

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



**Sledování exprese a koexprese endoglinu a P-selectinu v aortě  
apoE-deficientních myší**

**Evaluation of endoglin and P-selectin expression and co-expression in  
aortas of apoE-deficient mice**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce  
Hradec Králové 2014

Mgr. Jana Rathouská  
Monika Brlicová

„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:

„Velice ráda bych poděkovala Mgr. Janě Rathouské za odborné vedení, podnětné připomínky a příjemnou spolupráci při sestavování této diplomové práce. Také děkuji všem pracovníkům Katedry biologických a lékařských věd za ochotu a pomoc i mimo rámec své vlastní práce.“

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Sledování exprese a koexprese endoglinu a P-selektinu v aortě apoE-deficientních myší

Diplomová práce

Monika Brlicová

Vedoucí práce: Mgr. Jana Rathouská

Cíl práce: Sledovali jsme expresi a vzájemnou koexpresi endoglinu (receptoru III pro TGF- $\beta$  cytokin) a P-selektinu (adhezní molekuly a markeru endoteliální dysfunkce) v ascendentních aortách apoE-deficientních myší krměných standardní dietou pro hlodavce a dietou západního typu (vysokotukovou dietou) pro dosažení různých fází aterosklerotického, procesu. Rovněž byly hodnoceny změny celkových hladin cholesterolu u myší po podání obou typů diet.

Metody: Pro tuto diplomovou práci byl použit modifikovaný kmen C57BL/6J myší s deficitem apolipoproteinu E, který je náchylný k aterogenezi. Myši byly rozděleny do tří skupin. První skupina byla krměna standardní dietou (tzv. „chow“ dieta) po dobu dvou měsíců a další dvě skupiny západním typem diety (tzv. „Western type“ dieta) po dobu dvou a čtyř měsíců. U všech skupin byly biochemicky stanoveny a následně jsme statisticky hodnotili hladiny celkového cholesterolu v krvi. Imunohistochemické metody nám umožnily detekovat expresi a případnou koexpresi endoglinu a P-selektinu v řezech ascendentní aorty.

Výsledky: Biochemická analýza ukázala signifikantně vyšší hladiny celkového cholesterolu v krvi u myší krměných západním typem diety po dobu dvou měsíců oproti myším krměným standardní dietou. Naopak nesignifikantní rozdíly hladin celkového cholesterolu v krvi byly zjištěny mezi skupinami myší krměných západním typem diety po dobu dvou a čtyř měsíců. Zvýšená exprese endoglinu byla viditelná u myší krměných západním typem diety po dobu dvou měsíců oproti myším krměným standardní dietou, a to na povrchu endotelu pokrývajícího aterosklerotický plát (ve skupině „chow“ diety nebyly pláty v ascendentní aortě pozorovány). Naproti tomu

exprese P-selektinu byla patrná pouze v oblastech endotelu bez plátu. Imunohistochemické metody tedy neukázaly žádné významné koexprese endoglinu a P-selektinu.

Závěr: Dieta s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin a cholesterolu vede k významně vyšším hladinám celkového cholesterolu v krvi oproti myším na standardní dietě. V případě hodnocení exprese endoglinu a P-selektinu nebyly pozorovány žádné významné lokality koexprese obou těchto molekul, což naznačuje, že se endoglin patrně nepodílí na akumulaci leukocytů v aortě apoE deficientních myši v úvodní fázi aterogeneze.

## **Abstract**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Evaluation of endoglin and P-selectin expression and co-expression in aortas of apoE-deficient mice

Diploma thesis

Monika Brlicová

Supervisor: Mgr. Jana Rathouská

Background: We observed the expression and the reciprocal co-expression of endoglin (receptor III for TGF- $\beta$  cytokine) and P-selectin (adhesion molecule and marker of endothelial dysfunction) in ascending aortas of apoE-deficient mice which were fed by standard diet for rodents and Western type diet (high-cholesterol diet) for achieving of different phases of the atherosclerotic process. The changes of total cholesterol levels in mice after administration of both types of diets were also evaluated.

Methods: The modified strain C57BL/6J of mice with a deficiency of apolipoprotein E, which is prone to atherogenesis was used for this diploma thesis. Mice were divided into three groups. The first group was fed by standard diet (so-called „chow“ diet) for a period of two months and the second two groups were fed by Western type diet for a period of two and four months. The levels of total cholesterol in the blood were biochemically determined and then we statistically evaluated these levels in all groups. Immunohistochemical methods have allowed us to detect expression and potential co-expression of endoglin and P-selectin in sections of ascending aorta.

Results: Biochemical analysis showed significantly increased total cholesterol levels in the blood in mice fed by Western type diet for a period of two months against mice fed by a standard diet. On the contrary a nonsignificant change in total cholesterol levels in the blood was observed among groups of mice fed by Western type diet for a period of two and four months. Increased expression of endoglin was shown in mice fed by Western type diet for a period of two months against mice, which were fed by standard diet on the whole endothelial surface covering atherosclerotic plaque (in the group of

„chow“ diet the plates were not observed in the ascending aorta). On the other hand the expression of P-selectin was seen only in areas of endothelium without plates. Immunohistochemical methods didn't show any significant co-expression of endoglin and P-selectin.

Conclusions: The diet with high content of saturated fat and cholesterol leads to the significantly higher levels of total cholesterol in the blood against the mice with the standard diet. No significant locations of co-expression were shown in both of these molecules in the evaluation of the expression of endoglin and P-selectin. This conclusion suggesting that endoglin (is not probably involved) in the accumulation of leukocytes in the aorta of apoE-deficient mice in the initial phase of atherogenesis.

# Obsah

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Mikroskopická anatomie cév .....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Obecná struktura cévní stěny .....	11
2.1.2. Aorta .....	14
<b>2.2. Funkce endotelu .....</b>	<b>15</b>
2.2.1. Regulace cévní permeability .....	15
2.2.2. Regulace cévního tonu.....	15
2.2.3. Ovlivnění koagulace .....	16
2.2.4. Reparativní proces a angiogeneze .....	16
<b>2.3. Endoteliální dysfunkce .....</b>	<b>17</b>
2.3.1. Příčiny endoteliální dysfunkce .....	17
<b>2.4. Ateroskleróza.....</b>	<b>18</b>
2.4.1. Etiologie .....	18
2.4.2. Patogeneze .....	19
2.4.3. Klinická manifestace, komplikace a prognóza .....	21
<b>2.5. Endoglin.....</b>	<b>21</b>
2.5.1. Gen a exprese .....	21
<b>2.6. Adhezní molekula (P-selektin ) .....</b>	<b>23</b>
2.6.1. Gen a regulace .....	23
2.6.2. Struktura .....	23
2.6.3. Ligand.....	24
2.6.4. Funkce .....	25
<b>2.7. Apolipoproteiny .....</b>	<b>25</b>
2.7.1. Apolipoprotein E .....	25
<b>2.8. ApoE-deficientní model myši.....</b>	<b>26</b>
<b>2.9. Imunohistochemie .....</b>	<b>27</b>
2.9.1. Typy IHC metod.....	27
<b>3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>29</b>



<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Použitá zvířata, jejich chov a krmení .....</b>	<b>30</b>
4.1.1. Imunohistochemie .....	31
4.1.2. Statistická analýza .....	35
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1. Biochemická analýza .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Imunohistochemie .....</b>	<b>37</b>
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>40</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ .....</b>	<b>43</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK .....</b>	<b>43</b>
<b>10. SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ .....</b>	<b>43</b>
<b>11. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>44</b>
<b>12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>46</b>

# 1. ÚVOD

Ateroskleróza patří mezi civilizační onemocnění 20. století a její nárůst je v dnešní době oproti minulosti velmi intenzivní. Možná se to zdá paradoxní, ale aterosklerotické onemocnění je především ve vyspělých zemích západního světa jednou z nejčastějších příčin úmrtí a Česká republika bohužel není výjimkou.

Výzkum zaměřený na aterosklerózu a faktory ji ovlivňující, se z tohoto důvodu provádí po celém světě. Ani tým katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové v čele s doc. PharmDr. Petrem Nachtigalem, Ph.D. nezaostává. Výzkum na této katedře je zaměřen na studie týkající se aterosklerózy a provádí se převážně *in vitro* a *in vivo*.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na bílkoviny, které mají vliv na vznik aterosklerózy a to na endoglin (TGF- $\beta$  receptor III) a adhezní (zánětlivou) molekulu P-selektin. V dřívějších studiích již byl prokázán protektivní vliv endoglinu na aterogenezi v tepnách zatížených vysokým celkovým cholesterolem v krvi. Nyní jsme se však zaměřili na expresi a případnou koexpresi endoglinu a P-selektinu v ascendentních částech aort apoE-deficientních myší tzn. myší s větším potenciálem pro vznik aterosklerotických lézí, neboť právě zde byly zjištěny změny v expresi endoglinu v průběhu aterogeneze.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Mikroskopická anatomie cév

Histologická stavba cévní stěny odpovídá funkčním nárokům jednotlivých úseků krevního řečiště. Cévy se tedy rozdělují podle těchto úseků na tepny – *arteriae*, které se dále větví na tenčí až nejtenčí arterioly – *arteriolae*, arterioly přechází ve vlasečnice, kapiláry – *vasa capillaria*. Tyto pak přechází v nejtenčí žíly, venuly – *venulae*, které se nakonec sbíhají v žíly – *venae* [1].

#### 2.1.1. Obecná struktura cévní stěny

Struktura všech cév v lidském těle je uspořádána podle stejného základního stavebního plánu. Skládá se z tří vrstev, které nazýváme *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia* [2].

##### Tunica intima

Je složena ze dvou vrstev, první je tvořena endotelovými buňkami, lemujícími vnitřní povrch cév a druhou vrstvou subendotelovou.

Endotelové buňky jsou tvarem ploché mnohoúhelníky. Ve směru proudu krve jsou obvykle protáhlé a vysílají laterálně úzké výběžky, které mohou mít v průměru i 0,2  $\mu\text{m}$ . Jádro těchto buněk je rovněž protáhlé a uloženo ve střední části buňky. Centrální oblast buňky se vyklenuje do lumina cévy. Poblíž jádra se nachází malý Golgiho komplex, malé množství mitochondrií, několik ribozomů a pouze ojedinělé malé cisterny granulárního endoplazmatického retikula. Vyskytují se zde i elementy cytoskeletu. Jejich přítomnost zřejmě souvisí s předpokládanou schopností těchto buněk se do určité míry smršťovat [2].

Mezi jednotlivými endotelovými buňkami se vyvinuly početné zonulae occludentes a nexy. Buňky endotelu cév vykazují pouze nízkou mitotickou aktivitu, a tedy patří mezi tzv. dlouhožijící elementy. Jejich funkcí je bránit styku krevních destiček se subendotelovou tkání, tím jejich shlukování a vzniku trombů. Endotelové buňky mají tedy antitrombogenní účinek, ale vykazují také značnou vlastní metabolickou aktivitu.

Subendotelová vrstva je tvořena řídkým kolagenním vazivem a jednotlivými buňkami hladkého svalstva [2].

### Tunica media

Tunica media je nejsilnější vrstva stěny tepny. Skládá se z hojně se vyskytujících buněk hladké svaloviny, kolem nichž jsou sítě elastických a kolagenních vláken. Poměr mezi elastickou a svalovou složkou je u různých tepen různý, záleží na velikosti tepen. Mezi velké tepny, ve kterých převládá elastická složka nad svalovou, patří například *aorta*, *arteriae carotides*, *arteria subclavia*, *arteria axilaris*.

Ve středně velkých tepnách jsou elastická a svalová složka v rovnováze a postupně se s větvením tepen na menší tepénky množství svalové hmoty zvětšuje na úkor složky elastické. Tato rozdílná anatomie je dána jejich rozdílnou funkcí v organismu. Zatímco velké tepny se musí při systolickém nárazu rozpínat a při diastole smršťovat a tím umožňovat pohánění a rovnoměrnější proud krve, tak menší tepny svalového typu mají spíše regulační funkci, která umožňuje měnit průsvit tepny a regulovat tak přísun krve do jednotlivých oblastí těla. V žilách je tato vrstva tenčí a obsahuje mnohem méně hladké svaloviny než tepny [1].

