

**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**

**Solubilní endoglin a jeho role v patogenezi endotelové dysfunkce**

**Disertační práce**

**Mgr. Barbora Vitverová**

**Školitel disertační práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2019**

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, milou spolupráci a trpělivost během průběhu celého mého postgraduálního studia a během sepsování této disertační práce. Ráda bych poděkovala i naší laborantce Pavlíně Lukešové za pomoc a spolupráci během celého studia. Poděkování patří i všem spolupracovníkům a zaměstnancům Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Velké díky patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu.

Děkuji také za finanční podporu grantovým projektům GAUK 884216/C a 1284214/C, GACR GA15-24015S, SVV/2017/260414, EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841) spolufinancováno ERDF a AZV 17-31754A.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. 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.

Mgr. Barbora Vitverová

V Hradci Králové dne

## **Abstrakt**

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Kandidát: Mgr. Barbora Vitverová**

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

**Název disertační práce: Solubilní endoglin a jeho role v patogenezi endotelové dysfunkce**

Endotel je hlavním regulátorem cévní homeostázy a vykazuje řadu vasoprotektivních účinků, mezi něž patří produkce vasodilatačně působících substancí, potlačení růstu buněk hladké svaloviny či inhibice zánětlivých odpovědí. Většina těchto účinků je zprostředkována oxidem dusnatým (NO), nejučinnějším endogenním vasodilatátorem. Pokles v produkci či aktivitě NO vede k narušení endotel dependentní vasodilatace, což je charakteristický rys endotelové dysfunkce. Endotelová dysfunkce je prvním a zásadním krokem v rozvoji aterosklerózy a lze ji v cévách detekovat ještě před strukturálními změnami cévní stěny. Ateroskleróza je komplexní zánětlivé onemocnění, jež je podkladem mnoha kardiovaskulárních onemocnění, zejména ischemické choroby srdeční, a tvoří tak hlavní příčinu morbidity a mortality ve vyspělých zemích. Lékem volby v terapii aterosklerózy, potažmo ischemické choroby srdeční, jsou statiny, které prokazatelně snižují hladiny LDL cholesterolu a svými pleiotropními účinky příznivě moduluji funkci endotelu.

Pro studium aterosklerózy se v současné době nejčastěji využívají myší modely. Především díky snadným genetickým manipulacím a dietárním zásahům lze v relativně krátkodobém časovém horizontu docílit aterosklerotických změn. Tyto změny jsou detekovatelné na morfologické i funkční úrovni. Jednu ze zásadních rolí v tomto procesu má signalizační kaskáda transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

Hlavním tématem publikací v této souhrnné disertační práci byla úloha tkáňového endoglinu (TGF $\beta$  receptor III, Eng), jeho solubilní formy a dalších členů TGF $\beta$  signalizační kaskády v rozvoji endotelové dysfunkce u vybraných myších modelů aterosklerózy. Role solubilní formy Eng (sEng) v tomto patologickém procesu byla hlavním předmětem zkoumání, jelikož zvýšené hladiny sEng byly detekovány u pacientů s hypercholesterolémií, aterosklerózou, arteriální hypertenzí a diabetem mellitem II. typu.

Pro objasnění role sEng v rozvoji endotelové dysfunkce jsme použili transgenní myší model s vysokou hladinou lidského sEng v plazmě (Sol-Eng<sup>+</sup> high) a jako kontrolní skupinu jejich sourozence s nízkou hladinou lidského sEng v plazmě (Sol-Eng<sup>+</sup> low). Myším byla

podávána vysokotuková dieta pro navození hypercholesterolémie, a tedy simulace patofyziologického podkladu u pacientů s aterosklerózou v klinické praxi. Výsledky studie prokázaly, že vysoké hladiny sEng v kombinaci s mírnou hypercholesterolémií rozvíjí fenotyp endotelové dysfunkce charakterizovaný signifikantně zhoršenou schopností aorty vasokonstrikce i vazodilatace u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny. Kombinace vysokých hladin sEng a hypercholesterolémie také vedla ke snížení exprese všech členů Eng/Smad 2/3/eNOS signalizační kaskády v aortě, což vedlo k narušení eNOS dependentní vasodilatace a následně k rozvoji endotelové dysfunkce.

Další studie byla zaměřena na časný rozvoj endotelové dysfunkce v aortě a ověření hypotézy, zda tento patologický jev je doprovázen změnami v expresi tkáňového Eng za současné změny hladin sEng a rozvoje zánětlivé odpovědi. Pro tuto studii byly použity apolipoprotein E/LDL receptor deficientní myši samice (ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup>) ve věku 2 měsíců a jako kontrolní skupina C57BL/6J myši samice téhož věku. Myši byly krmeny standardní dietou, jelikož se očekával spontánní rozvoj hypercholesterolémie u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny. Výsledky studie potvrzují, že hypercholesterolémie je doprovázena vysokými hladinami sEng, zánětlivou odpovědí a narušením metabolismu NO. Dále ze studie vyplývá, že hypercholesterolémie vede ke snížené expresi tkáňového Eng a všech členů jeho signalizace, což vede k rozvoji endotelové dysfunkce v aortě ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny.

Úloha sEng jakožto potenciálního induktoru endotelové dysfunkce, který přispívá k rozvoji hypertenze, byla zkoumána i na úrovni srdce. Pro tuto studii byl opět použit transgenický myší model (Sol-Eng<sup>+</sup> high and Sol-Eng<sup>+</sup> low skupina). Myším byla podávána standardní, nebo vysokotuková dieta. Cílem bylo zjistit, zda zvýšené hladiny sEng vyvolají změny na úrovni TGFβ signalizační kaskády (Eng, Smad proteiny), na úrovni exprese markerů reflektujících remodelaci srdce (PDGF, Co11A1) a také markerů zánětu (VCAM-1, ICAM-1). Výsledky studie neprokázaly signifikantní vliv zvýšených hladin sEng na morfológickou strukturu (fibrózní a degenerativní změny kardiomyocytů), rozvoj zánětu či ovlivnění exprese členů TGFβ signalizace.

Výsledky studií pomohly objasnit roli obou forem endoglinu v rozvoji endotelové dysfunkce. Snížená exprese tkáňového Eng doprovází rozvoj endotelové dysfunkce v myší aortě. Lze také konstatovat, že vysoké hladiny sEng mohou být považovány za rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárních onemocnění.

## **Abstract**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Candidate: Msc. Barbora Vitverova**

**Supervisor: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

**Title of Doctoral Thesis: Soluble endoglin role in the pathogenesis of endothelial dysfunction**

The endothelium is a major regulator of vascular homeostasis and exerts a number of vasoprotective effects, including production of vasodilating agents, suppression of smooth muscle cell growth, or inhibition of inflammatory responses. Most of these effects are mediated by nitric oxide (NO), the most effective endogenous vasodilator. Decreased NO production or its activity is a hallmark of endothelial dysfunction leading to an impaired endothelial-dependent vasodilation. Endothelial dysfunction is the first and key step in the development of atherosclerosis and can be detected before structural changes in the vessel wall. Atherosclerosis is a complex inflammatory disease underlying many cardiovascular disorders including ischemic heart disease and represents the major cause of morbidity and mortality in developed countries. Statins are drugs of choice in the treatment of atherosclerosis and ischemic heart disease, which have been shown to reduce LDL cholesterol levels and modulate endothelial function with their pleiotropic effects.

