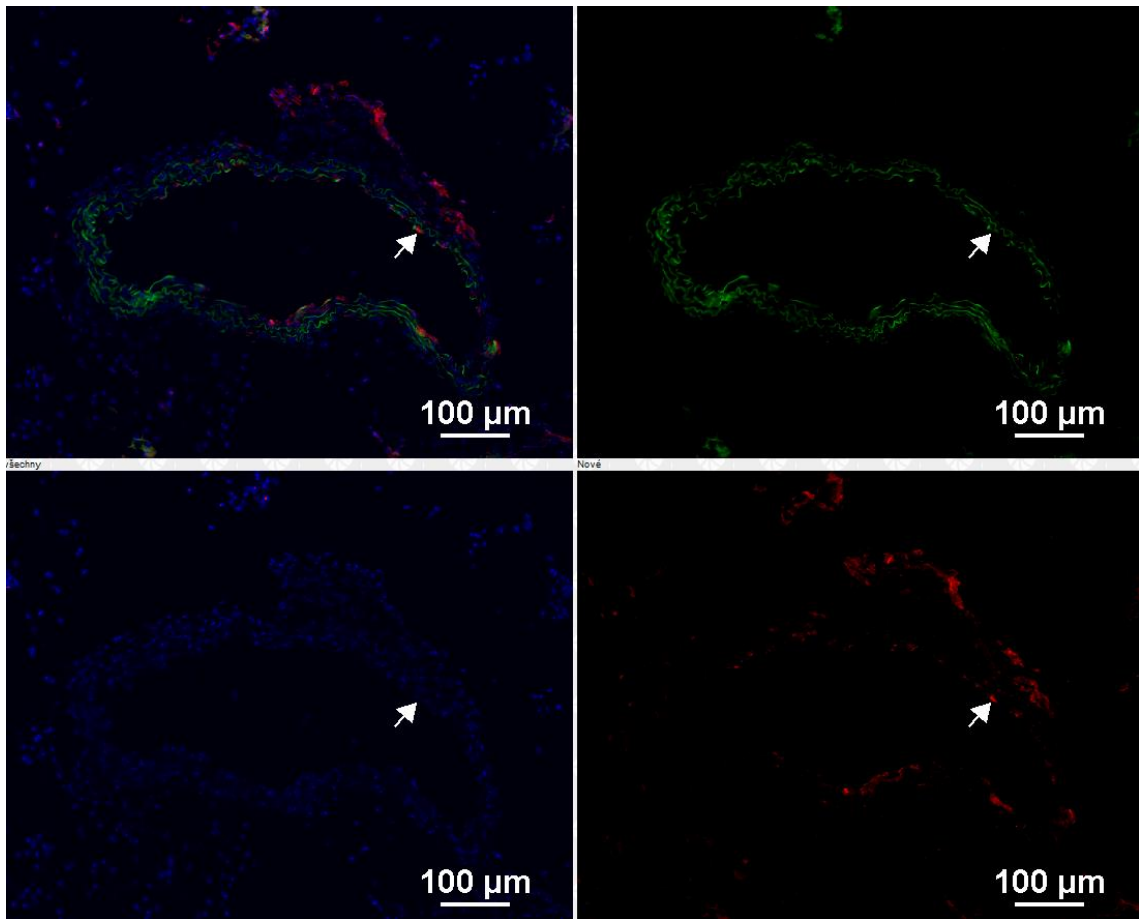
Obr. 16 Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u kontrolní skupiny myší.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení eNOS pouze na cévním endotelu. Místo exprese eNOS je znázorněno šipkou. Meřítko je 100 μm .



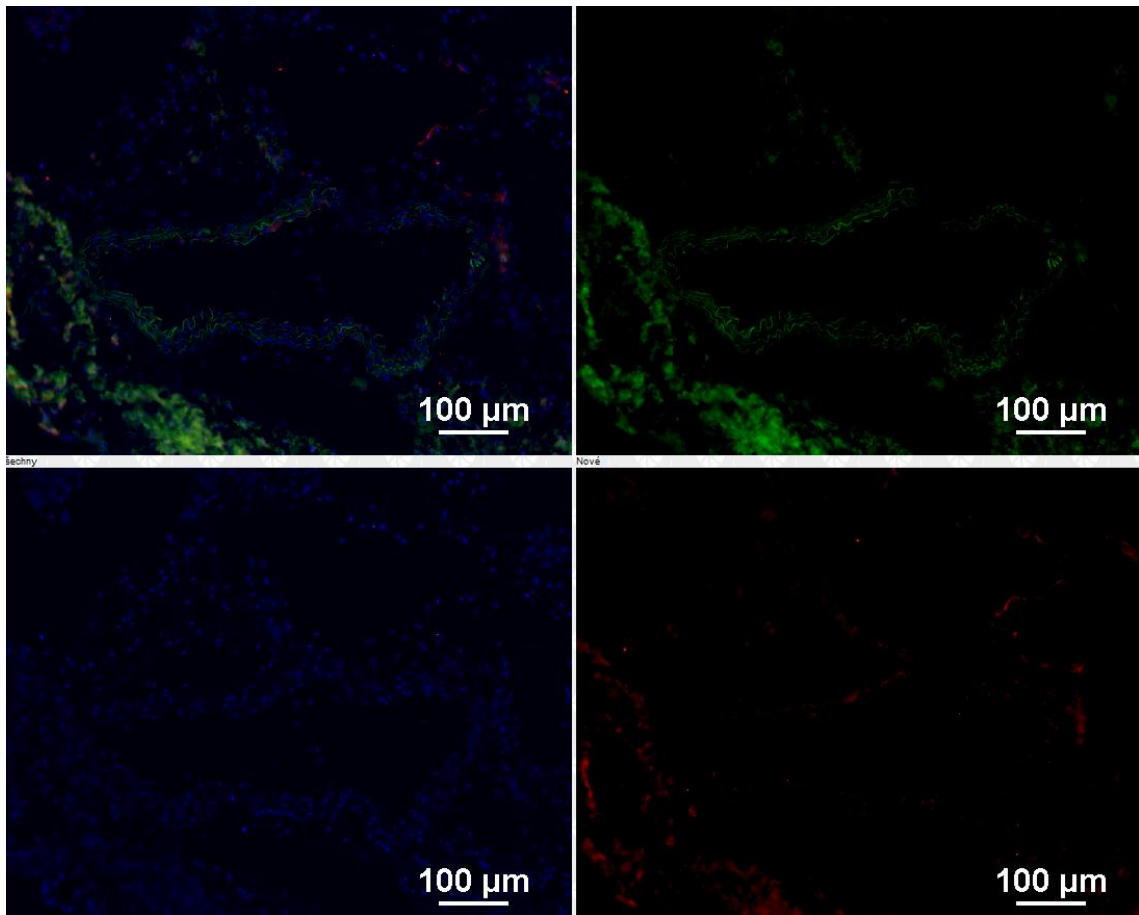
Obr. 17 Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u *Sol-Eng*⁺ skupiny myši.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení eNOS pouze na cévním endotelu. Místo exprese eNOS je znázorněno šipkami. Meřítko je 100 μm .