Někdy elastické struktury vytvářejí na hranicích tunica media vrstvu, která ji odděluje od tunica intima z vnitřní strany, nazývá se *membrana elastica interna* a od tunica adventitia z vnější strany, *membrana elastica externa*.

Buňky hladkého svalu zde produkují mezibuněčnou hmotu, složenou především z glukosaminoglykan chondroitinsulfátu a proteoglykanu [2].

### Tunica adventitia

Cévní adventicie tvoří povrchovou vrstvu cévy. Je tvořena kolagenními a elastickými vlákny, které se na povrchu cévy síťovitě překřížují a spojují povrch cévy s vazivem vyskytujícím se v nejbližším okolí cévy. Její funkcí je tedy pružně připevnit cévu k okolí [1].

Z buněk zde nacházíme fibroblasty, adipocyty, ale mohou se zde vyskytovat i buňky hladkého svalu. Je zde přítomen převážně kolagen typu I, dále glykosaminoglykan dermatansulfát a v malé míře i heparansulfát [2].

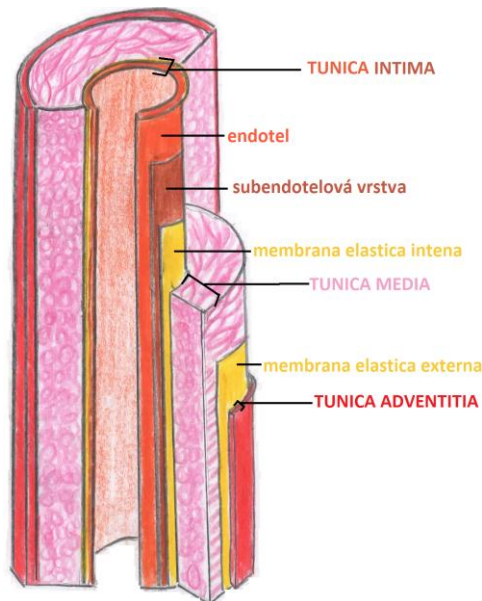
### Vasa vasorum

Protože stěny některých tepen jsou relativně silné, nestačí přívod kyslíku a živin pouze z protékající krve difuzí stěnou, ale živiny a kyslík do stěny tepen přivádějí slabé tepénky a odvádějí tenoučké žilky, které stěnou cév podélně probíhají. Tyto vyživující cévy se souhrnně nazývají *vasa vasorum*. Vycházejí buď přímo z tepny,

kteřou zásobují nebo z nejbližší sousední tepny. Vasa vasorum v tepnách vyživují hlavně adventicii a vnější část tunica media. Vnitřní část tunica media a tunica intima je vyživována difuzí z nitra tepny [1].

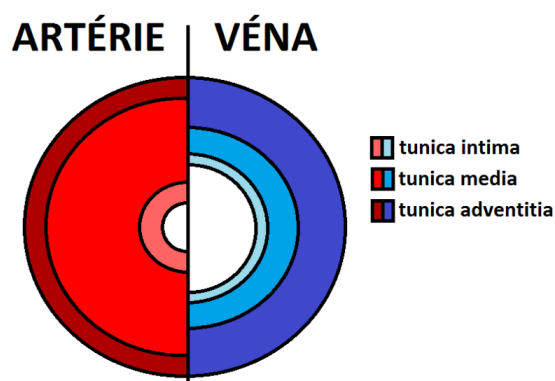
V žilách jsou ovšem vasa vasorum vyvinuta mnohem lépe a jejich větve dosahují až do tunica intima. Je to dáno menším obsahem kyslíku ve venózní krvi [2].

**Obrázek 1:** Arterie svalového typu



[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arterie\\_vena2.png](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arterie_vena2.png) (10.2 .2014)

**Obrázek 2:** Srovnání struktury arterie a vény při stejné tloušťce



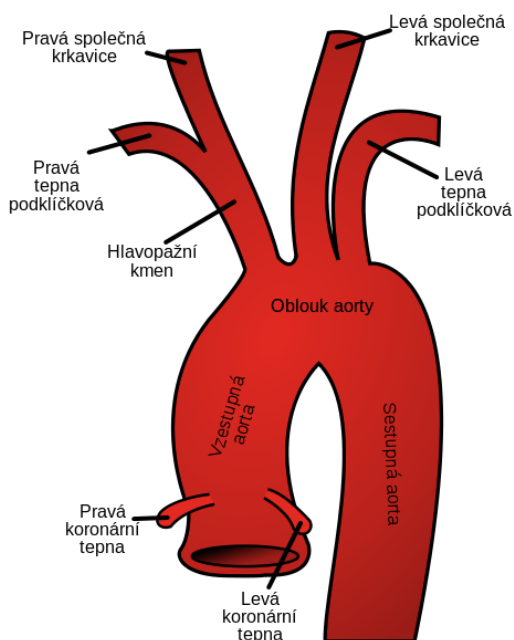
[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arterie\\_vena.png](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arterie_vena.png) (10.2 .2014)

### 2.1.2. Aorta

Krevní oběh se skládá z malého a velkého krevního oběhu. Malý krevní oběh začíná v pravé srdeční komoře a pokračuje jako pravá a levá plicní tepna do pravé a levé plic. Velký krevní oběh začíná v levé srdeční komoře a pokračuje aortou do celého těla.

Aorta se dělí na *aorta ascendens* (vzestupnou aortu) dlouhou asi 4-5 cm, dále se stáčí doleva a dozadu v *arcus aortae* (aortální oblouk), který po 6 cm pokračuje kolem hrudní a břišní páteře jako *aorta descendens* (sestupná aorta). Vzestupná aorta má těsně nad aortální chlopní tři sinus aortae (aortální výklenky), ze kterých vycházejí *a. coronaria dextra et sinistra* (pravá a levá věnčitá tepna). Z aortálního oblouku vycházejí 3 hlavní tepny, *truncus brachiocephalicus* (hlavopažní kmen), *a. carotis communis sinistra* (levá společná krkavice) a *a. subclavia sinistra* (levá tepna podklíčková). *A. brachiocephalica* se dále dělí v *a. carotis communis dextra* (pravá společná krkavice) a *a. subclavia dextra* (pravá tepna podklíčková). Z těchto 4 tepen se krev vrací do pravé srdeční síně jako *vena cava superior* (horní dutá žíla) a ze sestupné části aorty tzn. z dolní části těla jako *vena cava inferior* (dolní dutá žíla) [1].

**Obrázek 3:** Oblouk aorty



[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arcus\\_aortae.png](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Arcus_aortae.png) (10.2 .2014)

## **2.2. Funkce endotelu**

Endotel tvoří jednovrstevnou vnitřní výstelku celého kardiovaskulárního systému. Tato vrstva plochých buněk tvoří přímé rozhraní mezi krví a cévní stěnou [4]. Dříve se předpokládalo, že endotel představuje pouze buněčnou bariéru, oddělující krev od stěny cév a tvoří nesmáčivý povrch cévního lumen. Řada výzkumů v posledních letech však prokázala, že endotel je metabolicky velmi aktivní orgán s velkou spoustou fyziologických funkcí [5, 7].

### **2.2.1. Regulace cévní permeability**

Jednou z hlavních úloh endotelu je zajistit řízený prostup buněčných i nebuněčných krevních komponent mezi krví a okolními tkáněmi. Zatímco nebuněčné komponenty prostupují přes endotelovou vrstvu buď paracelulárně nebo transcelulárně, tak prostup buněčných krevních komponent, převážně leukocytů, je realizován díky vazoadhezním molekulám, kterých endotel exprimuje na svém povrchu celou řadu (P-selektin, E-selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) [4, 5].

### **2.2.2. Regulace cévního tonu**

Druhou, neméně významnou funkcí endotelu je kontrola cévního tonu. Hlavní vazodilatační látky produkované těmito buňkami jsou oxid dusný (NO, též EDRF) a prostacyklin (PGI<sub>2</sub>). Tvorba EDRF je zprostředkována NO-syntházou, aktivovanou smykovým třením krevního proudu, hypoxií a celou řadou lokálních působků (acetylcholin, histamin, bradykinin, angiotenzin II aj.). Oxid dusný inhibuje expresi adhezních molekul, adhezi a agregaci krevních destiček, apoptózu endotelových buněk a brzdí migraci myocytů z tunica media, jejich proliferaci a transformaci v sekreční buňky. PGI<sub>2</sub> je produkován za obdobných situací jako oxid dusný a jejich účinek se navzájem potencuje.

Aby se udržela rovnováha mezi vazodilatací a vazokonstrikcí musí existovat i látky, které mají vazokonstrikční účinky, takovými to látkami jsou především endotelin-1, dále tromboxan A<sub>2</sub> a PAF.

Endotelin-1 je syntetizován po stimulaci aterogenních proteinů (trombin), či lipoproteinů (oxidovaný LDL). Tato neúčinnější vazokonstrikční látka, která také stimuluje proliferaci myocytů v medii je ve zdravých cévách mírněna současnou produkcí NO a PGI<sub>2</sub>. Jeho plný účinek se objeví až při endoteliální dysfunkci (viz kap. 2.3.).

Posledním mechanismem regulace cévního tonu endotelem je změna v aktivitě glykoproteinu angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE) na povrchu endotelových buněk. ACE zvyšuje hladinu angiotenzinu II a rozkládá bradykinin, tím tedy v cévním řečišti zvyšuje krevní tlak [5 , 6 , 10].

### **2.2.3. Ovlivnění koagulace**

Nepoškozený cévní endotel zajišťuje dokonalou integritu a nesmáčivost cévního povrchu. Již při pouhém odloupení buněk endotelu se z něj uvolní von Willebrandův faktor (vWF), který prostřednictvím receptorů na trombocytech aktivuje jejich adhezi, agregaci a jejich navázání na kolagenní vlákna subendotelu.

Endotel na svém povrchu dále váže antitrombin III, který inaktivuje trombin (aktivní forma srážecího faktoru II) a vzniklý komplex je z krevního řečiště odstraněn. Endotel dále produkuje trombomodulin, který tvoří komplex s trombinem a tím ho inaktivuje. Trombomodulin také aktivuje protein C a tím brání koagulaci. Protein C totiž v komplexu s proteinem S inaktivuje srážecí faktory (Va a VIIa) a tím inhibuje srážení krve [5 , 6 , 8 , 10].

### **2.2.4. Reparativní proces a angiogeneze**

Endotel produkuje i řadu růstových faktorů a cytokinů. Tyto mitogeny stimulují růst hladkých svalových buněk a jejich migraci do hlubších vrstev cévní stěny. Hlavním antimitogenem, který zabraňuje hypertorfii cévní stěny je již více zmíněný NO [5 ].



## **2.3. Endoteliální dysfunkce**

Endoteliální dysfunkce (ED) je první fází (prvním signálem) řady kardiovaskulárních onemocnění, především aterosklerózy [4]. Je to plně reverzibilní předstupeň aterosklerózy, který může dát vzniknout prvním morfologicky viditelným změnám arteriální stěny, ale může provázet i pozdní stádia pokročilé aterosklerózy [11].

Jedná se o funkční poškození endotelové výstelky, které se projeví zvýšenou permeabilitou cévní stěny, hlavně pro aterogenní lipidy a makrofágy, poruchou rovnováhy mezi vazoaktivními a hemokoagulačními faktory a samozřejmě i poruchou angiogeneze. Výsledkem je převaha vazospazmů, tendence k trombóze a nedostatečná inhibice subendotelové proliferace [11].

Tyto děje provází zvýšená tvorba oxidovaných LDL částic, zvýšená proliferace buněk hladkého svalstva, jejich migrace do subendotelových prostor a tvorba extracelulární matrix (hlavně vazivové komponenty aterosklerotických lézí) [12].

Dysfunkce endotelu zapříčiňuje vyšší průnik aterogenních lipidů, zvýšením exprese adhezních molekul a současnou produkcí cytokinů je umožněna kumulace monocytů v cévní stěně a jejich následná přeměna v makrofágy a pěnové buňky [5, 7, 13].