Mouse models are currently the most commonly used animal model in the field of atherosclerosis research. Atherosclerotic changes can be achieved in a relatively short time frame, especially due to easy genetic manipulations and dietary interventions. These changes are detectable at both morphological and functional levels. Signaling pathway of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) has one of the most significant roles during these processes.

The role of membrane endoglin (TGF $\beta$  receptor III, Eng), its soluble form and other members of TGF $\beta$  signaling pathway in the development of endothelial dysfunction in selected mouse models of atherosclerosis, was the key topic of manuscripts in this summary dissertation thesis. The main objective of this thesis was focused on the role of soluble endoglin (sEng) in the pathogenesis of endothelial dysfunction, especially because of increased sEng levels were detected in patients with hypercholesterolemia, atherosclerosis, arterial hypertension, and type II diabetes mellitus.

To determine the role of sEng in the development of endothelial dysfunction, we used transgenic mouse model with high levels of human sEng in plasma (Sol-Eng<sup>+</sup> high) and their age matched littermates with low plasma levels of human sEng (Sol-Eng<sup>+</sup> low) as a control group. Both groups were fed high fat diet to induce hypercholesterolemia and thus simulate the pathophysiological basis in patients with atherosclerosis in clinical practice. Study results showed, that increased sEng levels combined with mild hypercholesterolemia develop endothelial dysfunction like phenotype characterized by significantly impaired vasodilation and vasoconstriction in aortas of Sol-Eng<sup>+</sup> high mice. Combination of increased sEng levels and hypercholesterolemia led to decreased expression of all members Eng/Smad 2/3/eNOS signaling in aorta resulting in impaired eNOS-dependent vasodilation and the development of endothelial dysfunction.

The next study was focused on the changes in membrane Eng expression and sEng levels during early development of endothelial dysfunction. We used two-month-old female apolipoprotein E and LDL receptor double deficient mice (ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup>) and female C57BL/6J mice at the same age as a control group. Mice were fed chow diet and spontaneous development of hypercholesterolemia was expected in ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> group. Study outcomes demonstrated, that hypercholesterolemia is accompanied by increased sEng levels, proinflammatory state and a disruption of NO metabolism. Furthermore, the results suggest that hypercholesterolemia leads to a decrease in membrane Eng expression and all members of its signaling resulting in the development of endothelial dysfunction in ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> group.

The role of sEng as a possible inducer of endothelial dysfunction, that contributes to the development of hypertension was evaluated at the myocardial level. Transgenic mouse model expressing human sEng was used (Sol-Eng<sup>+</sup> high and Sol-Eng<sup>+</sup> low group). Mice were fed either chow or high fat diet. We assessed the hypothesis that increased sEng levels may result in expression changes in TGFβ signaling (Eng, Smad proteins), in expression of markers reflecting heart remodeling (PDGF, Co11A1), and inflammatory markers (VCAM-1, ICAM-1). Study results did not demonstrate the significant impact of increased sEng levels on morphological structure of myocardium (profibrotic and degenerative cardiomyocyte changes), development of inflammation or influence of TGFβ signaling.

The results of the studies helped to clarify the role of both forms of endoglin in the development of endothelial dysfunction. Decreased membrane Eng expression accompanies the development of endothelial dysfunction in mouse aorta. It can be also concluded, that increased sEng levels can be considered as a risk factor of cardiovascular disease development.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ach	acetylcholin
ALK	receptor activin-like kinázy
ApoE	apolipoprotein E
ApoE <sup>-/-</sup>	ApoE deficientní myší model
ApoE <sup>-/-</sup> / LDLR <sup>-/-</sup>	ApoE/LDLR deficientní myší model
ATV	atorvastatin
BH <sub>3</sub>	trihydrobiopterin
BH <sub>4</sub>	tetrahydrobiopterin
BMP	kostní morfogenetické proteiny
CAM	kalmodulin
cGMP	cyklický guanosin-3, 5-monofosfát
EDHF	hyperpolarizační faktor odvozený od endotelu
Eng	endoglin
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ET-1	endotelin 1
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
HDL	high density lipoprotein, lipoprotein o vysoké hustotě
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
HO-1	hemoxygenáza 1
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule 1, intercelulární adhezní molekula 1
KLF6	Kruppel-like faktor 6
LDL	low density lipoprotein, nízkodenzitní lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LDLR <sup>-/-</sup>	LDLR deficientní myší model
L-Eng	izoforma Eng s dlouhou intracelulární doménou, long Eng
L-NAME	N (ω)-nitro-L-arginin methylester
MMP-14	metaloproteáza membránového typu 14
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitrát



PECAM-1	platelet endothelial cellular adhesion molecule 1, destičková endotelová adhezní molekula 1
p-eNOS	fosforylovaná forma eNOS
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub> , prostacyklin
pSmad	fosforylovaná forma Smad proteinu
sEng	solubilní endoglin
S-Eng	izoforma Eng s krátkou intracelulární doménou, short Eng
sICAM-1	solubilní ICAM-1
Sol-Eng <sup>+</sup>	transgenní myší model s vloženým genem pro lidský sEng
SP1	specifický protein 1
TGFβ	transformující růstový faktor β
TGFβRI	receptor I transformujícího růstového faktoru β
TGFβRII	receptor II transformujícího růstového faktoru β
TGFβRIII	receptor III transformujícího růstového faktoru β
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
TXA <sub>2</sub>	thromboxan A <sub>2</sub>
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, buněčná adhezní molekula 1
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VLDL	very low density lipoprotein, lipoprotein o velmi nízké hustotě
Zn	zinek