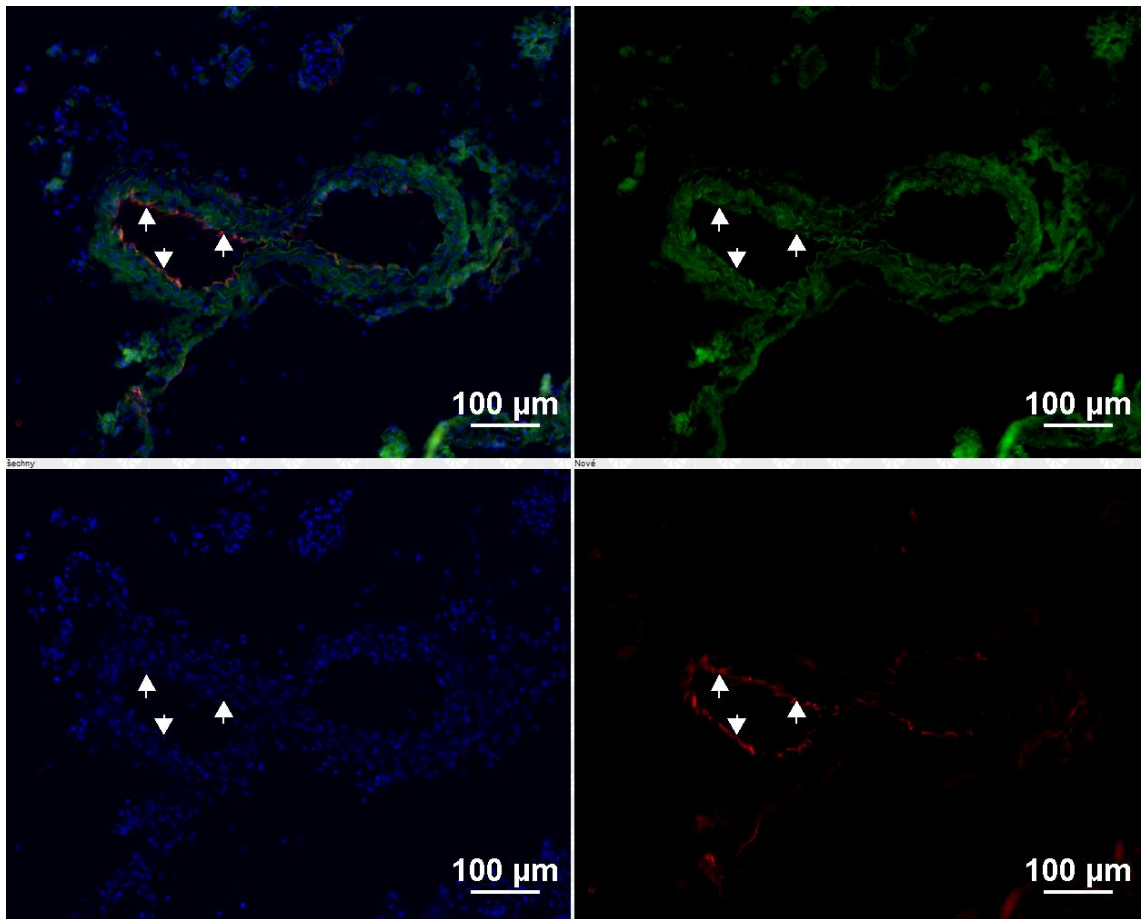
Obr. 18 Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u *Sol-Eng+* skupiny myši.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení eNOS pouze na cévním endotelu. Místo exprese eNOS je znázorněno šipkou. Meřítko je 100 µm.



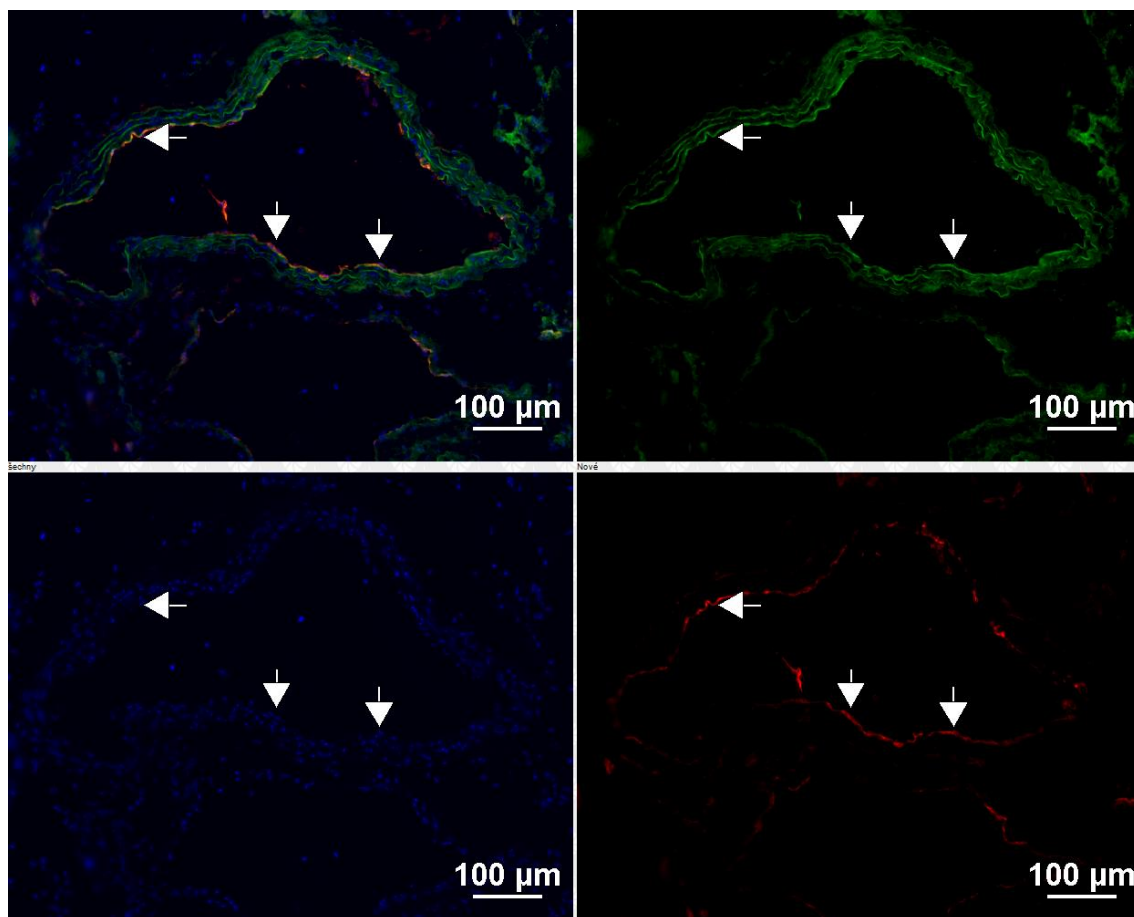
Obr. 19 Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u *Sol-Eng+* skupiny myší.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a pozitivita imunohistochemického barvení eNOS zde nebyla pozorována. Meřítko je 100 µm.