### **2.3.1. Příčiny endoteliální dysfunkce**

Vznik a rozvoj ED je podmíněn souhrou řady faktorů, které se také nazývají rizikové faktory aterosklerózy. Dnes už jsou známé stovky těchto mechanických, fyzikálně-chemických a imunologických faktorů, ale zůstává pravdou, že nejčastějších spouštěčů endoteliální dysfunkce je mnohem méně. Dají se rozdělit na neovlivnitelné a ovlivnitelné rizikové faktory ED a aterosklerózy. Mezi neovlivnitelné patří pozitivní rodinná anamnéza předčasné manifestace kardiovaskulárních onemocnění (muži > 45, ženy > 55 let), vysoký věk, mužské pohlaví a již existující aterosklerotické postižení tepen. Klást důraz na prevenci je důležité hlavně u ovlivnitelných faktorů jako jsou dyslipidemie, kouření, diabetes mellitus 2. typu, arteriální hypertenze, obezita, metabolický syndrom, aterogenní dieta a nízká fyzická aktivita [11].

## 2.4. Ateroskleróza

Patří mezi civilizační, systémové onemocnění tepenného krevního řečiště, které postihuje hlavně velké a střední tepny. Je to onemocnění, které se častěji vyskytuje ve vyspělých, západních zemích, než v zemích 3. světa. Příčinou je hlavně špatný životní styl tzv. ovlivnitelné rizikové faktory, ale také ty, které ovlivnit nemůžeme tzv. neovlivnitelné rizikové faktory (dědičná familiární hypercholesterolemie, esenciální hypertenze, věk, pohlaví). Ateroskleróza je hlavní příčinou mnoha závažných onemocnění, které v západních zemích tvoří nejčastější příčiny úmrtí (akutní infarkt myokardu a cévní mozková příhoda) [32, 33].

### 2.4.1. Etiologie

Jak již bylo řečeno, mezi příčiny, které mohou za rozvoj aterosklerózy, patří ovlivnitelné rizikové faktory. To jsou takové, za něž může náš životní styl a které by se měly co nejvíce omezit. Dále rizikové faktory neovlivnitelné, za něž může genetická výbava, pozitivní rodinná anamnéza, pohlaví a věk. Tyto faktory jsou stejné, jako u výše zmíněné endoteliální dysfunkce, nicméně pro důležitost uvádím znovu přehledný výčet hlavních rizikových faktorů, viz tabulka 1 [11].

**Tabulka 1:** Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění.

Neovlivnitelné	Ovlivnitelné
<ul style="list-style-type: none"><li>• věk (muži &gt;55, ženy &gt;65)</li><li>• rodinná anamnéza předčasné aterosklerózy (u prvostupňových příbuzných: muži &gt;45, ženy &gt;55)</li><li>• přítomnost onemocnění aterosklerotické etiologie</li><li>• genetické faktory</li><li>• mužské pohlaví</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• arteriální hypertenze</li><li>• dyslipidemie<ul style="list-style-type: none"><li>– celkový cholesterol</li><li>– LDL cholesterol</li><li>– triglyceridy</li><li>– HDL cholesterol</li></ul></li><li>• diabetes mellitus 2. typu</li><li>• nadváha/obezita</li><li>• kouření</li><li>• nízká fyzická aktivita</li><li>• metabolický syndrom</li><li>• hsCRP</li><li>• chronické onemocnění ledvin</li><li>• homocysteinemie</li></ul>

[http://zdravi.e15.cz/news/check-pro?id=300855&seo\\_name=priloha-lekarske-listy](http://zdravi.e15.cz/news/check-pro?id=300855&seo_name=priloha-lekarske-listy)  
(13.3 .2004)

### 2.4.2. Patogeneze

Ateroskleróza je díky přítomnosti zánětlivých buněk považována za zánětlivé onemocnění. Závažné ateroskleróze předchází ještě reverzibilní endoteliální dysfunkce, která ovšem zvýší propustnost cév pro LDL-cholesterol, aktivuje endotelové buňky, jenž na svém povrchu vystaví adhezní molekuly, zvýší proliferaci buněk hladkého svalstva cév a tím umožní propuknutí již nereverzibilního procesu aterogeneze [35].

Prvním krokem aterogeneze je vstup LDL-cholesterolu přes cévní stěnu do subendotelové vrstvy, kde se oxiduje působením reaktivních forem kyslíku a dusíku, které nebyly zneškodněny antioxidantním mechanismem. Akumulace oxidovaných LDL-částic způsobí aktivaci endotelu. Adhezní molekuly na povrchu aktivovaného endotelu přitahují T-lymfocyty a monocyty z krevního řečiště a zmnožené hladké svalové buňky z medie. [34].

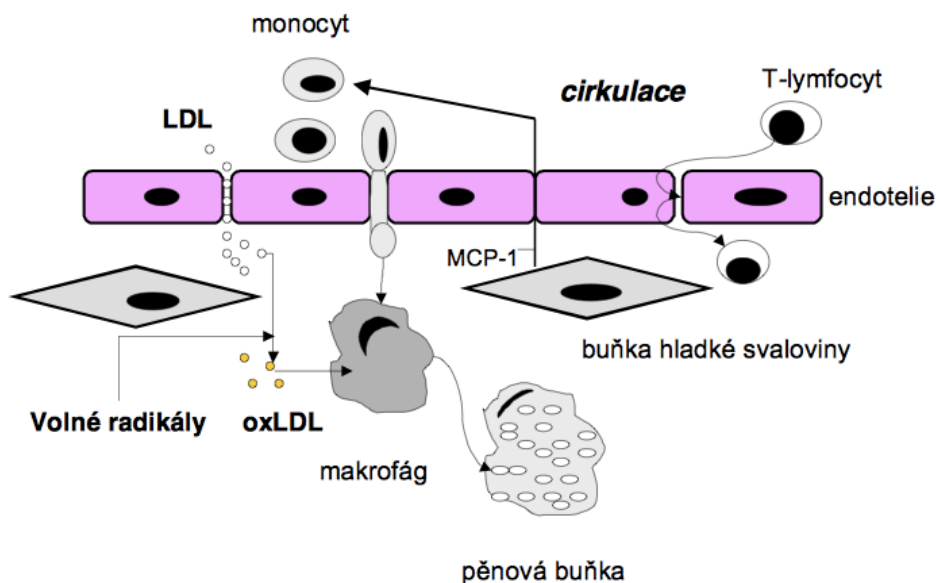
Dalším krokem je vstup makrofágů (přeměněné monocyty) a T-lymfocytů do subendotelové vrstvy cév. Tyto makrofágy následně pohlcují cholesterol (uvolněný z oxidovaného LDL) a hladké svalové buňky v subendotelu. Subendotelová vrstva se stále zvětšuje i nadále proliferujícími aktivovanými svalovými buňkami a zvýšenou tvorbou extracelulární matrix. Toto ztlustění je nejprve kompenzováno vazodilatací a cévní lumen zůstává zpočátku nezměněno (fenomén remodelace), ale pokračujícím zánětem se stále zvyšuje počet makrofágů a T-lymfocytů, které pohlcují oxidovaný LDL-cholesterol. Takto naplněné makrofágy nazýváme pěnovými buňkami a makroskopicky se na vnitřní straně cév projeví jako lipidové proužky [34].

Aktivace makrofágů a T-lymfocytů navodí zvýšené uvolňování cytokininů, chemokininů, hydrolytických enzymů a růstových faktorů, které způsobí další poškození nebo až ložiskovou nekrózu. Takto vzniklé lipidové jádro s nekrotickými hmotami se pokrývá vazivovou čepičkou a vzniká tzv. ateromový plát. Fáze vzniku ateromového plátu je již pokročilým, komplikujícím stádiem aterogeneze [34].

Ateromový plát má hrubý povrch, na který se zachytávají trombocyty krevního řečiště. Tyto trombocyty se aktivují, uvolňují další cytokininy, růstové faktory a zveřejní na svém povrchu adhezní molekuly. Krevní destičky, ale také produkují kyselinu arachidonovou, která se působením cyklooxygenázy (COX) přemění na prostaglandiny (tromboxan  $A_2$ ), který způsobí vazokonstrikci cévy a ještě zvýší agregaci trombocytů. Dokud vazivová čepička, složená z kolagenu, elastinu, buněk hladkého svalstva, pěnových buněk a proteoglykanů, zůstane dostatečně tlustá, je ateromový plát stabilní. Vážné nebezpečí hrozí, jestliže se čepička ztenčí působením

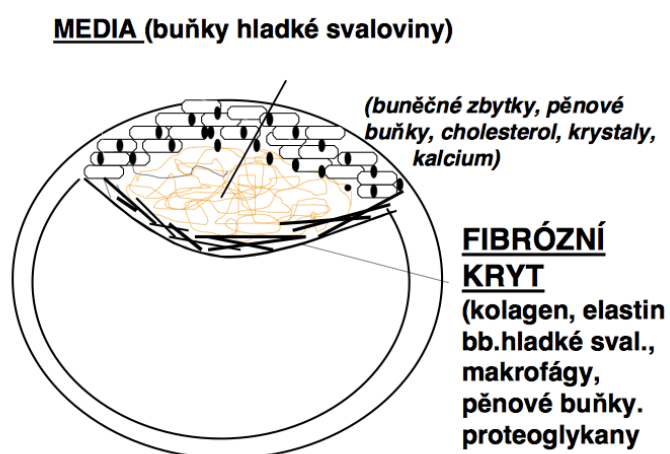
kolagenáz, stromelysinu a elastáz, uvolněných z makrofágů, aktivovaných T-lymfocytů a tedy vznikne nestabilní plát. V takovémto případě hrozí ruptura plátu, průnik krve do nitra a vzniku trombu. Trombus může způsobit ucpaní cévy tzv. trombózu nebo se může uvolnit a způsobit tromboembolii se všemi důsledky, které ucpaná céva má [34].

**Obrázek 4:** Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu



<http://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf> (13. 3 . 2014)

**Obrázek 5:** Schéma ateromového plátu



<http://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf> (13. 3 . 2014)

### **2.4.3. Klinická manifestace, komplikace a prognóza**

Ateroskleróza je asymptomatické onemocnění, které se projeví až svými komplikacemi. Komplikace tohoto onemocnění může velice závažně snížit kvalitu života nebo dokonce způsobit smrt. Záleží, která část krevního řečiště je komplikacemi postižena. Je nutné mít však na paměti, že ateroskleróza postihuje vždy většinu tepenného krevního řečiště a tedy pacient, u kterého došlo k ucpání cévy v srdci, má vysoké riziko recidivy, ale i vzniku nové komplikace v jiné části krevního řečiště. Mezi hlavní, život ohrožující komplikace, patří akutní infarkt myokardu, nestabilní angína pectoris, vznik a ruptura aneuryzmatu a cévní mozková příhoda. Dále mezi ně patří stabilní angína pectoris, ischemická choroba dolních končetin, stenóza renálních tepen a mnoho dalších [35].

Prognóza tohoto onemocnění závisí na místě vzniku komplikace, na jejím rozsahu a rychlosti, s jakou se podaří obnovit průtok krve ischemickou částí [35].

## **2.5. Endoglin**

Endoglin, označovaný také CD105 či END, je glykoprotein membrány, nacházející se na povrchu buněk, hlavně endotelu cév, monocytů, zejména těch, které přechází do makrofágů a buněk hladkých svalů cév [27, 28].

CD105 je homodimer, přičemž obě jeho monomerní jednotky obsahují část extracelulární, část hydrofóbní transmembránovou a krátkou část cytosolickou. Oba monomery jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky.

END je součástí komplexu receptorů pro TGF- $\beta$  (transforming growth factor), má zásadní roli v angiogenezi a tedy je důležitý pro růst nádorů, jejich přežití a metastazování do jiných míst v těle [26].

U myší, geneticky modifikovaných tak, že postrádají gen pro endoglin, bylo prokázáno ukončení vývoje plodu již v embryogenezi a to právě z důvodu inhibice angiogeneze [29].

### **2.5.1. Gen a exprese**

Gen pro endoglin je umístěn na chromosomu 9 a existuje ve 2 alelách, kódujících dvě izoformy endoglinu, L a S. Obě izoformy byly zjištěny jak v lidských, tak v myších tkáních. Mnohem více je v populaci exprimována dlouhá izoforma, L-endoglin, obsahující 633 aminokyselin, než krátký, S-endoglin, který obsahuje pouze

600 aminokyselin. Obě izoformy se liší pouze v počtu aminokyselin cytosolické části molekuly [27].