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	12
<b>2. Teoretická část</b> .....	14
<b>2.1. Aterosklerotický proces a jeho morfológické aspekty</b> .....	14
2.1.1. Morfológická struktura zdravé artérie .....	14
2.1.2. Aterosklerotický proces .....	15
<b>2.2. Endotel za fyziologických a patologických podmínek</b> .....	18
2.2.1. Fyziologická funkce endotelu.....	18
2.2.2. Endotelová dysfunkce.....	19
2.2.3. Fyziologická úloha NO a eNOS a důsledky jejího narušení .....	20
2.2.4. Vliv buněčných adhezních molekul na rozvoj endotelové dysfunkce.....	22
<b>2.3. TGF<math>\beta</math> signalizační kaskáda</b> .....	24
2.3.1. TGF $\beta$ cytokin.....	24
2.3.2. TGF $\beta$ 1 cytokin a jeho význam v aterogenezi.....	26
2.3.3. TGF $\beta$ receptor I a jeho vztah k ateroskleróze .....	28
<b>2.4. Tkáňový endoglin</b> .....	30
2.4.1. Struktura a exprese tkáňového endoglinu.....	30
2.4.2. Funkce tkáňového endoglinu.....	30
2.4.3. Úloha tkáňového endoglinu v rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy .....	31
<b>2.5. Solubilní endoglin</b> .....	32
2.5.1. Vznik a struktura solubilního endoglinu .....	32
2.5.2. Solubilní endoglin v kontextu hypercholesterolemie a endotelové dysfunkce .....	33
2.5.3. Solubilní endoglin jako možný induktor endotelové dysfunkce v různých částech vaskulárního řečiště.....	34
2.5.4. Význam solubilního endoglinu v TGF $\beta$ signalizaci.....	35
<b>2.6. Myší modely endotelové dysfunkce a aterosklerózy</b> .....	36

2.6.1.	Význam myších modelů .....	36
2.6.2.	Normocholesterolemické myší modely .....	37
2.6.3.	Apolipoprotein E deficientní myší model .....	37
2.6.4.	LDL receptor deficientní myší model .....	38
2.6.5.	Apolipoprotein E/LDL receptor deficientní myší model .....	38
2.7.	<b>Myší modely pro studium vlivu endoglinu ve vztahu k endotelové dysfunkci .....</b>	<b>39</b>
2.7.1.	Endoglin conditional knockout myší model .....	39
2.7.2.	Transgenní myší model s vloženým genem pro lidský solubilní endoglin .....	39
2.8.	<b>Léčiva ovlivňující tkáňový a solubilní endoglin .....</b>	<b>40</b>
2.8.1.	Tkáňový endoglin a statiny.....	40
2.8.2.	Tkáňový endoglin a protinádorová léčba .....	41
2.8.3.	Solubilní endoglin a metformin.....	42
2.8.4.	Solubilní endoglin a resveratrol.....	42
3.	<b>Cíle práce .....</b>	<b>43</b>
4.	<b>Komentáře k pracím.....</b>	<b>44</b>
4.1.	Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta .....	45
4.2.	High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart .....	47
4.3.	Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> .....	48
5.	<b>Souhrnná diskuze.....</b>	<b>50</b>
6.	<b>Závěry .....</b>	<b>55</b>
7.	<b>Podíl předkladatelky na publikovaných pracích zahrnutých v disertační práci.....</b>	<b>56</b>
8.	<b>Přehled publikační činnosti.....</b>	<b>57</b>
9.	<b>Prezentace na konferencích.....</b>	<b>58</b>
10.	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>60</b>
11.	<b>Soubor publikovaných prací .....</b>	<b>84</b>

## 1. Úvod

Ateroskleróza, onemocnění patřící mezi civilizační choroby a doprovázející řadu kardiovaskulárních onemocnění, je jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích. Toto onemocnění je chronický a zánětlivý degenerativní proces, který se vyznačuje zejména akumulací lipidů v arteriální stěně, dále také migrací a proliferací hladkých svalových buněk, infiltrací makrofágů a zvýšenou produkcí vaziva. Hlavním rizikovým faktorem je zvýšená hladina LDL cholesterolu v krvi, která se spolupodílí na poškození funkce endotelu a narušuje tak přirozenou cévní homeostázu. Rozvoji aterosklerotického procesu napomáhají i další faktory, mezi něž patří vysoký krevní tlak, obezita, kouření, stres či genetické predispozice. Progredující aterosklerotický proces vede ke klinickým manifestacím, nejčastěji v podobě ischemické choroby srdeční a infarktu myokardu.

Endotel je hlavním regulátorem cévního tonu, a to zejména prostřednictvím udržování rovnováhy mezi vasodilatačně a vasokonstrikčně působícími faktory. Endotel též vykazuje antikoagulační a antiagregační vlastnosti. Při narušení rovnovážného stavu dochází k rozvoji endotelové dysfunkce, která je prvním a zásadním krokem v rozvoji aterosklerózy. Následkem toho dochází ke snížené schopnosti vasodilatace, což je způsobeno sníženou produkcí oxidu dusnatého (NO) a endotelové NO syntázy (eNOS), enzymu zodpovědného za tvorbu NO. Také se zvyšuje permeabilita endotelu, agregace trombocytů a adheze leukocytů. Z terapeutického hlediska jsou v léčbě aterosklerózy nejúčinnější skupinou léčiv statiny. Statiny prokazatelně snižují hladiny LDL cholesterolu v krvi a svými pleiotropními účinky příznivě modulují funkci endotelu.

Signalizační kaskáda transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF $\beta$ ) hraje ve vývoji aterosklerotického procesu významnou roli. Součástí TGF $\beta$  signalizace je tkáňový endoglin (Eng), který zde slouží jako pomocný receptor a spolu s TGF $\beta$  receptorem typu I a II vytváří aktivní receptorový komplex, jež ovlivňuje řadu funkcí endotelových buněk. Velmi důležitou úlohou Eng je jeho schopnost zvyšovat hladinu a úroveň fosforylace transkripčního faktoru Smad 2 (jež je také členem TGF $\beta$  signalizace), což vede ke zvýšené expresi eNOS endotelovými buňkami a podporuje tak funkci tohoto enzymu. V plazmě je přítomna solubilní forma Eng (sEng), která vzniká proteolytickým štěpením extracelulární domény tkáňového Eng. Zvýšené hladiny sEng byly zaznamenány u pacientů s hypercholesterolémií, aterosklerózou, diabetem mellitem II. typu či preeklampií, kde tyto hladiny korelovaly se závažností onemocnění. Tkáňový Eng by tedy mohl být považován za protektivní marker

v rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy, kdežto zvýšené hladiny sEng v plazmě představují pravděpodobně marker vaskulární poškození.

Tato disertační práce shrnuje výsledky a závěry studií, jež byly vypracovány v rámci dlouhodobého výzkumu endotelové dysfunkce a aterosklerózy na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy pod vedením prof. PharmDr. Petra Nachtigala, Ph.D. Práce je koncipována jako komentovaný soubor publikací se zaměřením na roli tkáňového a solubilní endoglinu v rozvoji endotelové dysfunkce u vybraných myších modelů.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Aterosklerotický proces a jeho morfologické aspekty

#### 2.1.1. Morfologická struktura zdravé artérie

Stěna zdravé arterie je tvořena třemi základními vrstvami, a to lumen vystýlající vnitřní vrstvou tunica intima, dále střední vrstvou tunica media a vnější vrstvou tunica adventitia (1). Tyto tři vrstvy jsou od sebe odděleny koncentrickými vlákny elastinu, která formují lamina elastica interna, tvořící hranici mezi vrstvou tunica intima a tunica media, a lamina elastica externa, která odděluje vrstvu tunica media od vnější vrstvy tunica adventitia, což je viditelné zejména u artérií muskulárního typu (2).