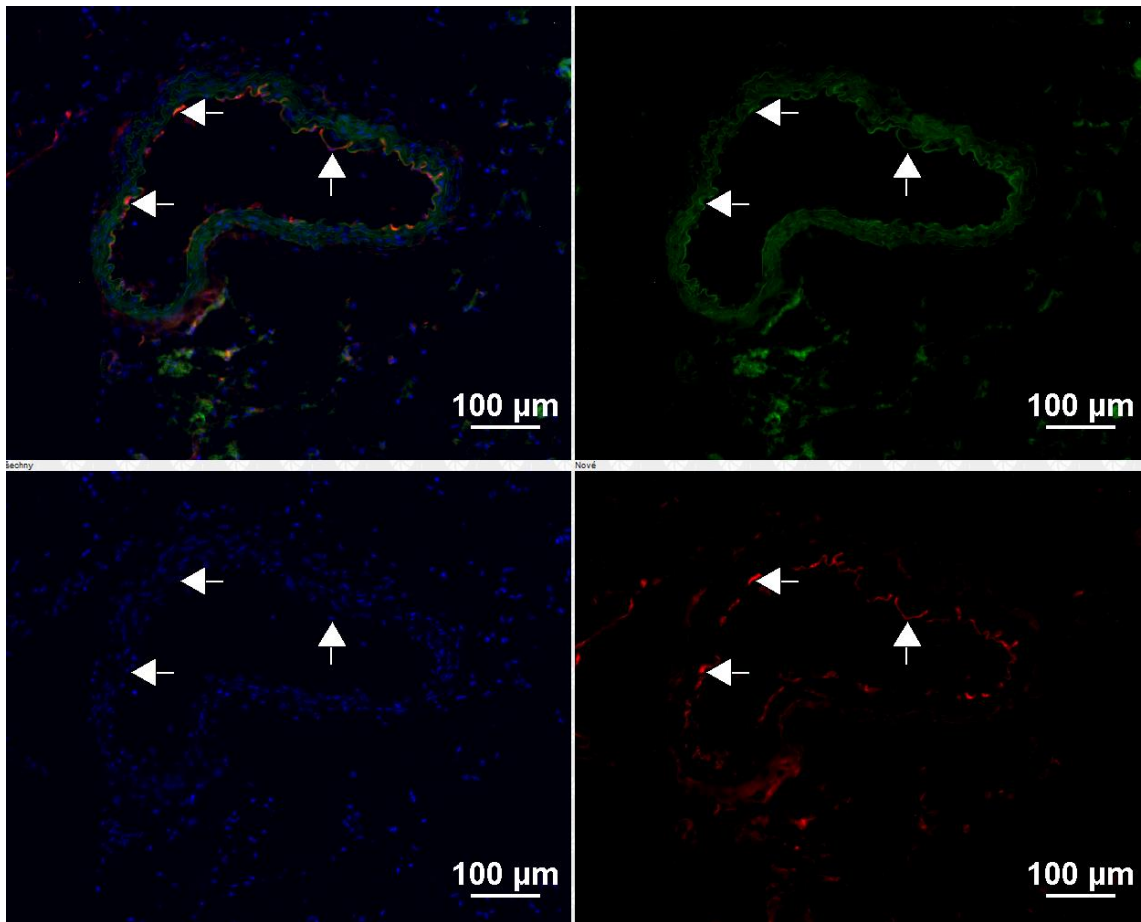
Obr. 20 Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u kontrolní skupiny myši.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení ICAM-1 pouze na cévním endotelu. Místo exprese ICAM-1 je znázorněno šipkami. Meřítko je 100 µm.