Lidský endoglin obsahuje peptidovou sekvenci Arg - Gly - Asp (RGD), která je známá jako rozpoznávací místo pro četné, buněčné, adhezní proteiny, přítomné v extracelulární matrix. Tato RGD sekvence byla zjištěna i v endotelu orangutana, ale chybí u myší, prasat, kryš a psů [26].

V klidových endotelových buňkách je exprese endoglinového genu obvykle nízká. To se však změní, jakmile začne patologická angiogeneze a endotelové buňky se stanou aktivní na místech, jako jsou nádorové cévy, zanícené tkáně, pokožka s lupénkou, cévní zranění, během embryogeneze či v endotelových buňkách po ischemii a reperfuzi např. v srdci, dolních končetinách a ledvinách [26].

Endoglin je exprimován i v různých typech krevních cév postižených aterosklerózou. V takovýchto cévách se vyskytuje hlavně na povrchu endotelových buněk a buněk hladkého svalstva, což naznačuje jeho účast na aterogenezi [30].

Endoglin se účastní opravy cévní stěny, tvorby aterosklerotických plátů, zvyšuje produkci kolagenu a tím tedy stabilizuje aterosklerotické léze.

Zvýšená hladina cholesterolu v krvi způsobuje nejen zvýšení hladiny rozpustného endoglinu v krvi, ale také inhibici TGF- $\beta$  signalizace v cévní stěně. Tato inhibice může být jeden z faktorů podporujících dysfunkci endotelu a následnou aterogenezi [30].

Bylo prokázáno, že hypercholesterolémie v cévách bez aterosklerotických lézí způsobuje, u myší kmene C57BL/6 (kmen prokazatelně náchylnější k ateroskleróze), vyšší expresi endoglinu v aortě. Naopak hypercholesterolémie v cévách již postižených aterosklerotickými lézemi, způsobuje inhibici exprese endoglinu v aortě a již zmíněnou inhibici TNF- $\beta$  signalizace. Exprese endoglinu u myší, na rozdíl od lidí, byla prokázána jen na membráně endotelových buněk lumen cév [31].

Dále bylo prokázáno, že léčba statiny snížila hladinu rozpustného endoglinu v krvi, zvýšila expresi endoglinu v aortě a snížila aterosklerózu u myší. Z výše uvedeného se předpokládá, že zvýšená exprese END v cévách a snížená hladina rozpustného endoglinu v krvi zvyšuje TGF- $\beta$  signalizaci a má protektivní vliv na aterosklerózu [30].

## 2.6. Adhezní molekula (P-selektin)

P-selektin, jinak nazývaný také CD62P, GMP-140 (Granule Membrane Protein 140) nebo PADGEM (Platelet Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein), je glykoprotein s navázanou cukernou složkou. Poprvé byl objeven v endotelových buňkách v roce 1982 [37].

CD62P funguje jako molekula buněčné adheze (CAM), vyskytující se na povrchu aktivovaných endotelových buněk a aktivovaných krevních destiček. V neaktivovaných endotelových buňkách je uložen v granulích nazývaných Weibel-Paladova tělíska a v neaktivovaných destičkách se nachází v  $\alpha$ -granulích [37].

### 2.6.1. Gen a regulace

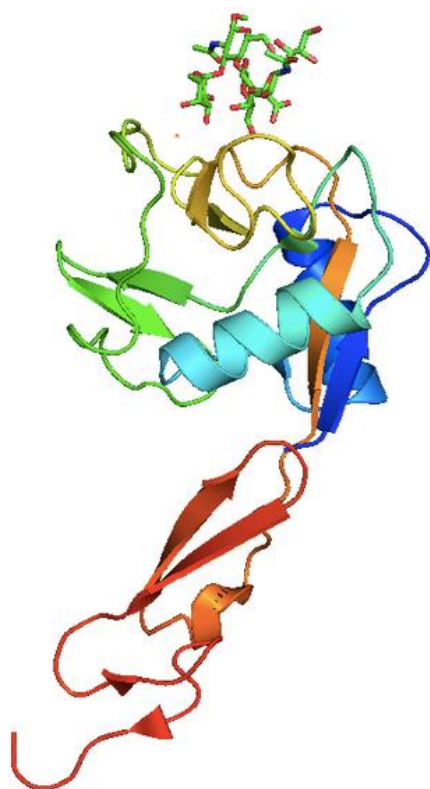
P-selektin je u lidí kódován genem nazývaným SELP, umístěným na chromozomu 1q21-Q24 [36, 38]. CD62P je nadměrně exprimován na megakaryocytech (prekurzory krevních destiček) a endotelových buňkách [39].

Exprese P-selektinu se skládá ze dvou odlišných mechanismů. Zaprvé, P-selektin je syntetizován megakaryocyty a endotelovými buňkami, kde se zařazuje do membránových sekrečních granulí [40]. Když jsou megakaryocyty a endotelové buňky aktivovány působením agonistů, jako je trombin nebo zánětlivé cytokiny (IL-4, IL-13), P-selektin je rychle translokován z granulí do plazmatické membrány [41, 45]. Za druhé, zvýšená hladina mRNA a P-selektinu je indukována zánětlivými mediátory, jako je například TNF- $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ), LPS (lipopolysacharid) a IL-4. Zatímco TNF- $\alpha$  a LPS nejsou spojeny se zvýšenou hladinou P-selektinu v lidských endotelových buňkách, u myši je to naopak [42, 43, 44].

### 2.6.2. Struktura

Struktura P-selektinu je tvořena ze 4 částí. Na antigen se váže N-terminální Ca-dependentní lektinovou doménou, ta je navázána na doménu podobnou epidermálnímu růstovému faktoru (EGF-like domain) a pokračuje několika opakujícími se úseky. Skrz membránu prochází svojí transmembránovou částí a uvnitř buňky končí cytoplazmatickým ocasem [48].

**Obrázek 6:** Struktura P-selektinu: v horní části je navázán cukr



<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pselectin.PNG> (12.3 .2014)

### 2.6.3. Ligand

P-selektin, jako adhezní molekula, zprostředkovává kontakt mezi leukocyty v krvi a endotelovými buňkami cévní stěny. Ligandem pro P-selektin je oligosacharidová sekvence, nazývaná sialyl-Lewis-x antigen, která se vyskytuje v hojném množství na povrchu bílých krvinek. Sialyl-Lewis antigen se skládá ze 4 sacharidů, které jsou navzájem velmi specificky propojené (od konce: sialová kyselina – galaktosa – N -acetylglukosamin – zbytek oligosacharidového řetězce) [48].

Primární ligand pro P-selektin je P-selektin glykoproteinový ligand-1 (PSGL-1 ), který je exprimován téměř ve všech leukocytech. PSGL-1 se nachází na různých hematopoetických buňkách jako jsou neutrofilů, eosinofilů, lymfocytů a monocytů, ve kterých zprostředkovává vychytávání a adhezi těchto buněk. Nicméně neexistuje žádná specifita PSGL-1 pro P-selektin, proto může fungovat i jako ligand pro jiné typy selektinů [46].



#### **2.6.4. Funkce**

P-selektin hraje zásadní úlohu v počátečním vychytávání leukocytů na místě zranění a v průběhu zánětu. Po aktivaci endotelových buněk v průběhu zánětu molekulami jako jsou histamin nebo trombin, se P-selektin přemístí z granulí uvnitř endotelových buněk na jejich povrch [47].

P-selektin je také velmi důležitý, ve vychytávání a agregaci krevních destiček, v oblastech cévního poranění. V klidových krevních destičkách je P-selektin umístěn uvnitř  $\alpha$ -granulí. Aktivace krevních destiček pomocí agonistů, jako je například trombin, kolagenu typu II a ADP, má za následek, že se P-selektin uvolní z  $\alpha$ -granulí a vystaví se na vnější plazmatické membráně destiček. P-selektin pak podporuje agregaci krevních destiček prostřednictvím vazeb destička-fibrin a destička-destička [47].

### **2.7. Apolipoproteiny**

Apoproteiny jsou bílkovinné částice, které jsou ve větší či menší míře součástí obalu apolipoproteinů (chylomikronů, VLDL, LDL, HDL). Jsou to ligandy, podstatné k vazbě na příslušné receptory a k aktivaci či inhibici některých enzymů. Apoproteinům se může zkráceně říkat i apo- [14, 15]. Mezi hlavní lipoproteiny patří apoE, apoB, apoA, apoC [17].

Funkcí specifických apolipoproteinů, je regulace metabolismu lipoproteinů, prostřednictvím jejich zapojení do dopravy a přerozdělení lipidů mezi jednotlivými buňkami a tkáněmi. Toto se děje, prostřednictvím jejich role jako kofaktorů enzymů lipidového metabolismu nebo prostřednictvím udržování struktury lipoproteinové částice. Geny kódující tyto apoproteiny i jejich primární struktura jsou nyní už u většiny známé [17].

#### **2.7.1. Apolipoprotein E**

Apoprotein E má v těle mnoho funkcí. Je součástí všech lipoproteinů, kromě LDL. Syntetizuje se v několika oblastech těla. Přibližně tři čtvrtiny plazmatického ApoE je syntetizováno v játrech a je součástí VLDL, jednu třetinu produkují astrocyty mozku a zbytek pochází ze sleziny, plic, ledvin, nadledvin, svalových buněk a makrofágů [16].

Existují tři izoformy ApoE. Tyto formy jsou známé jako ApoE2, E3 a E4. Jsou kódovány třemi různými alelami genu, známého jako APOE gen [18, 21].

Tento gen se nachází na chromozomu 19 a všechny tři alely se liší pouze sekvencemi jejich aminokyselin. Nejvíce frekventovaný je ApoE3, který má více než polovina lidské populace, druhý v pořadí je ApoE4 a nejméně se v populaci vyskytuje ApoE2, který má nejmenší afinitu k receptorům [19].

ApoE vázaný na VLDL lipoproteinu je agonistou pro LDL-receptor lokalizovaný na povrchu hepatocytů i buněk extrahepatálních tkání. Aktivace LDL-receptoru způsobí katabolismus VLDL, či ukládání TAG do buněk tukové tkáně a tedy i sníženou clearance v plazmě [20].

ApoE vázaný na HDL tzv. HDL-E působí jako inhibitor agonistů vyvolávajících agregaci krevních destiček [16].

Vzhledem k tomu, že apolipoprotein E je zapojen přímo do absorpce a distribuce plazmatických lipidů, je přirozené, že jeho deficit má negativní vliv na vznik kardiovaskulárních onemocnění. Například bylo dokázáno, že nedostatek apolipoproteinu E, způsobuje vysoké sérové hladiny cholesterolu i triglyceridů a vede k předčasnému vzniku aterosklerózy [16].

## **2.8. ApoE-deficientní model myši**

Myši, jako druh, jsou vysoce resistantní proti ateroskleróze, nicméně díky indukované mutaci, tzn. mutaci uměle vyvolané působením známého mutagenu, bylo možné vytvořit linie myši, které jsou náchylné k této nemoci. Například myši, které jsou deficientní v apolipoproteinu E, vznikly mutací v APOE genu. Tyto, tzv. Apo-E deficientní myši, mají tedy vyšší riziko vzniku aterosklerotických lézí. Průběh aterosklerózy se zhoršuje, když jsou zvířata krmena dietou s vysokým obsahem tuku, západní typ diety (Western type diet) [22].

## 2.9. Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je moderní metoda histochemie, což je věda vycházející z biochemie, analytické chemie a histologie. Cílem IHC je lokalizovat a identifikovat specifické antigeny (molekuly či jejich části) v tkáních a to na úrovni histologické, za použití imunologické vazby. Tato metoda je založena na principu vazby antigenu tkáně a dodané protilátky [23].

### 2.9.1. Typy IHC metod

Imunohistochemické metody se dělí na 3 typy:

- přímá metoda
- nepřímá metoda dvojstupňová (ImmPRESS metoda)
- nepřímá trojstupňová metoda (metoda ABC)

#### Přímá metoda

Jde o nejjednodušší typ IHC lokalizace antigenu ve tkáni. Při této metodě se již primární protilátka označí fluoresceinem, kovem či enzymem a tyto se následně ve tkáni hodnotí. Nevýhodou tohoto typu je to, že se dá použít pouze u tkání obsahujících dostatečnou koncentraci antigenu [24,25].