Z hlediska aterogeneze je nejvíce exponována vnitřní vrstva tunica intima, jež je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk, které tvoří selektivní dynamickou bariéru mezi krevním řečištěm a stromatem arteriální stěny (3). Endotel se podílí na celé řadě fyziologických procesů, mezi něž patří regulace vaskulárního tonu prostřednictvím udržování rovnováhy v produkci vasodilatačně a vasokonstrikčně působících látek, regulace cévní permeability či antiagregační působení (4).

Střední vrstva tunica media je tvořena buňkami hladké svaloviny, které leží na bazální membráně extracelulární matrix, jež je složena zejména z elastických vláken a kolagenu (2). Základní fyziologickou úlohou této vrstvy je regulovat průsvit cévy, což vede k ovlivnění vasomotorické aktivity. Zvýšená sympatická stimulace vede ke kontrakci buněk hladké svaloviny, a tedy v důsledku k vasokonstrikci. Při poklesu sympatické aktivity naopak dochází k relaxaci buněk hladké svaloviny, tedy vasodilataci (5). Vasodilatace na úrovni hladkých svalových buněk je též zprostředkována působením oxidu dusnatého (NO), který je tvořen endotelovými buňkami po stimulaci muskarinových receptorů typu III acetylcholinem, jež je mediátorem parasympatiky. NO následně difunduje z endotelových buněk do buněk hladké svaloviny (6, 7).

Vnější vrstva tunica adventitia se typicky skládá z hladkých svalových buněk, fibroblastů, kolagenu, elastinu a četných nervových vláken, která zajišťují inervaci. U velkých artérií je typická přítomnost vlastního cévního zásobení, známého jako vasa vasorum, a to z důvodu potřeby zajištění dostatečného krevního zásobení (2). Ačkoli byla adventicii přisuzována pouze vlastnost upevnění dané cévy k okolním tkáním, prokázalo se, že přítomné fibroblasty mají schopnost dynamicky reagovat na poškození cévní stěny prostřednictvím regulace vaskulárního tonu (8).

### 2.1.2. Aterosklerotický proces

Ateroskleróza, jedna z hlavních příčin morbidity a mortality ve vyspělých zemích, je zánětlivé onemocnění postihující artérie elastického i muskulárního typu, typicky se jedná o aortu či koronární artérie. Základním atributem pro rozvoj aterosklerózy je zvýšená plazmatická koncentrace cholesterolu, zejména oxidovaných částic LDL cholesterolu a jejich akumulace v arteriální stěně (9). Mezi typická predispoziční místa vzniku aterosklerotických lézí patří oblast větvení, bifurkace a zakřivení arteriálních segmentů, kde dochází k turbulentnímu a zhoršenému krevnímu průtoku (1).

Aterogeneze je charakterizována ukládáním oxidovaných LDL částic v subendotelovém prostoru, infiltrací makrofágů, proliferací buněk hladké svaloviny, akumulací složek pojivové tkáně a následnou formací trombu (10). Mezi rizikové faktory, které přispívají k rozvoji aterosklerózy, patří zvýšené hladiny LDL cholesterolu, kouření, hypertenze či diabetes mellitus II. typu (11). Existují též hypotézy o negativním vlivu infekčních mikroorganismů jako herpetické viry či bakterie *Chlamydia pneumoniae* (12, 13).

Aterosklerotický proces se typicky manifestuje ve třech fázích, a to fáze lipidových proužků, fibro-lipidových lézí a tvorba aterosklerotického plátu (14).

Prvním krokem aterogeneze je aktivace endotelových buněk, též nazývána endotelová dysfunkce, vyvolána hemodynamickou zátěží, působením volných kyslíkových a dusíkových radikálů či zvýšením počtu a modifikací LDL částic (15, 16). Při aktivaci endotelových buněk dochází ke změně permeability cévní stěny a následně k infiltraci monocytů a T-lymfocytů z krevní cirkulace do arteriální intimy (17). Subendotelový prostor se zvětšuje a vlivem zvýšené permeability endotel umožňuje snazší prostup lipoproteinových částic do tohoto prostoru. Lokální ložiska lipidů jsou v podobě takzvaných lipidových proužků. Následně probíhá proces lipoperoxidace vedoucí k uvolnění cholesterolu, který je pohlcován diferencovanými monocyty v tkáňové makrofágy (18). Tkáňové makrofágy fagocytují oxidované LDL částice prostřednictvím scavenger receptorů a modifikují se v pěnové buňky. Pěnové buňky následně indukují svými cytokiny rozvoj zánětlivé reakce v intimě cévy (19). Stěna cévy se typicky v místě poškození ztlušťuje, a to zejména kvůli přítomnosti nekrotických depozitů z rozpadlých pěnových buněk a extracelulární matrix, jež je produkována buňkami hladké svaloviny (9). Vlivem těchto patologických změn se antikoagulační charakter endotelu posouvá směrem k prokoagulačnímu a nastává další fáze aterosklerotického procesu (20).

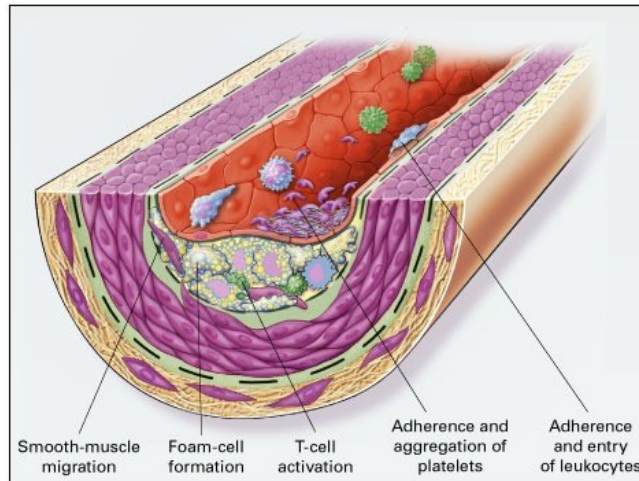
Druhá fáze aterosklerotického procesu je typická vznikem fibro-lipidových lézí. V této fázi nastává migrace a proliferace buněk hladké svaloviny směrem k lumenální straně cévní

stěny (9, 21). Buňky hladké svaloviny syntetizují složky extracelulární matrix, jež se formují do podoby fibrózní čepičky, která zakrývá lipidové jádro s nekrotickými depozity. Fibrózní čepička je složena z kolagenových vláken, makrofágů, T-lymfocytů a buněk hladké svaloviny. Její vznik vede k extracelulární hypertrofii, čímž se zmenšuje lumen cévy a dochází ke sníženému průtoku krve postiženou oblastí (22). Na povrchu léze dochází k adhezenci trombocytů, s jejichž aktivací je spojována produkce kyseliny arachidonové. Ta slouží jako prekurzor pro syntézu prostaglandinů, mezi něž patří i thromboxan A<sub>2</sub>, který způsobuje vasokonstrikci a agregaci trombocytů (23, 24). Dále z arachidonové kyseliny vznikají i leukotrieny, které potencují zánětlivou reakci v postižené oblasti (25). Tyto procesy vedou k oslabení fibrózní čepičky s konsekvencemi v podobě uvolnění kolagenu a lipidů do krevního řečiště, což přispívá k další akumulaci a adhezi trombocytů (26). Na tomto patologickém podkladu může dojít ke vzniku krevní sraženiny s klinickou manifestací ve formě blokády krevního průtoku (27).