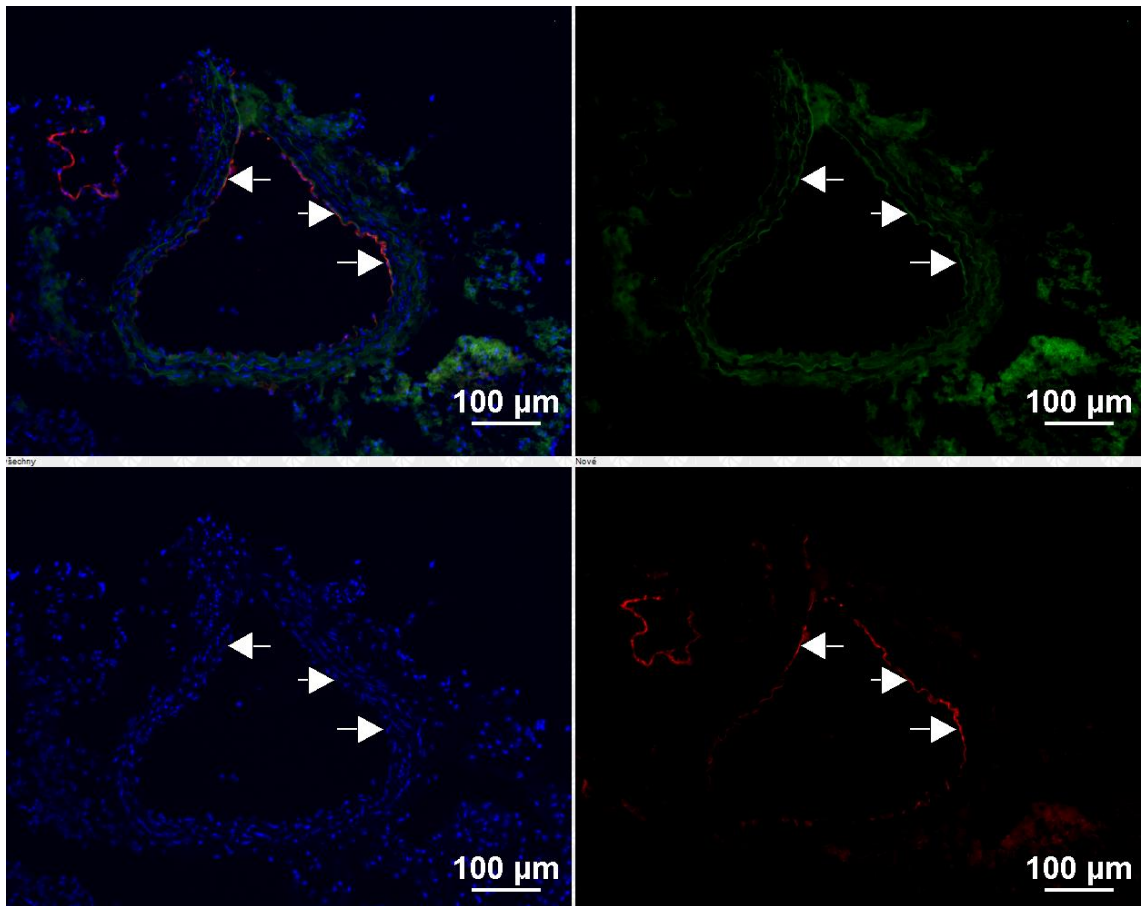
Obr. 21 Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u kontrolní skupiny myší.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení ICAM-1 pouze na cévním endotelu. Místo exprese ICAM-1 je znázorněno šipkami. Meřítko je 100 µm.



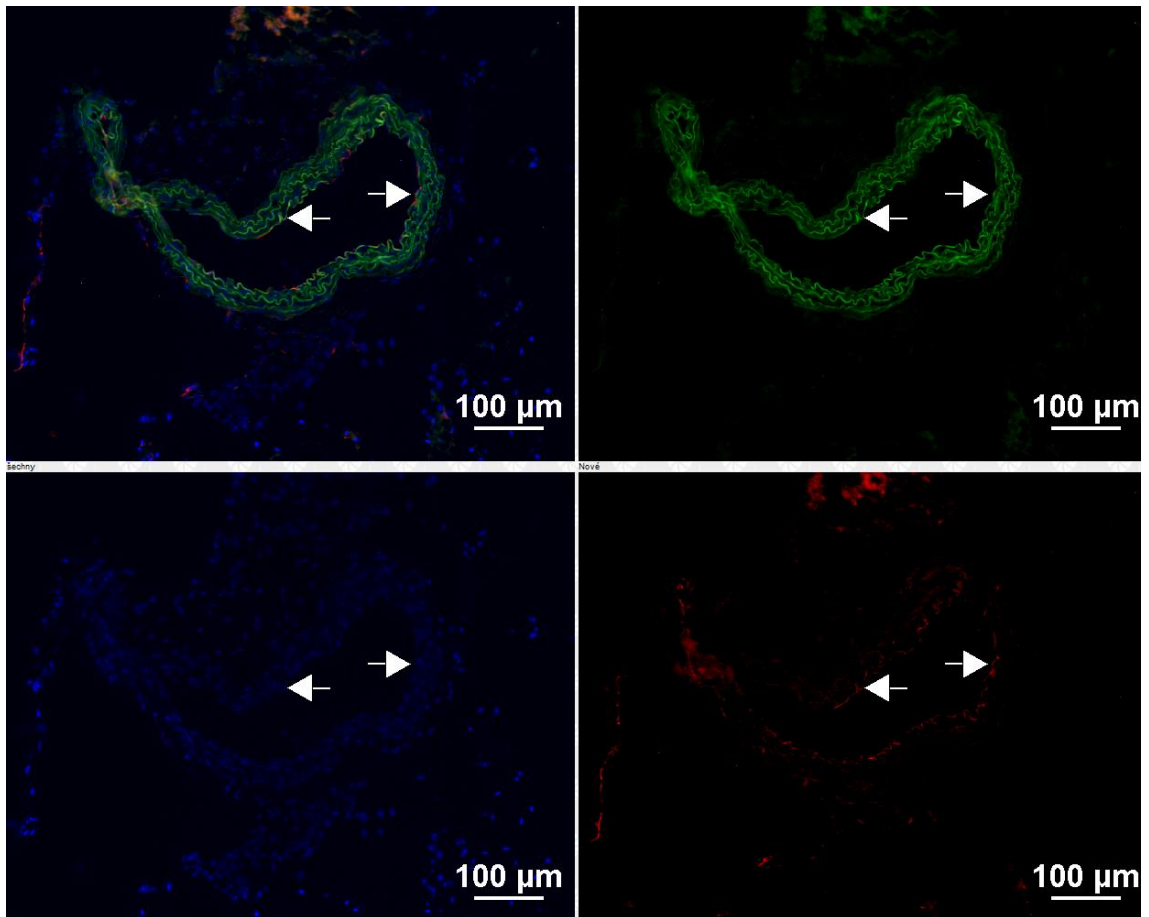
Obr. 22 Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u kontrolní skupiny myši.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení ICAM-1 pouze na cévním endotelu. Místo exprese ICAM-1 je znázorněno šipkami. Meřítko je 100 µm..