#### Nepřímá dvojstupňová metoda

Je oproti jednostupňové sice komplikovanější a zdlouhavější, ale její největší výhodou je vyšší citlivost a přesnost. Na předem připravené tkáňové řezy se nejprve nanese neoznačená primární protilátka, specifická proti prokazovanému antigenu. Následně ve druhém kroku se nanese protilátku proti Fc-fragmentu imunoglobulinu zvířete, které bylo dárce primární protilátky. Tato druhá protilátka se nazývá sekundární a je značená fluorochromem, či enzymem, který nakonec ve tkáni detekujeme [24,25].

#### Nepřímá trojstupňová metoda

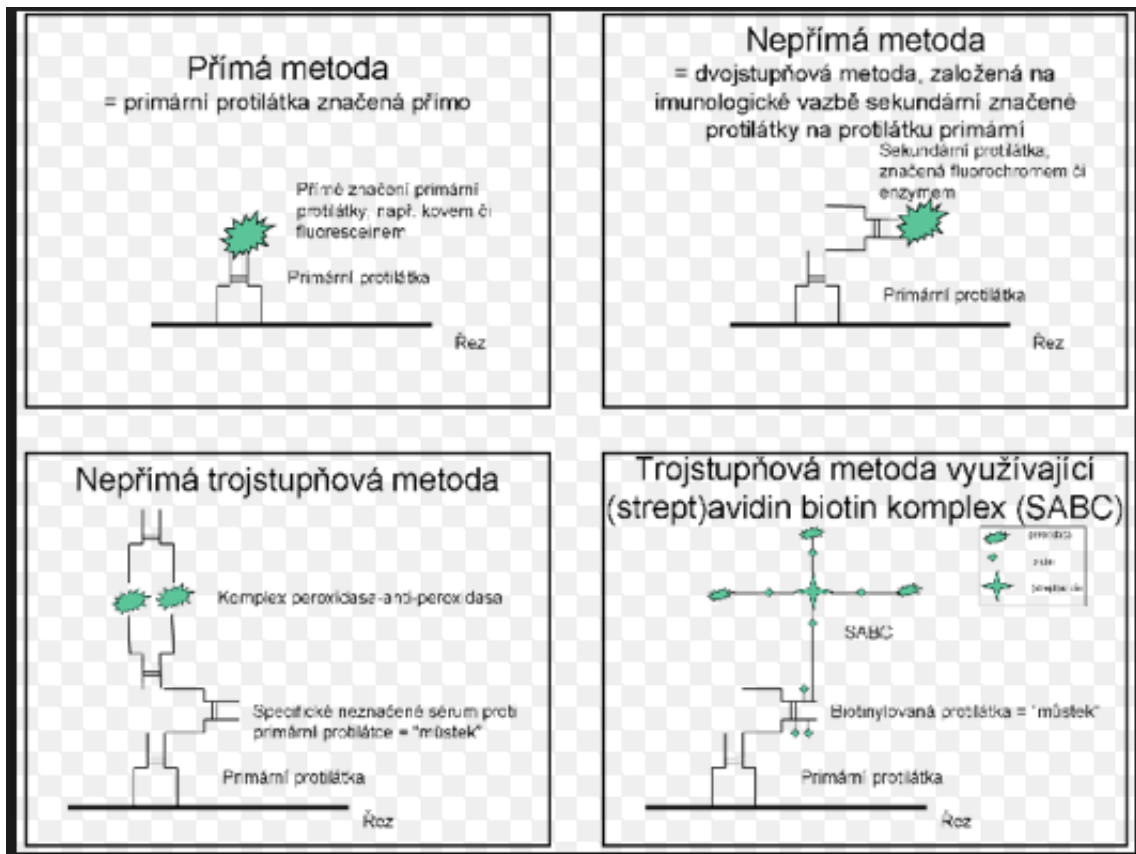
Tato metoda je ze všech tří metod nejcitlivější, ale časově mnohem náročnější. Slouží k zesílení signálu ve tkáni, kde je množství molekul antigenu nízké.

V prvním kroku reaguje primární, specifická protilátka s antigenem prokazovaným ve tkáni.

V druhém kroku se aplikuje neznačená specifická protilátka proti imunoglobulinu zvířete, použitým v prvním kroku. Tato sekundární protilátka, nazývaná též protilátka spojovací, tvoří tzv. můstek a musí být přidána v nadbytku.

V třetím a posledním kroku se nanáší značený makromolekulární komplex, např. avidin-biotin complex (ABC) [24,25].

**Obrázek 7:** Schéma IHC metod



<https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html> (20.3 .2014)

### **3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Úkolem této diplomové práce bylo detekovat a následně popsat expresi a případnou koexpresi endoglinu a P-selektinu v descendentní části aorty v různých fázích aterogeneze. Pro tyto účely byl použit apoE-deficientní kmen myši, krmený nízkocholesterolovou a vysokocholesterolovou dietou po dobu 2 resp. 4 měsíců. Pro detekci proteinů byly specificky upraveny imunohistochemické metody a pro stanovení hladin cholesterolu v krvi těchto myši byla použita biochemická a následně statistická analýza.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použitá zvířata, jejich chov a krmení

Studie prováděné na zvířatech splňují přijatá kritéria pro lidské zdraví a experimentální využití laboratorních zvířat. Všechny protokoly byly odsouhlaseny Komisí pro etiku ochrany zvířat proti týrání zvířat na fakultě farmacie Karlovy univerzity v Praze. Všechny experimenty byly provedeny v souladu s českým zákonem č. 246/1992.

24 apo-E deficientních samic myši kmene C57BL/6J (Taconic, Denmark), starých deseti týdnů byly náhodně rozděleny do tří skupin. Všechny myši byly po celou dobu průběhu studie krmeny dvěma různými experimentálními dietami s vodou ad libitum. Jedna skupina chow byla krmena chow dietou po dobu dvou měsíců. A dvě skupiny Western byly krmeny dietou západního typu, obsahující 21% tuku (11% nasyceného tuku) a 0,15% cholesterolu. Z nich první skupina byla krmena po dobu 2 měsíců a druhá tou samou dietou po dobu 4 měsíců.

Každá myš (ve všech skupinách) žila v samostatné kleci a dostávala 4 gramy krmiva denně ve formě speciálně připravených granulí. Každý den byla konzumace krmiva monitorována. Nebyly zaznamenány žádné rozdíly v konzumaci krmiva, ať už mezi jednotlivými zvířaty nebo mezi zkoumanými skupinami.

**Tabulka 2:** Složení chow a Western typu diety.

Složení diety	Chow typ diety	Western typ diety
Kasein	19,5	19,5
D, L-methionin	0,3	0,3
Sacharóza	50,3	34,15
Kukuřičný škrob	15,0	15,0
Kukuřičný olej	5,0	–
Máslo, bez soli	–	21,0
Cholesterol	–	0,15
Celulóza	5,0	5,0
Minerální směs, AIN76	3,5	3,5
Vitamínová směs, AIN76	1,0	1,0
Uhlíčitan vápenatý	0,4	0,4

Složky diety jsou vyjádřeny v g % (w /w).

Na konci zkoumaného období byla všechna zvířata přes noc vyhladověna a následně usmrcena. Byly jim odebrány aorty napojující se na vrchní polovinu srdce a poté ponořeny do OCT (Optimal cutting temperature = optimální řezné teploty) zmrazovacího media (Leica, Praha, Česká Republika) a před imunohistochemickým barvením rychle zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.1.1. Imunohistochemie**

Analýze byly podrobeny ascendentní části aort všech tří zkoumaných skupin myši (jedna skupina s chow dietou a dvě skupiny se západním typem diety).

Sekvenční krájení tkáně začalo v srdci myši, dokud se neobjevil aortální kořen obsahující poloměsíčitě chlopně a začátek aorty.

Od tohoto okamžiku byly v kryostatu nařezány příčné řezy ( $7\ \mu\text{m}$ ) a následně umístěny na želatinou pokrytá sklíčka. Pro samotnou studii byly použity pouze řezy z ascendentní části aorty.

Provedlo se jednotné, systematické, náhodné vzorkování padesáti řezů z každé myši, pak se vzalo každé desáté sklíčko a těchto pět sklíček z každé myši se použilo na detekci každého proteinu (endoglinu a P-selektinu).

Pro detekci endoglinu byla použita metoda ImmPRESS<sup>TM</sup> a pro detekci P-selektinu metoda ABC (avidin-biotin metoda).

Vyhotovené trvalé preparáty byly následně pozorovány mikroskopem Olympus AX 70. Fotodokumentace a digitalizace fotek z mikroskopu byla provedena pomocí digitální firewirové kamery PixeLINK PL-A642 (Vitana Corporation, Kanada) a analýzy obrazu softwarem NIS ver 3.1 (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika).

#### ***Příprava roztoků pro ABC a ImmPRESS<sup>TM</sup> metodu***

- Zředěný PBS (phosphate buffered saline – pufrovaný fyziologický roztok)

Nejprve byl vytvořen 1litr 10krát koncentrovanějšího zásobního roztoku PBS, jehož pH bylo následně potenciometricky upraveno na 6,8 :

NaCl	80,0g
KCl	2,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	11,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0g
aqua destilata	ad 1000ml

Poté byl koncentrovaný zásobní roztok 10krát naředěn, aby vznikl 1litr zředěného PBS o pH 7,4 :

koncentrovaný roztok PBS	100ml
aqua destilata	ad 1000ml

- 5 % roztok sušeného, odtučněného mléka ve zředěném PBS

Bylo naváženo 0,5 g sušeného, odtučněného mléka a rozpuštěno v 10 ml zředěného PBS.

- 3 % roztok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Roztok byl připraven bezprostředně před použitím. Do 8ml 30% zásobního roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bylo přidáno 70 ml zředěného PBS.

- Roztok DAB (diaminobenzidin, Dako, Dánsko) v pufru – množství na 10 vzorků

Roztok byl připraven z 10 µl DAB a 500 µl pufru jejich smícháním.

### ***Příprava protilátek***

#### **Pro ABC metodu**

- Primární protilátka (goat anti mouse P-selektin, Santa Cruz Biotechnology, USA) naředěná v BSA (kravský sérový albumin) 1/50 – množství pro 10 vzorků

10µl primární protilátky bylo rozpuštěno v 500 µl BSA.

- Sekundární protilátka (horse anti-goat Ig, Vector Laboratories, USA) naředěná v BSA s přidáním 2 % myšího séra (Dako, Dánsko) v poměru 1/400 +8 – pro 10 vzorků

5 µl sekundární protilátky (konjugované s biotinem) bylo rozpuštěno v 2000 µl BSA a 40 µl myšího séra.

- ABC (komplex avidinu a biotinu) rozpuštěný ve zředěném PBS – pro 10 vzorků  
10 µl roztoku A (avidinu) a 10 µl roztoku B (komplex biotinu a křenové peroxidázy) bylo rozpuštěno v 500 µl zředěného PBS a ponecháno v klidu stát po dobu 30 minut.



### **Pro ImmPRESS™ metodu**

- Primární protilátka (anti ENG rat anti-mouse, BD Pharmingen™, USA) naředěná v BSA 1 /50 – pro 10 vzorků

10 µl primární protilátky bylo rozpuštěno v 500 µl BSA.

- Sekundární protilátka (ImmPRESS™ reagent anti-rat Ig, Vector Laboratories, USA) s přidáním 2 % myšího séra – pro 10 vzorků

Do 500 µl sekundární protilátky (konjugovaná s křenovou peroxidázou) bylo přidáno 10 µl myšího séra.