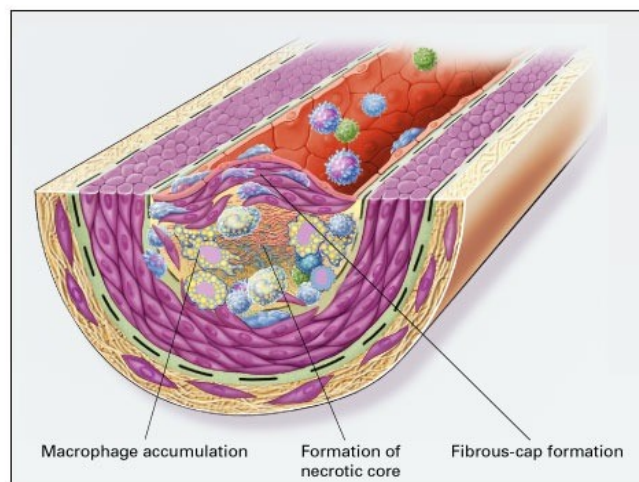
Aterosklerotický plát, rozvinutou fází aterosklerózy, lze klasifikovat dle charakteru jádra a fibrózní čepičky. Stabilní aterosklerotický plát se skládá z malého nekrotického jádra s malým obsahem lipidů a pěnových buněk. Nekrotické jádro je kryto silnou fibrózní čepičkou (28). Nestabilní plát je tvořen velkým nekrotickým jádrem bohatým na lipidy, které je obklopeno aktivovanými buňkami imunitního systému. Dochází zde k úbytku extracelulární proteoglykanové matrix, tvořené zejména fibrilárním kolagenem a fibronektinem, a tím pádem ke ztenčení fibrózní čepičky (29, 30). Na ztenčení fibrózní čepičky se svým působením také podílejí metaloproteázy (kolagenáza, elastáza či stromelysin), které jsou uvolňovány makrofágy (31). Nestabilní plát je náchylný k ruptuře, při které dochází k průniku krve do jeho nitra a obturaci lumen cévy. Ruptura plátu může vést k akutní hypoxii postižené oblasti a klinické manifestaci formou ischemických epizod, trombóz, akutních koronárních příhod a infarktů myokardu (26, 28).

Grafické vyjádření jednotlivých fází aterosklerotického procesu je znázorněno v obrázku 1, 2 a 3.

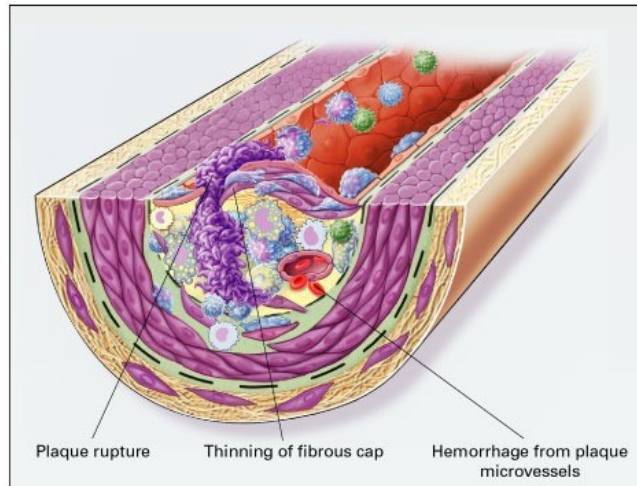




Obrázek 1: Fáze lipidových proužků. Lipidové proužky jsou zpočátku tvořeny částicemi LDL cholesterolu, monocyty, makrofágy a T-lymfocyty. Poté se k jejich formaci přidávají buňky hladké svaloviny, které podléhají procesu migrace za současné stimulace transformujícího růstového faktoru  $\beta$  či fibroblastového růstového faktoru. Následuje tvorba pěnových buněk, která je zprostředkována makrofágy fagocytujícími oxidované částice LDL cholesterolu. Charakter endotelu se posouvá směrem od antikoagulačních vlastností k prokoagulačním (9).



Obrázek 2: Vznik pokročilé aterosklerotické léze. Fáze lipidových proužků progreduje do transformace v nekrotické jádro a fibrózní čepičku. Stále probíhá akumulace makrofágů, která je spojena s působením monocytového chemotaktického proteinu 1, faktorem stimulující makrofágové kolonie a oxidovaných LDL částic. Aterosklerotické léze mají tendenci expandovat směrem do lumen cévy (9).



*Obrázek 3: Nestabilní aterosklerotický plát. Tato fáze aterosklerózy je typická ztenčením fibrózní čepičky, k čemuž dochází zejména působením metaloproteáz, které jsou produkovány makrofágy. Tyto proteolytické enzymy způsobují degradaci extracelulární matrix, což může vést k ruptuře aterosklerotického plátu a následně ke krvácení. Klinická manifestace tohoto stavu se projeví vznikem trombu a obturací lumen cévy (9).*

## **2.2. Endotel za fyziologických a patologických podmínek**

### **2.2.1. Fyziologická funkce endotelu**

Endotel je největším endokrinním orgánem lidského organismu, tvořící souvislou výstelku vnitřního povrchu cév (32). Endotel je tvořen jednou vrstvou těsně přiléhajících buněk, jejichž strukturní a funkční integrita je důležitá pro kontrolu napětí cévní stěny, a tedy i průtoku krve. Endotelové buňky působí jako dynamická polopropustná bariéra regulující vstup jednotlivých molekul (33). Endotel, kromě bariérové funkce, je též metabolicky aktivní součástí cévní stěny a podílí se na syntéze autokrinních, parakrinních a endokrinních působků, které dále ovlivňují buňky hladké svaloviny, trombocyty a leukocyty (34).

Endotel je důležitým regulátorem homeostázy prostřednictvím modulace cévního tonu, udržováním neadhezivního lumenálního povrchu a také zprostředkovává hemostázu (35). Lze říci, že endotel vystupuje jako mediátor v souhře a rovnováze tvorby prokoagulačních a antikoagulačních a proliferčních a antiproliferčních působků. Cévní tonus je na endotelové úrovni regulován vyváženou produkcí vasodilatačních a vazokonstrikčních mediátorů (36).