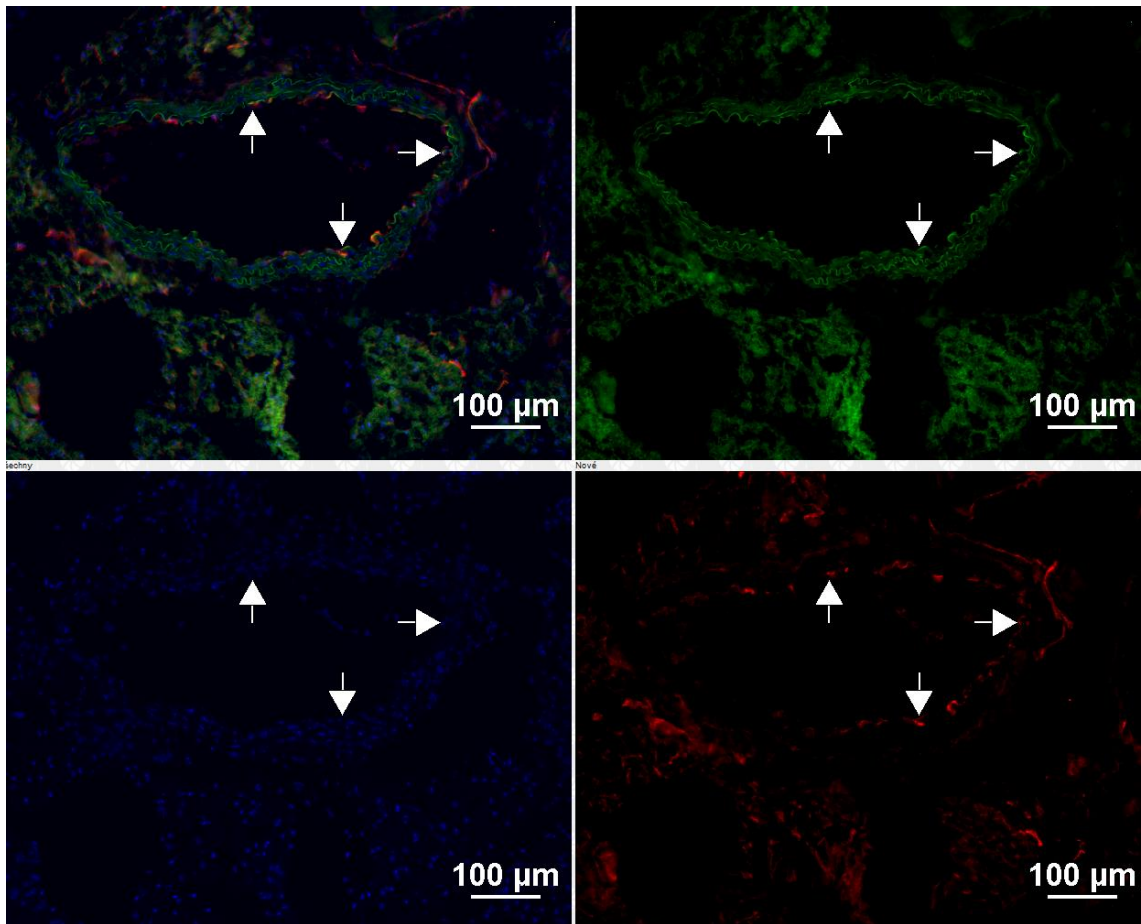
Obr. 23 Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u *Sol-Eng+* skupiny myši.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení ICAM-1 pouze na cévním endotelu. Místo exprese ICAM-1 je znázorněno šipkami. Meřítko je 100 µm..



Obr. 24 Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u *Sol-Eng+* skupiny myší.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení ICAM-1 pouze na cévním endotelu. Místo exprese ICAM-1 je znázorněno šipkami. Meřítko je 100 µm.



Obr. 25 Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u *Sol-Eng+* skupiny myši.

Zeleně je zobrazena autofluorescence tkáně, modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI) a červeně je znázorněna pozitivita imunohistochemického barvení ICAM-1 pouze na cévním endotelu. Místo exprese ICAM-1 je znázorněno šipkami. Meřítko je 100 µm.

12 Diskuse

Endoglin/CD105 (Eng) je přídatným receptorem typu III pro některé členy TGF- β nadrodiny proteinů. Tento homodimerní transmembránový glykoprotein hraje pravděpodobně významnou roli v hematopoéze, angiogenezi, vývoji kardiovaskulárního systému a regulaci cévního tonu (López-Novoa a Bernabeu 2010). Oproti tomu zvýšené hladiny solubilní formy endoglinu (sEng) byly nalezeny v plazmě u různých patologických stavů, které ovlivňují kardiovaskulární systém. Tento cirkulující sEng je tvořen pouze extracelulární NH₂ doménou, která se uvolnila odštěpením z tkáňové formy endoglinu (Venkatesha et al. 2006). K dispozici je řada studií, které naznačují, že solubilní endoglin by měl být považován za biomarker endotelové dysfunkce, např. u preeklampsie (Venkatesha et al. 2006), aterosklerózy (Blann et al. 1996; Strasky et al. 2011), hypercholesterolemie (Blaha et al. 2008), diabetes mellitus a hypertenze (Blázquez-Medela et al. 2010) a chronické ischemické choroby srdeční (Ikemoto et al. 2012). Protože u všech těchto onemocnění hraje endotelová dysfunkce významnou roli, předpokládá se, že vysoké hladiny solubilního endoglinu mohou být typickým znakem endotelové dysfunkce a následně vést k rozvoji mnoha kardiovaskulárních onemocnění, včetně preeklampsie a aterosklerózy (Nachtigal et al. 2012). Kromě toho byla také prokázána schopnost solubilního endoglinu pozměňovat signalizační cestu, která je řízena TGF- β a probíhá v buňkách cévního endotelu (Walshe et al. 2009).

Proto tématem této diplomové práce bylo stanovení a vyhodnocení některých markerů, které jsou spojovány s endotelovou funkcí či dysfunkcí. Použili jsme fluorescenční imunohistochemii ke zjištění exprese molekuly eNOS a ICAM-1 v aortě myši s nízkou hladinou solubilního endoglinu a vysokou hladinou solubilního endoglinu, které byly krmeny dietou s vysokým obsahem tuků. Nedávno publikovaná studie na těchto myších prokázala, že přítomnost pouze solubilního endoglinu (bez další přítomnosti cholesterolu a diety bohaté na tuky) neovlivňuje funkční a morfologické vlastnosti aorty (Nemeckova et al. 2015). Z výsledků této studie se její autoři domnívají, že pouze vysoká hladina solubilního endoglinu sama o sobě nevyvolává endotelovou dysfunkci u *Sol-Eng*⁺ myši. Nicméně data získaná při této studii nevyklučují možnost, že solubilní endoglin může, v kombinaci s ostatními rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění, přispět ke změně endotelové funkce. Pro dosažení těchto podmínek jsme použili dietu bohatou na tuky v kombinaci s vysokou hladinou solubilního endoglinu, což může přispět k poškození endotelu.