### ***Pracovní postup***

#### **ABC (avidin-biotin komplex) metoda**

1. Jako první bylo nutné zafixovat tkáňové řezy chemickou fixací. Byly vloženy do kyvety naplněné roztokem acetonu a dány do mrazáku s teplotou -20 °C na 30 minut.
2. Po vyjmutí z acetonu se vzorky nechaly za pokojové teploty volně na vzduchu cca. 15 minut oschnout.
3. Vzorek byl 2 -3x obtáhnut olejovou fixou. Ochranný prsteneček tvořil hydrofobní bariéru proti vytékání hydrofilních reagenčních činidel.
4. Následně byly preparáty na 5 minut vloženy do kyvety naplněné zředěným PBS (pH=7,4).
5. Tímto blokačním krokem začíná vlastní IHC detekce. Sklíčka byla primárně inkubována v 5 % roztoku odtučněného, sušeného mléka ve zředěném PBS po dobu 30 minut, aby došlo k vysycení nespecifických vazebných míst bílkovinami obsaženými v mléce a tím se předešlo nechtěným, nespecifickým reakcím ve tkáni.
6. Poté byl proveden oplach ve zředěném PBS.
7. Následovaly další dva blokační kroky, při kterých se inaktivoval endogenní avidin a biotin. Prvním krokem byla 15 minutová inkubace v roztoku anti-avidinu (Vector Laboratories, USA).
8. Následoval oplach ve zředěném PBS (2x5 minut).
9. Blokace biotinu byla provedena další 15 minutovou inkubací v roztoku anti-biotinu (Vector Laboratories, USA).
10. Opět byly vzorky opláchnuty v PBS.

11. Následně byl vzorek inkubován v primární protilátce (goat anti-mouse P-selektin), naředěné v BSA (hovězí sérový albumin), podle doporučení výrobce.
12. Po 1 hodině se provedl znovu krok 8 .
13. Na sklíčka byla nanášena sekundární protilátka (horse anti-goat), naředěná BSA a s přidáním 2 % myšního séra, sklíčka byla ponechána při pokojové teplotě 30 minut.
14. Vzorky se ponechaly oplachovat 5 minut v PBS.
15. Poté následoval poslední blokační krok, při kterém byla blokována endogenní peroxidáza. Sklíčka se na 15 minut ponořila do 3 % roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
16. Zopakován krok 8 .
17. Dalším krokem této metody bylo nanášení ABC (avidin-biotin-enzym komplex) po dobu 30 minut.
18. Zopakován krok 8 .
19. Vizualizace výsledku této metody byla provedena přidáním roztoku DAB v pufru a po 45 sekundách rychle opláchnuta v PBS. Hnědé zbarvení vzniklo na místech, kde proběhla oxidace DAB peroxidázou obsaženou na ABC komplexu.
20. Vzorky byly opláchnuty v destilované vodě.
21. Následně, pro lepší předběžnou orientaci v preparátu, byla obarvena i jádra buněk, namočením vzorků na 5 sekund do fialového, bazického barviva hematoxylinu.
22. Barvení pokračovalo po dobu 1 minuty, v průběhu které byla na sklíčka opatrně puštěna tekoucí voda z kohoutku.
23. Poté následovalo oplachování, odvodňování a projasňování vzorků v sérii misek naplněných acetonem (pouze oplach), aceton-xylenem (10:1 ) 3 minuty, aceton-xylenem (1 :10) 3 minuty a xylenem 3x2 minuty.
24. Posledním krokem bylo vytvoření trvalých preparátů, přilepením krycího sklíčka na vzorek, pomocí syntetické pryskyřice Eukittu.

### **ImmPRESS™ metoda**

1. Provedeny kroky 1 až 4 z ABC metody.
2. Místo mléka (viz ABC-metoda) bylo vysycení nespecifických vazebných míst tkáně provedeno inkubací v normálním kozím séru po dobu 30 minut.
3. Následně se mohla provést inkubace v primární protilátce anti ENG rat anti-mouse naředěnou BSA 1 /50.
4. Oplachový krok 8 . z ABC metody
5. Proveden krok 15. z ABC metody
6. Zopakován opět krok 8 . z ABC metody
7. Poté se aplikovala sekundární protilátka (ImmPRESS™ reagent anti-rat Ig) s přidáním 2 % myšního séra v poměru 50/1 a sklíčka se nechala reagovat podobu 30 minut. Anti-rat Ig je konjugovaný s křenovou peroxidázou, která umožňuje následnou vizualizaci endoglinu.
8. Opět krok 8 . z ABC metody.
9. Pro vizualizaci endoglinu byl opět použit chromogen DAB (diaminobenzidin) naředěný v pufru, ale tentokrát pouze po dobu 15 sekund.
10. ImmPRESS™ metoda ukončena stejně jako ABC metoda provedením kroku 20 až 24 z ABC metody.

#### **4.1.2. Statistická analýza**

Do grafu byly zaneseny střední hodnoty hladin cholesterolu v krvi všech 3 zkoumaných skupin myší. První skupina krmená chow typem diety (n =10), druhá a třetí skupina krmená Western typem diety, jedna po dobu 2 měsíců (n = 9 ) a druhá po dobu 3 měsíců (n = 9 ). U všech tří skupin byla do grafu zanesena i střední chyba průměru (SEM).

Statistická významnost rozdílů ve skupinách byla hodnocena testovou statistikou T tzv. T -testem v programu GraphPad Prism 6 .0 . Tento program určil p-hodnotu testu, kterou porovnáme se zvolenou hladinou pravděpodobnosti (typicky 0 ,05). Statisticky významné rozdíly ve skupinách, jsou takové, pro které je  $p \leq 0,05$ . Pro zvýšenou přehlednost se tyto hodnoty označují hvězdičkami. Jednou hvězdičkou (\*) pokud je  $p \leq 0,05$ , dvěma (\*\*) pokud  $p \leq 0,01$  či třemi (\*\*\*) pokud  $p \leq 0,001$ .

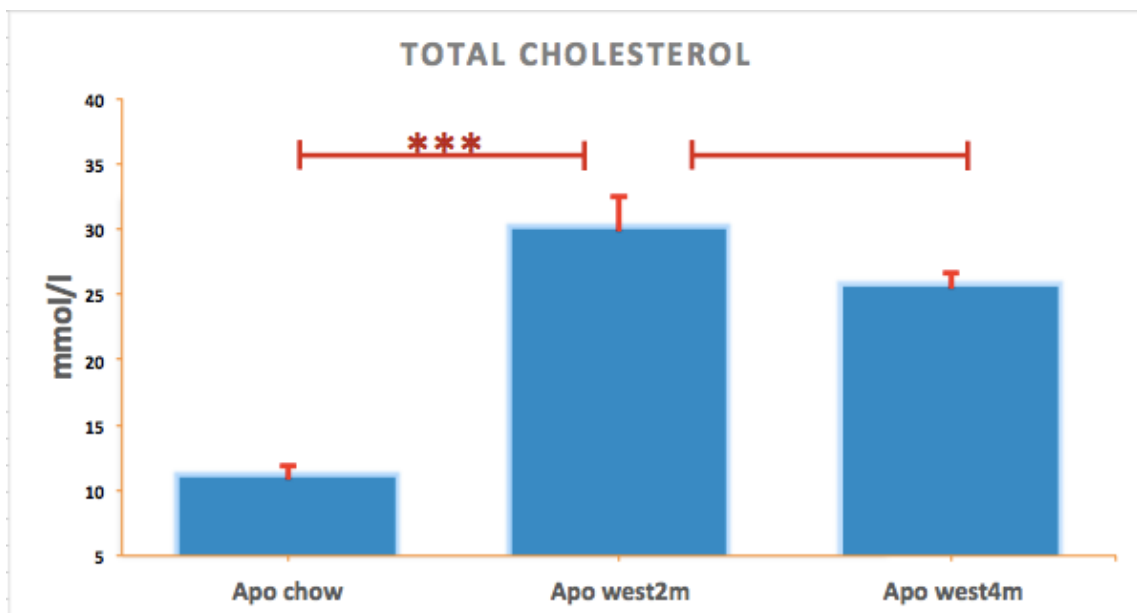
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Biochemická analýza

Biochemickou analýzou krve jsme zjišťovali hladiny celkového cholesterolu u všech tří skupin myši krmených chow typem diety (po dobu dvou měsíců, Apo chow) a Western typem diety po dobu dvou a čtyř měsíců (Apo west2m, resp. Apo west4m). Výsledky jsou uvedeny v jednotkách mmol/l a ukázaly statisticky významné zvýšení hladiny celkového cholesterolu při srovnání myši krmených chow dietou a myši krmených Western typem diety po dobu 2 měsíců ( $10,98 \pm 2,75$  mmol/l vs  $29,96 \pm 7,76$  mmol/l,  $p^{***} = 3,2741 \cdot 10^{-4}$ ).

Rozdíly hladin celkového cholesterolu u myši krmených Western typem diety po dobu 2 a 4 měsíců vyšly statisticky nevýznamné ( $29,96 \pm 7,76$  mmol/l vs  $25,60 \pm 3,29$  mmol/l,  $p = 0,0703$ ).

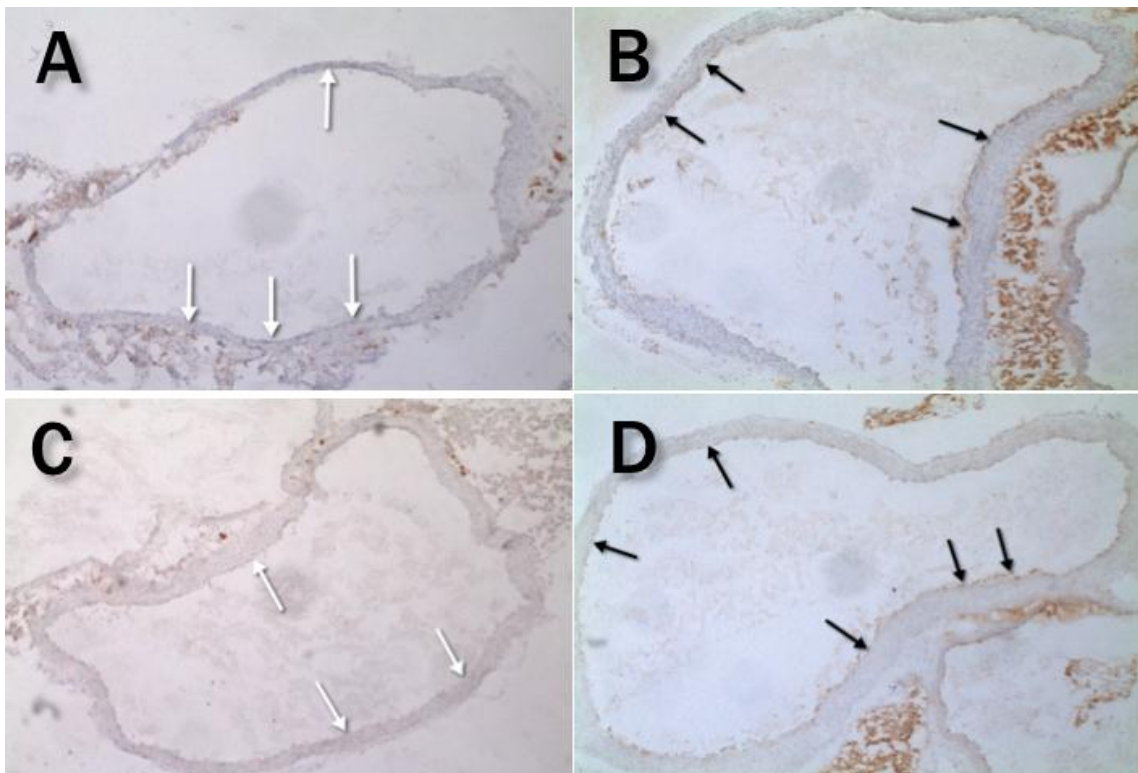
**Graf 1:** Hladiny celkového cholesterolu u myši krmených chow a Western typem diety po dobu 2 a 4 měsíců ( $p^{***} = 3,2741 \cdot 10^{-4}$ ,  $p = 0,0703$ ).