Schopnost endotelových buněk vyvolat arteriální vasodilataci spočívá v uvolnění vasoaktivních látek, které difundují přes vnitřní vrstvu tunica intima k hladkým svalovým

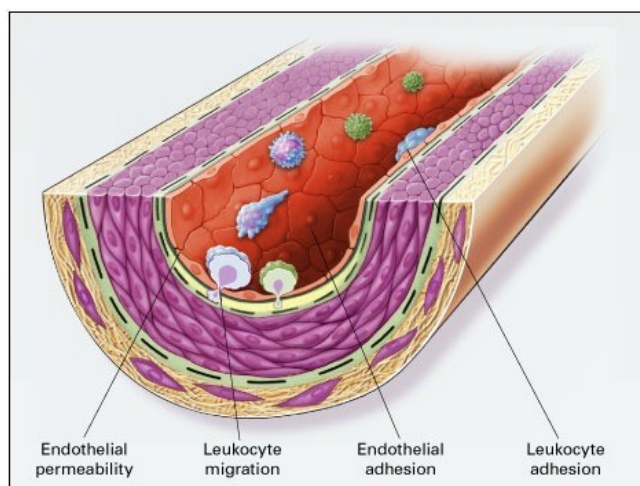
buňkám v tunica media. Uvolnění molekuly NO hraje zásadní roli při navození vasodilatace a také v ochraně endotelových buněk před koronárními onemocněními (37). Druhou významnou vasodilatačně působící substancí je prostacyklin (též prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), který má také antitrombotické účinky a inhibuje proliferaci hladkých svalových buněk (38). Kromě NO a PGI<sub>2</sub> se na vasodilataci též podílí endotelový hyperpolarizační faktor (EDHF), který je považován za difuzní faktor způsobující hyperpolarizaci hladkého svalstva a následně tedy vasodilataci prostřednictvím aktivace draslíkových kanálů (39). Lze říci, že tyto tři mediátory působí synergicky pro navození fyziologické vasodilatace, avšak dominantní roli zastává NO (40).

Endotelové buňky produkují také vasokonstrikčně působící mediátory, mezi které lze zařadit endotelin-1 (ET-1) či thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). ET-1 přispívá k regulaci cévního tonu na lokální úrovni a bylo prokázáno, že ET-1 může indukovat expresi adhezních molekul a stimulovat migraci a proliferaci hladkých svalových buněk, což naznačuje jeho proaterogenní vlastnosti (41, 42). Syntéza TXA<sub>2</sub> je katalyzována cyklooxygenázou, jež je exprimována endotelem. TXA<sub>2</sub> se následně váže na své receptory přítomné na povrchu trombocytů a tato aktivace vede k jejich agregaci. Receptory jsou též přítomné v hladkých svalových buňkách, kde po aktivaci dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů a následně k vasokonstrikci (43).

### **2.2.2. Endotelová dysfunkce**

Poškození endotelu narušuje rovnovážnou produkci vasodilatačních a vasokonstrikčních mediátorů, což vede k iniciaci řady procesů, které podporují rozvoj či exacerbaci aterosklerózy. Tyto procesy zahrnují zvýšenou permeabilitu endotelu, agregaci trombocytů, adhezi leukocytů a tvorbu cytokinů, což je znázorněno i v obrázku 4 (9). Hlavním projevem poškození endotelu a rozvoje endotelové dysfunkce je snížená produkce nebo aktivita NO, což vede k narušení schopnosti vasodilatace (44).

Endotelová dysfunkce se podílí na patogenezi kardiovaskulárních onemocnění, tedy předchází i rozvoji aterosklerózy (45). Dysfunkce endotelu, která je výsledkem jeho poranění, vede k aktivaci kompenzačních reakcí a narušení homeostatických vlastností endotelu. Zvyšuje se adheze endotelu vzhledem k leukocytům nebo trombocytům a také se mění jeho permeabilita. Dochází k rozvoji zánětlivé odpovědi, což stimuluje migraci a proliferaci hladkých svalových buněk (9).



*Obrázek 4: Endotelová dysfunkce. První změny, které nastávají před rozvojem aterosklerotických lézí, probíhají v endotelu. Můžeme mezi ně zařadit zvýšenou permeabilitu pro lipoproteiny a další složky plazmy či zvýšenou expresi adhezních molekul, které umožňují diapedézu leukocytů z krevního řečiště do subendotelového prostoru (9).*

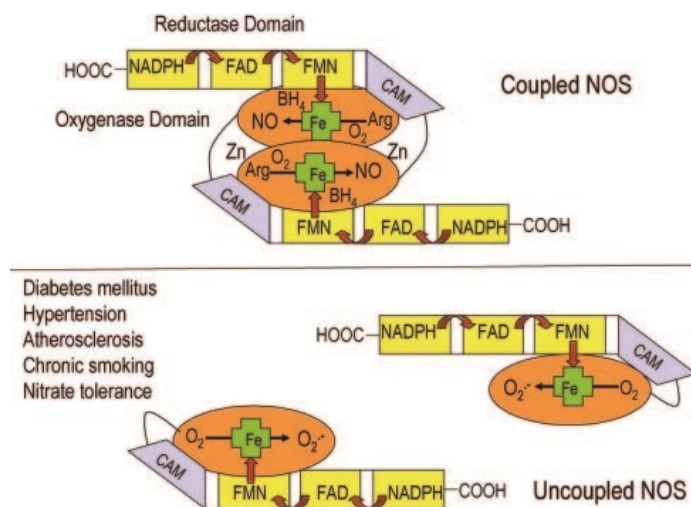
### **2.2.3. Fyziologická úloha NO a eNOS a důsledky jejího narušení**

NO je konstitutivně syntetizován v endotelových buňkách. Syntéza probíhá z aminokyseliny L-argininu za katalytického působení eNOS. Pro biosyntézu NO je zapotřebí řada kofaktorů, mezi něž patří tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) či kalmmodulin. Po syntéze dochází k difúzi tohoto plynu přes membránu endotelových buněk a vstupu do hladkých svalových buněk přítomných v tunica media. Zde aktivuje guanylátcyklázu, což vede ke zvýšení intracelulární koncentrace cyklického guanosin-3, 5-monofosfátu (cGMP). cGMP funguje jako druhý posel a zprostředkovává biologické účinky NO, které vedou k udržení cévní homeostázy. Jedná se o široké spektrum biologických účinků zahrnující kontrolu cévního tonu, potlačení agregace trombocytů, migraci leukocytů a buněčnou adhezi k endotelu. Dále zmírňuje proliferaci a migraci buněk hladkého svalstva. Kromě těchto účinků může NO také inhibovat aktivaci a expresi určitých adhezních molekul a ovlivňovat produkci superoxidového aniontu, který způsobuje oxidační stres. Molekula NO je velmi nestabilní a má krátký biologický poločas v řádu několika sekund (46). Metabolismus NO probíhá formou oxidace, kdy nejprve dochází ke vzniku meziprojektu ve formě dusitanu, který je posléze oxidován na dusičnan, jež je vylučován do moči (47). NO hraje zásadní roli v udržení fyziologické funkce endotelu. Při poklesu produkce NO dochází ke změně vaskulárního fenotypu, který je náchylnější k rozvoji endotelové dysfunkce a následně k rozvoji aterosklerózy (48).