Endotelová dysfunkce je charakteristická sníženou vazodilatací, ke které může vést snížená biologická dostupnost NO. K tomu může dojít jeho sníženou tvorbou pomocí eNOS nebo díky jeho zvýšené spotřebě při reakcích s reaktivními formami kyslíku (Higashi et al. 2009; Davignon a Ganz 2004). Při nedostatku NO také dochází ke zvýšení exprese zánětlivých adhezních molekul endotelovými buňkami. Mezi tyto molekuly patří VCAM-1 a ICAM-1 (Joseph-Silverstein a Silverstein 1998). Kromě toho snížená exprese tkáňového endoglinu vede ke snížení exprese eNOS, což má za následek poškození cévních funkcí, které jsou závislé na endotelu (Jerkic et al. 2004).

Expresi molekuly eNOS v aortě byla slabá jak u kontrolní skupiny myší, tak u myší s vysokými hladinami solubilního endoglinu, a byla pozorována pouze na endotelu. Tato slabá exprese značí částečné poškození endotelu u obou skupin myší. Expresi eNOS byla pravděpodobně ovlivněna dietou bohatou na tuky, ale solubilní endoglin na tuto expresi neměl žádný vliv.

ICAM-1 je adhezní molekula, která se svou přítomností podílí na rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy (Bourdillon et al. 2000; Davies et al. 1993). V obou skupinách myší jsme prokázali expresi ICAM-1 pouze na endotelu. I přesto, že ICAM-1 byla prokázána u makrofágů v aterosklerotickém plátu, by tato molekula mohla být považována za hlavní znak endotelové dysfunkce (Nakashima et al. 1998). Vyšší exprese ICAM-1, prokázaná v této diplomové práci, může naznačovat rozvoj endotelové dysfunkce u obou skupin myší, bez ohledu na hladiny solubilního endoglinu.

Proto předpokládáme, že solubilní endoglin se nepodílí na odlišné expresi molekul eNOS a ICAM-1. Na druhou stranu nemůžeme vyloučit možnost, že jiné metody zahrnující funkční analýzu aorty a určení jiných markerů, mohou vést k rozdílným výsledkům, které budou vypovídat o vlivu solubilního endoglinu na funkce endotelu.

13 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo detekovat expresi dvou markerů endotelové dysfunkce eNOS a ICAM-1 pomocí fluorescenční imunohistochemie u myší s nízkými a vysokými hladinami solubilního endoglinu.

Expresie eNOS byla pozorována u obou skupin myší pouze na cévním endotelu a obecně reakce byla velmi slabá.

Nicméně jsme nepozorovali žádné změny exprese z hlediska intenzity a lokalizace exprese mezi myšmi s nízkými hladinami solubilního endoglinu a vysokými hladinami solubilního endoglinu.

Expresie ICAM-1 byla opět pozorována pouze na cévním endotelu u obou skupin zvířat a expresie ICAM-1 byla mnohem výraznější ve srovnání s expresí eNOS. Ani zde jsme však nezaznamenali rozdílnou expresi ICAM-1 mezi skupinami s rozdílnými hladinami solubilního endoglinu.

Výsledky této diplomové práce tedy neprokázaly indukci endotelové dysfunkce u myší s vysokými hladinami solubilního endoglinu z hlediska pozorování exprese eNOS a ICAM-1. Další metodické přístupy a sledování dalších biomarkerů jsou zapotřebí k odhalení potenciálního vlivu vysokých hladin solubilního endoglinu na cévní stěnu.

14 Seznam zkratek

ABC avidin-biotin-complex metodika

BH₄ tetrahydrobiopterin

Ca²⁺ vápenaté ionty

eNOS endotelová syntáza oxidu dusnatého

FAD flavin adenin dinukleotid

FMN flavin mononukleotid

H₂O₂ peroxid vodíku

HO· Hydroxylový radikál

HOCl kyselina chlorná

ICAM-1 intracelulární adhezní molekula 1

IL interleukin

INF γ interferon gama

iNOS indukibilní syntáza oxidu dusnatého

KVCH kardiovaskulární choroby

LDL lipoproteiny o nízké hustotě

Mm milimetry

MMP proteolytický enzym, metaloproteináza

NADPH nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

nNOS neurální syntáza oxidu dusnatého

NO oxid dusnatý

O₂ kyslík

O₂⁻ Superoxid radikál

ONOO⁻peroxinitrit

Ox-LDL oxidované lipoproteiny o nízké hustotě

PAI-1 inhibitor tkáňového aktivátoru plasminogenu

PBS fosfátový pufr

PCR polymerázová řetězová reakce

PDGF destičkový růstový faktor

ROS reaktivní formy kyslíku

SABC streptavidin-biotin-complex metodika

sEng solubilní endoglin

TGF- β transformující růstový faktor beta

TNF- α tumor nekrotizující faktor alfa

t-PA tkáňový aktivátor plasminogenu

TXA₂ tromboxan 2

VCAM-1 adhezní molekula 1 cévních buněk

VEGF vaskulární endotelový růstový faktor

15 Seznam použitých obrázků

<i>Obr. 1</i> Popis cévní stěny.....	10
<i>Obr. 2</i> Rozdílná stavba cévní stěny u arterie a vény..	12
<i>Obr. 3</i> Endotelové dysfunkce..	18
<i>Obr. 4</i> Schéma přestupu leukocytů přes endotel do subendotelového prostoru.....	20
<i>Obr. 5</i> Struktura ICAM-1	21
<i>Obr. 6</i> Strukturní uspořádání eNOS..	24
<i>Obr. 7</i> Narušení funkce eNOS při oxidačním stresu.....	26
<i>Obr. 8</i> Schéma předpokládané role endoglinu v TGF- β /ALK-1 a TGF- β /ALK-5 signalizační kaskádě buněk endotelu.....	28
<i>Obr. 9</i> Vznik solubilního endoglinu pomocí působení metaloproteinázy.....	29
<i>Obr. 10</i> Znázornění přímé a nepřímé imunohistochemie.....	32
<i>Obr. 11</i> Znázornění principu barvení metodou EnVision [®] ..	33
<i>Obr. 12</i> Znázornění principu barvení metodou ImmPress [™] ..	34
<i>Obr. 13</i> Znázornění principu barvení ABC metodou.....	35
<i>Obr. 14</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u kontrolní skupiny myší.	42
<i>Obr. 15</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u kontrolní skupiny myší.	43
<i>Obr. 16</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u kontrolní skupiny myší.	44
<i>Obr. 17</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u <i>Sol-Eng</i> ⁺ skupiny myší.	45
<i>Obr. 18</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u <i>Sol-Eng</i> ⁺ skupiny myší.	46
<i>Obr. 19</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence eNOS u <i>Sol-Eng</i> ⁺ skupiny myší.	47
<i>Obr. 20</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u kontrolní skupiny myší.	48
<i>Obr. 21</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u kontrolní skupiny myší.	49
<i>Obr. 22</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u kontrolní skupiny myší.	50
<i>Obr. 23</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u <i>Sol-Eng</i> ⁺ skupiny myší.	51