## 5.2. Imunohistochemie

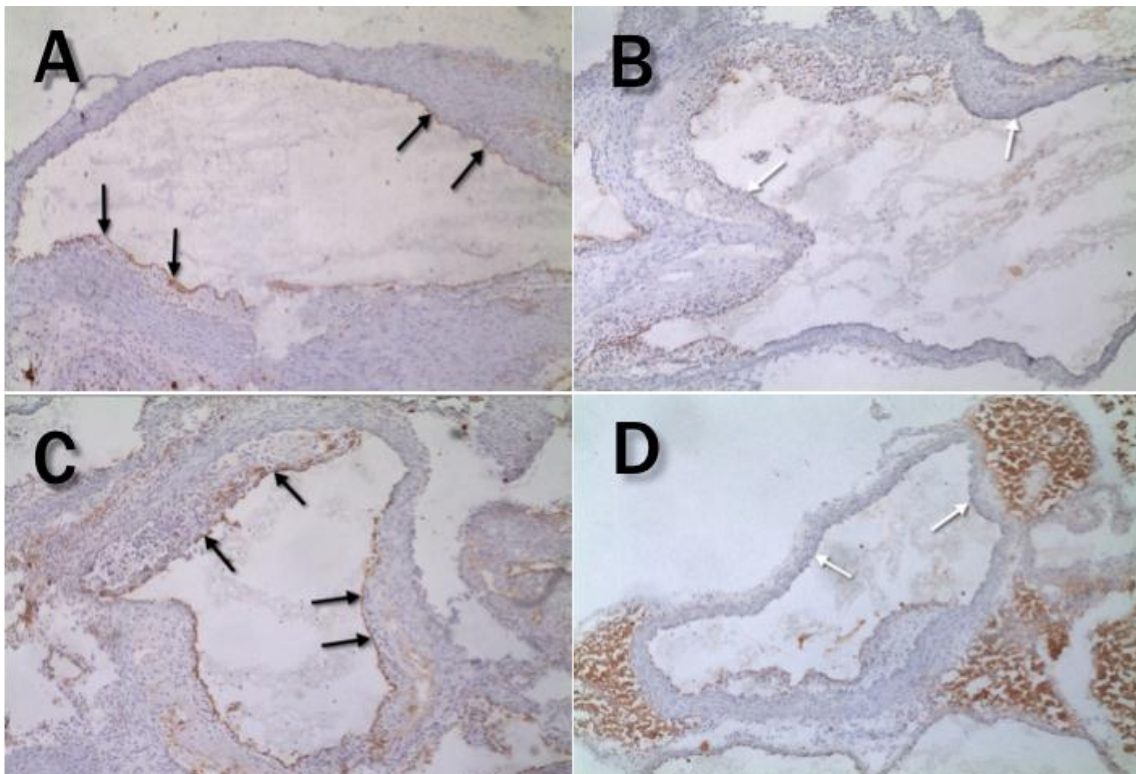
**Obrázek 8:** Reprezentativní obrázky exprese endoglinu (A , C ) a P-selektinu (B , D ) v ascendentní části aorty u apo-E deficientních myší krmených chow typem diety.

*Nebyla pozorována pozitivní reakce na endoglin v celém lumen (endotelu) cévy (bílé šipky). Naopak byla pozorována slabá pozitivita P-selektinu v endotelu aorty (černé šipky). Nebyla tedy nalezena žádná společná koexprese endoglinu a P-selektinu u myši ve skupině „chow diet“. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.*



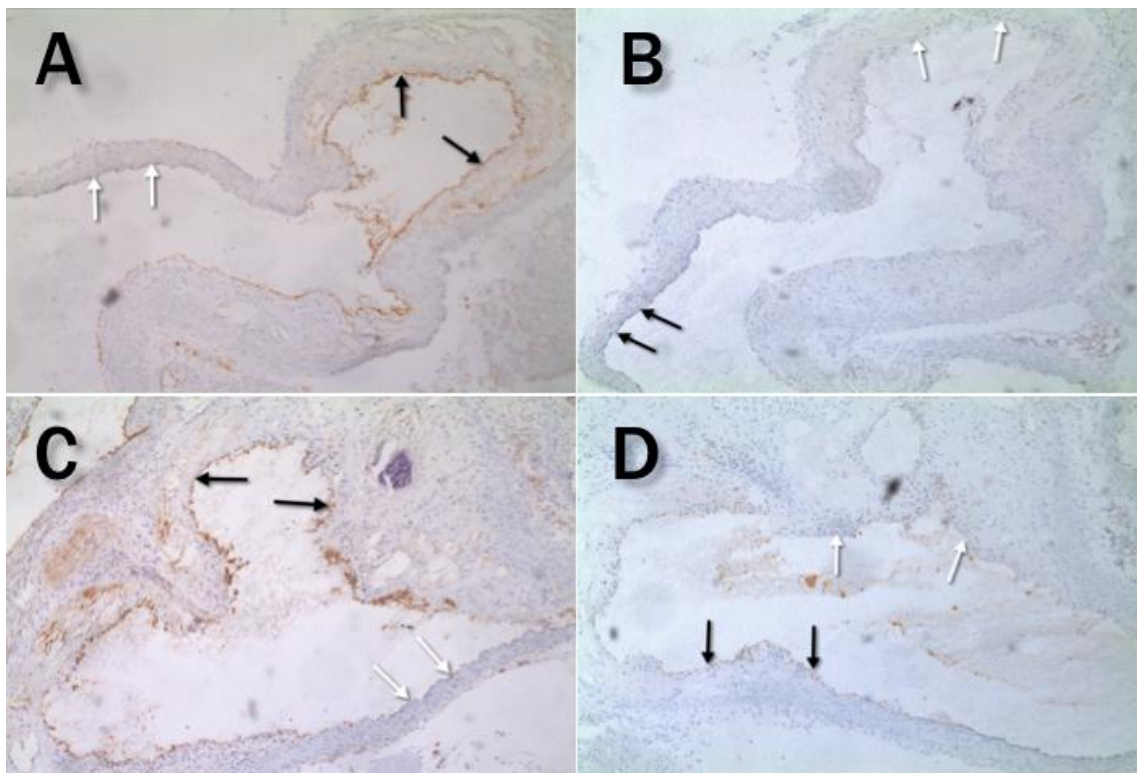
**Obrázek 9:** Reprezentativní obrázky exprese endoglinu (A , C ) a P-selektinu (B , D ) v ascendentní části aorty u apo-E deficientních myši krmených západním typem diety po dobu 2 měsíců.

*Byla pozorována výrazná pozitivita endoglinu zejména na endotelu pokrývajícím aterosklerotické léze (černé šipky). Nebyla pozorována žádná pozitivita P-selektinu na endotelu cévy, ani na endotelu pokrývajícím aterosklerotický plát (bílé šipky). Nebyla tedy nalezena žádná společná koexprese endoglinu a P-selektinu u myši krmených „Western type diet“ po dobu dvou měsíců. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.*



**Obrázek 10:** Reprezentativní obrázky exprese endoglinu (A , C ) a P-selektinu (B , D ) v ascendentní části aorty u apo-E deficientních myši krmených západním typem diety po dobu 4 měsíců.

*Byla pozorována silně pozitivní reakce endoglinu na endotelu pokrývajícím aterosklerotické léze (černé šipky). Oblast endotelu mimo plát naopak nevykazovala pozitivitu žádnou (bílé šipky). V případě P-selektinu oblast endotelu pokrývajícím aterosklerotické léze nevykazovala žádnou pozitivitu (bílé šipky). Slabá pozitivita byla detekována na endotelu pokrývajícím cévu v oblasti bez aterosklerotických změn (černé šipky). Nebyla tedy pozorována žádná společná koexprese endoglinu a P-selektinu u myši krmených „Western type diet“ po dobu čtyř měsíců. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.*



## 6. DISKUSE

Ateroskleróza je díky účasti zánětlivých buněk považována za zánětlivé onemocnění, jehož průběhu se účastní celá řada molekul. Mezi ně patří i adhezní molekula P-selektin a jiná proteinová molekula endoglin. P-selektin se vyskytuje na aktivovaných endotelových buňkách a zprostředkovává kontakt mezi leukocyty a trombocyty v krvi a endotelovými buňkami cévní stěny. Hraje zásadní úlohu ve vychytávání leukocytů na místě zranění a v průběhu zánětu cévy [47].

Zatímco endoglin, molekula, která se vyskytuje pouze na endotelu krevních cév zasažených aterosklerózou, má spíše funkci opravovat poškozenou cévní stěnu a stabilizovat aterosklerotické léze [30]. Expresi endoglinu v aterosklerotických cévách již byla zkoumána jak u lidí, tak i u pokusných zvířat. Nicméně, z těchto studií vyšly kontroverzní údaje, vztahující se na endoglinovou lokalizaci v aterosklerotických cévách a jejich možnou roli v aterogenezi. Tyto rozdíly v lidských studiích mohou být z důvodu pozorování různých cév v rozdílných stádiích aterosklerózy a nelze vyloučit možnost odlišných reakcí s různými protilátkami použitými v metodách těchto studií.

Je zajímavé zmínit, že žádná lidská studie zaměřené na expresi endoglinu během aterogeneze neuvádí endoglinovou expresi v endotelových buňkách aortálních cév a nejsou v nich také žádná data z experimentálních studií na myších týkajících se exprese endoglinu v těchto částech cévního řečiště.

Cílem mojí diplomové práce tedy bylo dokázat, zda se P-selektin, jako molekula mající negativní vliv pro vznik aterosklerózy, současně vyskytuje na stejném místě a ve stejné fázi aterogeneze jako endoglin, jež je molekula mající zřejmě spíše pozitivní vliv na průběh aterosklerózy.

Myši krmené Western typem diety po dobu dvou měsíců prokázaly signifikantně zvýšené hladiny celkového cholesterolu v krvi oproti myším krmeným chow typem diety. Naopak rozdíly hladin celkového cholesterolu u myší krmených Western typem diety po dobu dvou a čtyř měsíců byly prokázány jako nesignifikantní.

Imunohistochemické barvení ukázalo pouze slabou expresi P-selektinu v endotelu aorty u myší krmených chow dietou. Avšak v těchto cévách nebyla viditelná žádná endoglinová exprese, tedy žádná společná koexpresi endoglinu a P-selektinu u myší na chow dietě.



U myši krmených Western typem diety po dobu dvou měsíců byla viditelná silně pozitivní reakce na endoglin (výhradně pokrývající aterosklerotické pláty) a podstatně slabší reakce P-selektin u (na endotelu mimo pláty). Ani zde nebyla prokázána žádná podstatná koexprese endoglinu s P-selektinem.

Obdobný výsledek barvení byl zaznamenán u myši krmených západním typem diety po dobu čtyř měsíců. Endoglinová exprese byla viditelná pouze v endotelu pokrývajícím aterosklerotické pláty, nikoli na endotelu bez plátu, a P-selektin byl opět slabě detekovatelný, a to výhradně na endotelu bez plátu. Nebyla viditelná žádná koexprese endoglinu a P-selektinu v této skupině.

## 7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit a přizpůsobit metodu pro detekci exprese endoglinu a P-selektinu v ascendentních aortách apoE-deficientních myší krměných chow typem diety (standardní dietou pro hlodavce) a tzv. Western typem diety (západní dietou) po dobu dvou a čtyř měsíců. Rovněž byl sledován podíl daného typu diety a délky podávání této diety na hladiny celkového cholesterolu u těchto myší.

Bylo zjištěno, že podání diety s vysokým obsahem tuků (tzv. Western type diet) po dobu dvou měsíců významně zvyšuje hladiny celkového cholesterolu u apoE deficientních myší, oproti dietě standardní, přičemž tyto hladiny se při podání vysokolipidové diety po dobu čtyř měsíců již signifikantně nemění.

Z hlediska imunohistochemie jsme v této diplomové práci ukázali, že P-selektin se slabě vyskytuje pouze na neaterosklerotickém endotelu, a tudíž se nevyskytuje současně s endoglinem na endotelu aterosklerotického plátu aorty, není tedy současně koexprimován v ascendentní aortě apoE deficientních myší.