Hemodynamické smykové napětí je důležitým fyziologickým podnětem, který vede k uvolňování NO z endotelových buněk. Uvolňování NO nastává při aktivaci signální dráhy, která vede ke zvýšení exprese mRNA a proteinové úrovně eNOS s následnou fosforylací tohoto enzymu (p-eNOS) (49). Fosforylace eNOS je považována za hlavní posttranslační modifikaci ovlivňující aktivitu enzymu. Změna na úrovni fosforylace umožňuje rychlé reakce na různé mechanické, humorální, metabolické či farmakologické stimuly (50). Fosforylace v pozici Ser1177 poskytuje nejdůležitější pozitivní modulaci aktivity eNOS a přímo vede ke zvýšené aktivitě enzymu.

Snížená aktivita NO, projevující se narušenou endotel dependentní vasodilací, je považována za počáteční a charakteristický projev rozvoje endotelové dysfunkce, jež nastává ještě před strukturálními změnami cévní stěny (49). Základní mechanismus vedoucí k narušení endotel dependentní vasodilatace je porucha eNOS signalizační kaskády, což zahrnuje sníženou expresi a enzymatickou aktivitu eNOS a také sníženou senzitivitu na NO (51). Dalším důležitým mechanismem zhoršené endotel dependentní vasodilatace, jež nastává při hypercholesterolémii a rozvoji aterosklerózy, je zvýšená degradace NO způsobená interakcí se superoxidovým radikálem. Tato interakce vede k produkci peroxynitritu, který může oxidovat BH<sub>4</sub> a také redukovat buněčný transport L-argininu, substrátu eNOS pro produkci NO (52). Tyto děje vedou k tzv. rozpojení eNOS (uncoupling), jež produkuje spíše superoxidový radikál než NO, a tím pádem podporuje další vznik peroxynitritu a inaktivaci NO (53).

Mechanismus vedoucí k preferenční tvorbě superoxidového radikálu je znázorněn v obrázku 5.



Obrázek 5: Mechanismus rozpojení eNOS. Stimul pro rozpojení eNOS nastává při změně toku elektronů. Proud elektronů začíná z koenzymu nikotinamidadeninukleotid fosfátu (NADPH) a pokračuje na reduktázové domény flavinadeninukleotidu (FAD) a flavinmononukleotidu (FMN), jež dodávají elektrony atomu železa v oxygenázové doméně molekule hemu a trihydrobiopterinovému radikálu ( $BH_3$ ).  $BH_3$  je generován jako meziprodukt katalytického cyklu, který vede ke konečným produktům, tedy NO a L-citrulinu.  $BH_4$  je nezbytný pro darování protonu a elektronu univerzálním meziproduktům v reakčním cyklu L-arginin a eNOS, jež vedou k tvorbě NO, L-citrulinu a kyslíku. Kalmodulin (CAM) řídí tok elektronů v eNOS a ionty zinku (Zn) vázané na eNOS jsou potřebné pro tvorbu dimeru a jeho stabilitu. V přítomnosti monomerního (rozpojeného) eNOS, jež nastává při stavu deficiencie substrátu L-argininu či kofaktoru  $BH_4$ , dochází k odklonu elektronů spíše na molekulární kyslík než L-arginin, což vede k preferenční tvorbě superoxidového radikálu před produkcí NO (54).

#### 2.2.4. Vliv buněčných adhezních molekul na rozvoj endotelové dysfunkce

Rozvoj endotelové dysfunkce zahrnuje infiltraci zánětlivých buněk z cirkulace do subendotelového prostoru prostřednictvím transendotelové migrace. Tento proces je zprostředkován převážně buněčnými adhezními molekulami, které jsou exprimovány cévním endotelem a cirkulujícími leukocyty v reakci na zánětlivé stimuly (55). Selektiny a jejich ligandy umožňují kutálení leukocytů po povrchu cévní stěny a následné vytvoření křehkých vazeb mezi leukocyty a endotelovými buňkami (56). Intercelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1) a buněčná adhezní molekula 1 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1), patřící do skupiny imunoglobulinů, jsou exprimovány

cytokiny aktivovaným endotelem a zprostředkovávají pevnou adhezi zánětlivých buněk k cévnímu endotelu (57). Imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které zprostředkovávají řadu efektorových funkcí, mezi něž patří regulace endotelového fenotypu či ovlivnění funkce leukocytů (58). Destičková adhezní molekula 1 (PECAM-1, platelet endothelial cellular adhesion molecule 1) reguluje vstup leukocytů z krevního řečiště do subendotelového prostoru a také se podílí na integritě cévní stěny (59). Při rozvoji endotelové dysfunkce je funkce PECAM-1 narušena, což vede ke zvýšené permeabilitě endotelu projevující se zvýšenou extravazací leukocytů (60). Lze konstatovat, že adhezní molekuly významně participují ve vývoji endotelové dysfunkce i dalších fázích aterosklerotického procesu a nestabilitě aterosklerotických plátů (55).

Typickou buněčnou adhezní molekulou je P-selektin, který je skladován ve Weibel-Paladeho tělískách endotelových buněk a alfa granulích trombocytů, z nichž je velmi rychle uvolňován při aktivaci endotelových buněk. P-selektin je exprimován v průběhu akutního i chronického zánětu a zprostředkovává kutálení monocytů a neutrofilů po povrchu endotelu (61). Expresi P-selektinu a následná adheze monocytů na aktivovaný endotel je indukována oxidovanými LDL částicemi (62). Také byla potvrzena detekce P-selektinu na endotelu aterosklerotických plátů, nikoli však na zdravém endotelu bez známek zánětu (63). Trombocyty exprimují P-selektin a zároveň jim je přisuzována aktivní role v interakci s endotelem ve stavu zánětu a při vazbě P-selektinu na endotel. Během těchto interakcí dochází k přichycení trombocytů k povrchu endotelu, což následně vede ke zvýšené adhezi monocytů. Trombocyty interagují též s monocyty a zvyšují afinitu leukocytárních integrinů, a to prostřednictvím tvorby prozánětlivých chemokinů (64, 65). Zvýšenou expresi P-selektinu lze tedy považovat za raný projev a ukazatel rozvoje endotelové dysfunkce.