<i>Obr. 24</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u <i>Sol-Eng+</i> skupiny myší.	52
<i>Obr. 25</i> Reprezentativní obrázek imunofluorescence ICAM-1 u <i>Sol-Eng+</i> skupiny myší.	53

16 Seznam použité literatury

- ANDREW, Penelope J. a Bernd MAYER, 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* [online]. roč. 43, s. 521–531. ISSN 00086363. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6363(99)00115-7
- BLAHA, Milan, Melanie CERMANOVA, Vladimir BLAHA, Petr JAROLIM, Ctirad ANDRYS, Martin BLAZEK, Jaroslav MALY, Lukas SMOLEJ, Jiri ZAJIC, Vladimir MASIN, Renata ZIMOVA a Vit REHACEK, 2008. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [online]. roč. 197, s. 264–270. ISSN 00219150. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.022
- BLANN, A. D., J. M. WANG, P. B. WILSON a S. KUMAR, 1996. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* [online]. roč. 120, s. 221–226. ISSN 00219150. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9150(95)05713-7
- BLÁZQUEZ-MEDELA, Ana M, Luis GARCÍA-ORTIZ, Manuel A GÓMEZ-MARCOS, José I RECIO-RODRÍGUEZ, Angel SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, José M LÓPEZ-NOVOA a Carlos MARTÍNEZ-SALGADO, 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC medicine* [online]. roč. 8, s. 86. ISSN 1741-7015. Dostupné z: doi:10.1186/1741-7015-8-86
- BOBIK, Alex, 2006. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [online]. roč. 26, s. 1712–1720. ISSN 1524-4636. Dostupné z: doi:10.1161/01.ATV.0000225287.20034.2c
- BOURDILLON, M C, R N POSTON, C COVACHO, E CHIGNIER, G BRICCA a J L MCGREGOR, 2000. ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-)/ICAM-1(-)) fed a fat or a chow diet. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [online]. roč. 20, s. 2630–2635. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/01.ATV.20.12.2630
- BRYCHTOVÁ, S. a A. HLOBILKOVÁ, 2008. *Histopatologický atlas*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-1650-3.
- CAI, H. a G. HARRISON, 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Oxidant signaling in cardiovascular cells*. s. 840–844.
- Dako EnVision+ System-HRP (DAB)* [online]. [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.dako.com/dist/download.pdf?objectid=107802003>
- DAVIES, M. J., J. L. GORDON, A. J H GEARING, R. PIGOTT, N. WOOLF, D. KATZ a A. KYRIAKOPOULOS, 1993. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *Journal of Pathology* [online]. roč. 171, s. 223–229. ISSN 00223417. Dostupné z: doi:10.1002/path.1711710311

DAVIGNON, Jean a Peter GANZ, 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* [online]. roč. 109, s. III27–I32. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8

DIAS, Rodrigo Gonçalves, Carlos Eduardo NEGRÃO a Marta Helena KRIEGER, 2011. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arquivos brasileiros de cardiologia* [online]. roč. 96, s. 68–75. ISSN 1678-4170. Dostupné z: doi:10.1016/j.pcad.2006.03.001

DYLEVSKÝ, I., 2009. *funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3240-4.

FONSATTI, Ester, Hugues J M NICOLAY, Maresa ALTOMONTE, Alessia COVRE a Michele MAIO, 2010. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: A novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovascular Research* [online]. roč. 86, s. 12–19. ISSN 00086363. Dostupné z: doi:10.1093/cvr/cvp332

FÖRSTERMANN, Ulrich, 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* [online]. roč. 459, č. 6, s. 923–939. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-010-0808-2

FÖRSTERMANN, Ulrich a William C. SESSA, 2012. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal* [online]. roč. 33, s. 829–837. ISSN 0195668X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehr304

GOLIAS, C. H., E. TSOUTSI, a. MATZIRIDIS, P. MAKRIDIS, a. BATISTATOU a K. CHARALABOPOULOS, 2007. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo*. roč. 21, s. 757–770. ISSN 0258851X.

HIGASHI, Yukihiro, Kensuke NOMA, Masao YOSHIZUMI a Yasuki KIHARA, 2009. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* [online]. roč. 73, č. 3, s. 411–418. ISSN 1346-9843. Dostupné z: doi:10.1253/circj.CJ-08-1102

HUA, Susan, 2013. Targeting sites of inflammation: Intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. *Frontiers in Pharmacology* [online]. roč. 4 OCT, č. October, s. 1–6. ISSN 16639812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2013.00127

IKEMOTO, Tomokazu, Yukihiro HOJO, Hideyuki KONDO, Nozomu TAKAHASHI, Masahiro HIROSE, Yoshioki NISHIMURA, Takaaki KATSUKI, Kazuyuki SHIMADA a Kazuomi KARIO, 2012. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart and Vessels* [online]. roč. 27, s. 344–351. ISSN 09108327. Dostupné z: doi:10.1007/s00380-011-0163-z

ImmPRESS HRP Anti-Rat Ig (Peroxidase) Polymer Detection Kit [online]. [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?prodID=1729>

Introduction to Immunohistochemistry [online]. [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: http://www.ihcworld.com/_intro/ihc-methods.htm

JANG, Young-saeng a In-hong CHOI, 2014. Contrasting Roles of Different Endoglin Forms in Atherosclerosis. roč. 14, č. 5, s. 237–240.

JERKIC, Mirjana, Juan V. RIVAS-ELENA, Marta PRIETO, Rosalia CARRÓN, Francisco SANZ-RODRÍGUEZ, Fernando PÉREZ-BARRIOCANAL, Alicia RODRÍGUEZ-BARBERO, Carmelo BERNABÉU a J. M. LÓPEZ-NOVOA, 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. roč. 18, s. 609–611. ISSN 15306860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.03-0197fje

JÍLEK, P., 2014. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-4822-1.