Závěrem tato diplomová práce naznačuje, že endoglin pravděpodobně není zapojen společně s P-selektinem (jako adhezní molekulou) do rozvoje aterosklerózy (adhezi leukocytů na endotel) v ascendentní části aorty u apoE-deficientních myší v průběhu aterogeneze.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Arterie svalového typu .....	13
Obrázek 2: Srovnání struktury arterie a vény při stejné tloušťce .....	13
Obrázek 3: Oblouk aorty.....	14
Obrázek 4: Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu.....	20
Obrázek 5: Schéma ateromového plátu .....	20
Obrázek 6: Struktura P-selektinu: v horní části je navázán cukr .....	24
Obrázek 7: Schéma IHC metod .....	28
Obrázek 8: Reprezentativní obrázky exprese endoglinu (A , C ) a P-selektinu (B , D ) v ascendentní části aorty u apo-E deficientních myší krmených chow typem diety. ..	37
Obrázek 9: Reprezentativní obrázky exprese endoglinu (A , C ) a P-selektinu (B , D ) v ascendentní části aorty u apo-E deficientních myší krmených západním typem diety po dobu 2 měsíců. ....	38
Obrázek 10: Reprezentativní obrázky exprese endoglinu (A , C ) a P-selektinu (B , D ) v ascendentní části aorty u apo-E deficientních myší krmených západním typem diety po dobu 4 měsíců. ....	39

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění. ....	18
Tabulka 2: Složení chow a Western typu diety. ....	30

## 10. SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Hladiny celkového cholesterolu u myší krmených chow a Western typem diety po dobu 2 a 4 měsíců. ....	36
--	----

## 11. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC – avidin-biotin komplex

ACE – angiotenzin – konvertující enzym

ADP – adenosindifosfát

apo – apolipoprotein

Apo chow – apoE-deficientní skupina myší krmená chow typem diety (2 měsíce)

Apo west2m – apoE-deficientní skupina myší krmená Western typem diety (2 měsíce)

Apo west4m – apoE-deficientní skupina myší krmená Western typem diety (4 měsíce)

apoE – apolipoprotein E

APOE – gen pro apolipoprotein E

BSA – kravský (bovinní) sérový albumin

CAM – cell adhesion molecule (buněčná adhezní molekula)

CD105 – endoglin

CD62P – P-selektin

COX – cyklooxygenáza

DAB – diaminobenzidin

ED – endoteliální dysfunkce

EDRF – endothel derived relaxing factor (starší název pro oxid dusnatý)

EGF-like domain – doména podobná epidermálnímu růstovému faktoru

END – endoglin

GMP-140 – granular membrane protein 140 (granulární membránový protein)

HDL – high density lipoproteins (lipoproteiny o vysoké hustotě)

IHC – imunohistochemie

ICHS – ischemická choroba srdeční

Il – interleukin

LDL – low density lipoproteins (lipoproteiny o nízké hustotě)

LPS – lipopolysacharid

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NO – oxid dusnatý

PADGEM – P-selektin

PAF – platelet activating factor (faktor aktivující destičky)

PBS – phosphate buffered saline (pufrovaný fyziologický roztok)

PGI<sub>2</sub> – prostacyklin

PSGL-1 – P-selektin glykoproteinový ligand-1

RGD – peptidová sekvence Arg - Gly - Asp

SELP – gen pro lidský P-selektin

TAG – triacylglycerol

TGF- $\beta$  – transformující růstový faktor  $\beta$

TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor  $\alpha$

VLDL – very low density lipoproteins (lipoproteiny o velmi nízké hustotě)

vWF – von Willebrandův faktor

## 12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3* . 2 . vyd. Praha: Grada Publishing, 2002, s . 69-76. ISBN 80-7169-140-2 .
- [2] KONRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK. *Funkční histologie*. 2 . vyd. Jinočany: H , 2000, s . 115-123. ISBN 8086022803.
- [3] MALÍNSKÝ, Jiří, Václav LICHNOVSKÝ a Zdeňka MICHALÍKOVÁ. *Přehled histologie člověka v obrazech*. 1 . vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2002, s . 10-15. ISBN 8024405121.
- [4] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. 4 . vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada Publishing, 2003, s . 771. ISBN 80-247-0512-5 .
- [5] BULTAS, Jan. *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční*. 1 . vyd. Praha: Galén, 1999. Symposium, sv. 2 . ISBN 80-7262-026-6 .
- [6] CELERMAJER, David S . *Endothelial Dysfunction: Does It Matter? Is It Reversible?*. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997, roč. 30, č . 2 , s . 325-333. DOI: 10.1016/S0735-1097(97)00189-7 .
- [7] ČEŠKA, Richard. *Cholesterol a ateroskleróza: léčba hyperlipidemií*. 2 . přeprac. vyd. Praha: MAXDORF, 1999. Jessenius. ISBN 8085800950.
- [8] GALAJDA, Peter, Marián MOKÁŇ. *Poruchy hemostázy pri diabetes melitus*. 1 . vyd. Martin: Léčiva, 2001. ISBN 8088866189.
- [9] MANCINI, G.B. J., G. C. HENRY, C. MACAYA et al. *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition With Quinapril Improves Endothelial Vasomotor Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease: The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study*. *Circulation*. 1996, roč. 94, č . 3 , s . 258-265. DOI: 10.1161/ 01. CIR.94.3 .258.

- [10] PÍŤHA, Jan et al. *Endoteliální dysfunkce a její hodnocení*. Cor et vasa. 2001, roč. 43, č . 9 , s . 452-456. ISSN: 0010-8650.
- [11] Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy [online]. 2011[cit. 2014-02-11]. Dostupné z : <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/03/05.pdf>
- [12] SANTORO, Domenico, Guido BELLINGHERI, Giovanni CONTI et al. *Endothelial Dysfunction in Chronic Renal Failure*. *Journal of Renal Nutrition*. 2010, vol. 20, issue 5 , s .103-108. DOI: 10.1053/j .jrn.2010.06.010. Dostupné z : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1051227610001494>
- [13] GREGOR, Pavel, Petr WIDIMSKÝ a Michal ANDĚL. *Kardiologie*. 2 . přeprac. a rozš. vyd. Praha: Galén, 1999. ISBN 8072620215.
- [14] DESAI, K . et al. *Binding of apo-E rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation*. *Journal of Lipid Research*. 1989, roč. 30, s . 831-840.
- [15] Lipid for Research [online]. 2007 [cit. 2014-02-17]. Dostupné z : <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Apoproteins>
- [16] APOLIPOPROTEIN E [online]. 1997 [cit. 2014-02-17]. Dostupné z : <http://wwwchem.csustan.edu/chem4400/SJBR/Dawn971.htm>
- [17] MAHLEY, Robert W . et al. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid research*. 1984, roč. 25, č . 12, s . 1277-1294. PMID 6099394.
- [18] *Definition of Apolipoprotein E* [online]. 2012 [cit. 2014-02-13]. Dostupné z : <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=13299>
- [19] ZANNIS, Vassilis I . et al. *Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes*. *Journal of Lipid Research*. 1982, roč. 23, č . 6 , s . 911-914. PMID 7130859.

- [20] ČEŠKA, Richard. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Vyd. 1 . Praha: Triton, 2005. ISBN 80-7254-738-0
- [21] *APOE* [online]. 2014 [cit. 2014-03-12]. Dostupné z : <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE>
- [22] BRESLOW, J. L . *Mouse Models of Atherosclerosis*. Science. 1996, roč. 272, č . 5262, s . 685-688. DOI: 10.1126/science.272.5262.685. Dostupné z : <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.272.5262.685>
- [23] LUPPA, Hans, Herwart AMBROSIUS. *Immunhistochemie: Grundlagen und Techniken*. Berlin: Akademie-Verlag, 1987. ISBN 3055003160.
- [24] *Principy a příklady imunohistochemie* [online]. 2002 [cit. 2014-02-19]. Dostupné z : [https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc\\_hi\\_res.pdf](https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf)
- [25] BRYCHTOVÁ, Svetlana a Alice HLOBILKOVÁ. *Histopatologický atlas*. 1 . vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024716503.
- [26] *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [online]. 2012 [cit. 2014-03-11]. Dostupné z : <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ENGID40452ch9q34.html>
- [27] FERNÁNDEZ-RUIZ, A . et al. *Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter*. Cytogenetics and Cell Genetics. 1993, roč. 64, č . 3 -4 , s . 204-207. PMID 8404038.
- [28] RODRIGUEZ-PENA, A . et al. *Up-regulation of endoglin, a TGF- $\beta$  -binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction*. Nephrology Dialysis Transplantation. 2001, roč. 16, č . 1 , s . 34-39. DOI: 10.1093/ndt/16.suppl\_1 .34. Dostupné z : [http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ndt/16.suppl\\_1 .34](http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ndt/16.suppl_1 .34)



- [29] ANDERSON, Gregory A. *Endoglin is dispensable for blood vessel morphogenesis but is required for endocardial cushion formation in the developing mouse embryo*. Ottawa: Library and Archives Canada = Bibliothèque et Archives Canada, 2008. ISBN 04-943-8930-3 .
- [30] NACHTIGAL, Petr, Lenka ZEMÁNKOVÁ (VEČEŘOVÁ), Jana RATHOUSKÁ a Zbynek STRASKÝ. *The role of endoglin in atherosclerosis*. *Atherosclerosis*. 2012, roč. 224, č.1. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002191501200158X>
- [31] PAIGEN, B . et al. *Ath-1 , a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice*. 1987, roč. 84, č . 11, s . 3763–3767.
- [32] *Výživa, obezita a civilizační choroby*. [online]. 2007 [cit. 2014-03-13]. Dostupné z : <http://www.aerobicstyl.cz/aerobik/>
- [33] *Ateroskleróza*. [online]. [cit. 2014-03-13]. Dostupné z : <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/ateroskleroz-a-1>
- [34] *Patogeneze aterosklerózy*. [online]. [cit. 2014-03-13]. Dostupné z : <http://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf>
- [35] VLČEK, Jiří a Daniela FIALOVÁ. *Klinická farmacie I* . 1 . vyd. Praha: Grada, 2010, s . 108-116. ISBN 9788024731698.
- [36] RYAN, Una S. a Ronald E. WORTHINGTON. *Cell-cell contact mechanisms*. *Current Opinion in Immunology*. 1992, roč. 4, č. 1, s. 33-37. DOI:10.1016/0952-7915(92)90120-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0952791592901204>

- [37] MCEVER, R P et al. *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. Journal of Clinical Investigation. 1989, roč. 84, č. 1, s. 92-99. DOI: 10.1172/JCI114175. Dostupné z : <http://www.jci.org/articles/view/114175>
- [38] HERRMANN, S . *The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction*. Human Molecular Genetics. roč. 7, č. 8, s. 1277-1284. DOI: 10.1093/hmg/7.8.1277. Dostupné z : <http://www.hmg.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/7.8.1277>
- [39] PAN, J . *Comparison of Promoters for the Murine and Human P-selectin Genes Suggests Species-specific and Conserved Mechanisms for Transcriptional Regulation in Endothelial Cells*. Journal of Biological Chemistry. roč. 273, č. 16, s. 10058-10067. DOI: 10.1074/jbc.273.16.10058. Dostupné z : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.16.10058>
- [40] DISDIER, M . et al. *Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway*. Molecular biology of the cell. 1992, roč. 3, č. 3, s. 309-321. PMID 1378326.
- [41] HATTORI, R . et al. *Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140*. Journal of Biological Chemistry. 1989, roč. 264, č. 14, s. 7768-7771. PMID 2470733.
- [42] HAHNE, M . *Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes*. The Journal of Cell Biology. 1993, roč. 121, č. 3, s. 655-664. DOI: 10.1083/jcb.121.3.655. Dostupné z : <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.121.3.655>

- [43] LIU, Z . et al. *Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo*. Journal of Experimental Medicine. 2010, roč. 207, č . 13, s . 2975-2987. DOI: 10.1084/jem.20101545.  
Dostupné z : <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20101545>
- [44] PANÉS, Julián, Michael PERRY a D Neil GRANGER. *Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention*. British Journal of Pharmacology. 1999, roč. 126, č . 3 , s . 537-550. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702328.  
Dostupné z : <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0702328>
- [45] WOLTMANN, G . et al. *Interleukin-13 induces PSGL-1 /P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow*. Blood. 2000, roč. 95, č . 10, s . 3146. PMID 10807781.
- [46] LORENZON, P . *Endothelial Cell E- and P-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Function as Signaling Receptors*. The Journal of Cell Biology. 1998, roč. 142, č . 5 , s . 1381-1391. DOI: 10.1083/jcb.142.5 .1381.  
Dostupné z : <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.142.5 .1381>
- [47] CLEATOR, J . H . *Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP*. Blood. 2006, roč. 107, č . 7 , s . 2736-2744. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2698.  
Dostupné z : <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-07-2698>
- [48] MASOPUST, Jaroslav. *Patobiochemie buňky*. 1 . vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2 . lékařská fakulta, 2003, s . 180. ISBN 80-239-1011-6 .