JOSEPH-SILVERSTEIN, J. a RL SILVERSTEIN, 1998. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest.* roč. 16, s. 176–182.

KARÁSEK, David a Helena VAVERKOVÁ, 2004. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi* [online]. s. 450–453. Dostupné z: www.internimedicina.cz

KARETOVÁ, Debora, 2002. Význam Endotelu Pro Rozvoj Kardiovaskulárních Chorob. *Interní medicína* [online]. s. 119–122. Dostupné z: www.solen.cz

KIM, Mikyung, Chang-Ho HAN a Moo-Yeol LEE, 2014. NADPH oxidase and the cardiovascular toxicity associated with smoking. *Toxicological research* [online]. roč. 30, č. 3, s. 149–57. ISSN 1976-8257. Dostupné z: doi:10.5487/TR.2014.30.3.149

KÖLBEL, F., 2011. *Praktická kardiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1962-0.

KONRÁDOVÁ, V., J. UHLÍK a L. VAJNER, 2000. *Funkční histologie*. 2. vyd. Praha: H&H. ISBN 80-86022-80-3.

KOSTNER, Gerhard M., 2003. Ursachen der gefäßSchäden: Endothelfunktion, morphologie und biochemie der atherosklerose. *Pharmazie in Unserer Zeit* [online]. roč. 32, č. 6, s. 458–463. ISSN 00483664. Dostupné z: doi:10.1002/pauz.200300044

LAWSON, Charlotte a Sabine WOLF, 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports* [online]. roč. 61, s. 22–32. ISSN 17341140. Dostupné z: doi:10.1016/S1734-1140(09)70004-0

LÓPEZ-NOVOA, José M a Carmelo BERNABEU, 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [online]. roč. 299, s. H959–H974. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.01251.2009

MACÍAS, Consuelo, Rinaldo VILLAESCUSA, Lázaro DEL VALLE, Víctor BOFFIL, Girelda CORDERO, Alberto HERNÁNDEZ, Porfirio HERNÁNDEZ a José Manuel BALLESTER, 2003. Endothelial adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in patients with acute coronary syndrome. *Revista española de cardiología*. roč. 56, č. September 2002, s. 137–144. ISSN 0300-8932.

MATTILA, Joshua T. a Anita C. THOMAS, 2014. Nitric Oxide Synthase: Non-Canonical Expression Patterns. *Frontiers in Immunology* [online]. roč. 5, č. October, s. 1–5. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00478

NACHTIGAL, Petr, Lenka ZEMANKOVA VECEROVA, Jana RATHOUSKA a Zbynek STRASKY, 2012. *The role of endoglin in atherosclerosis* [online]. 2012. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.001

NAKASHIMA, Y, E W RAINES, A S PLUMP, J L BRESLOW a R ROSS, 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [online]. roč. 18, s. 842–851. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/01.ATV.18.5.842

NEMECKOVA, Ivana, Agnieszka SERWADCZAK, Barbara OUJO, Katerina JEZKOVA, Jana RATHOUSKA, Petra FIKROVA, Michala VAREJCKOVA, Carmelo BERNABEU, Jose M. LOPEZ-NOVOA, Stefan CHLOPICKI a Petr NACHTIGAL, 2015. High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Endothelial Dysfunction in Mouse Aorta. *PLOS ONE* [online]. roč. 10, s. e0119665. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0119665

OŠŤÁDAL, B. a M. VÍZEK, 2003. *Patologická fyziologie srdce a cév*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0597-X.

PAULÍK, M. a J. BARTUŇKOVÁ, 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-3533-7.

PENNATHUR, S. a J. HEINECKE, 2007. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Current diabetes reports*. roč. 7, č. 4, s. 257–264.

RAHMAN, Arshad a Fabeha FAZAL, 2009. Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxidants & redox signaling* [online]. roč. 11, č. 4, s. 823–839. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2008.2204

STEYERS, Curtis M. a Francis J. MILLER, 2014. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. roč. 15, s. 11324–11349. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms150711324

STRASKY, Zbynek, Lenka VECEROVA, Jana RATHOUSKA, Martina SLANAROVA, Eva BRCAKOVA, Zdenka KUDLACKOVA, Ctirad ANDRYS, Stanislav MICUDA a Petr NACHTIGAL, 2011. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circulation journal* :

official journal of the Japanese Circulation Society [online]. roč. 75, s. 1747–1755. ISSN 1346-9843. Dostupné z: doi:10.1253/circj.CJ-10-1285

ŠTEJFA, M., 2007. *Kardiologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-1385-4.

ULFIG, N., 2011. *Kurzlehrbuch Histologie*. 3. vyd. Stuttgart: Thieme. ISBN 978-3-13-169083-8.

VALBUENA-DIEZ, Ana C., Francisco J. BLANCO, Barbara OUJO, Carmen LANGA, María GONZALEZ-NUÑEZ, Elena LLANO, Alberto M. PENDAS, Mercedes DÍAZ, Antonio CASTRILLO, José M. LOPEZ-NOVOA a Carmelo BERNABEU, 2012. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* [online]. roč. 126, s. 2612–2624. ISSN 00097322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101261

VECTASTAIN ABC Systems [online].]cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=42>

VENKATESHA, Shivalingappa, Mourad TOPORSIAN, Chun LAM, Jun-ichi HANAI, Tadanori MAMMOTO, Yeon M KIM, Yuval BDOLAH, Kee-Hak LIM, Hai-Tao YUAN, Towia A LIBERMANN, Isaac E STILLMAN, Drucilla ROBERTS, Patricia A D'AMORE, Franklin H EPSTEIN, Frank W SELKE, Roberto ROMERO, Vikas P SUKHATME, Michelle LETARTE a S Ananth KARUMANCHI, 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine* [online]. roč. 12, s. 642–649. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1429

WALSHE, Tony E., Vandana S. DOLE, Arindel S R MAHARAJ, Ian S. PATTEN, Denisa D. WAGNER a Patricia A. D'AMORE, 2009. Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. roč. 29, s. 1185–1192. ISSN 10795642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.109.186742

WARD, J. a R. LINDEN, 2010. *Základy fyziologie*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-667-0.

WOLF, Sabine I a Charlotte LAWSON, 2012. ICAM-1 : Contribution to Vascular Inflammation and Early Atherosclerosis. *Coronary Artery Disease – New Insights and Novel Approaches*. s. 65–90.