Dalším typickým znakem, který reflektuje aktivovaný stav endotelu, je zvýšená exprese VCAM-1. VCAM-1 je glykoprotein exprimován převážně endotelovými buňkami (66). Tato exprese je aktivována prozánětlivými cytokiny, superoxidovým radikálem, oxidovanými částicemi LDL cholesterolu či smykovým napětím (67). VCAM-1 je hlavním regulátorem adheze leukocytů a transendotelové migrace prostřednictvím interakce s  $\alpha 4\beta 1$  integrinem.  $\alpha 4\beta 1$  integrin je exprimován na leukocytech a adhezuje k VCAM-1 na povrchu endotelových buněk, čímž dochází k aktivaci signální dráhy v aktivovaném endotelu, což umožňuje transendotelovou migraci leukocytů (68). VCAM-1 je považován za marker zánětu a jeho zvýšenou expresi lze detekovat na úrovni predispozičních regionů vaskulárního řečiště, které charakteristicky postihuje ateroskleróza (69). Jedná se především o místa zakřivení cév a bifurkace s typicky oscilačním krevním průtokem, který indukuje zvýšenou expresi



zánětlivých adhezních molekul, jako je VCAM-1 (70). Též bylo prokázáno, že exprese VCAM-1 je regulována oxidovanými LDL částicemi, které vedou ke zvýšené tvorbě tohoto zánětlivého markeru prostřednictvím aktivace nukleárního faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) (71, 72).

Kromě zvýšené exprese VCAM-1, lze pozorovat také zvýšenou expresi ICAM-1. ICAM-1 patří do skupiny imunoglobulinů a má zásadní roli při přichycení leukocytů kolujících v krevním řečišti k povrchu endotelu a následně umožňuje jejich transmigraci do tkání (73). ICAM-1 je konstitutivně v nízkých hladinách exprimován endotelovými buňkami, avšak působením zánětlivých cytokinů či reaktivních forem kyslíku dochází k výraznému zvýšení jeho exprese (74). ICAM-1 přímo přispívá k zánětlivým reakcím v cévní stěně zvýšením aktivace endotelových buněk a také je přítomen v aterosklerotických lézích, kde je zapojen do jejich progresu (75). Solubilní forma ICAM-1 (sICAM-1) je přítomna v plazmě a její zvýšené hladiny lze pozorovat v séru pacientů s kardiovaskulárními onemocněními, kde několik studií poukázalo na korelaci hladin sICAM-1 v séru se závažností těchto onemocnění (76, 77). Dokonce byla pozorována korelace mezi zvýšenými hladinami sICAM-1 a progresí aterosklerotických lézí (78). Dle uvedených dat lze považovat ICAM-1 i jeho solubilní formu za markery reflektující rozvoj aterosklerotického procesu.

## **2.3. TGF $\beta$ signalizační kaskáda**

### **2.3.1. TGF $\beta$ cytokin**

Transformující růstový faktor beta (TGF $\beta$ ), pleiotropní polypeptid, kontroluje řadu biologických procesů, včetně buněčné proliferace, buněčné migrace, syntézy extracelulární matrix, kalcifikace a imunitní reakce. Všechny tyto děje provází aterosklerotický proces (79). Členové TGF $\beta$  rodiny regulují buněčné funkce prostřednictvím signalizace zahrnující transmembránové receptory se serin/threonin kinázovou aktivitou a Smad proteiny. Změny v expresi či aktivitě jednotlivých členů TGF $\beta$  signalizace mohou přispět k širokému spektru patologií, mezi něž patří i kardiovaskulární onemocnění (80).

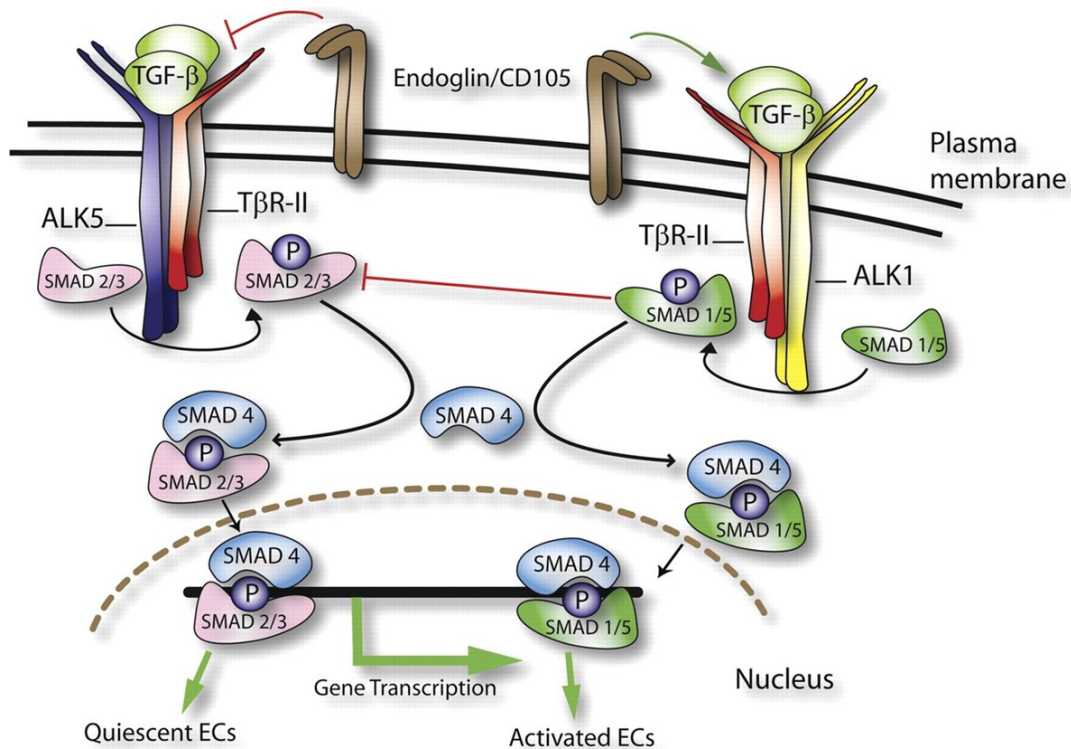
TGF $\beta$  rodina cytokinů sestává ze tří izoform, a to TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 a TGF $\beta$ 3. Nicméně TGF $\beta$  nadrodina je velká a kontinuálně se rozšiřující skupina regulačních polypeptidů, a tudíž kromě modelové TGF $\beta$  rodiny se do ní řadí i kostní morfogenetické proteiny (BMP), růstové a diferenciační faktory a také aktiviny a inhibiny (81). TGF $\beta$  cytokiny jsou syntetizovány jako latentní prekurzory, které jsou aktivovány proteázami katalyzovaným štěpením s následným uvolněním biologicky aktivního fragmentu (82).



Uvolnění biologicky aktivních homodimerů TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 a TGF $\beta$ 3 vede k interakci s receptorovým komplexem, který je tvořen dvěma podjednotkami, a to TGF $\beta$  receptorem I (TGF $\beta$ RI) a TGF $\beta$  receptorem II (TGF $\beta$ RII) (83). TGF $\beta$ RI i TGF $\beta$ RII jsou transmembránové glykoproteiny, které prostupují celou buněčnou membránou. TGF $\beta$  cytokiny vytváří vazbu s TGF $\beta$ RI a TGF $\beta$ RII, což vede k transdukcii intracelulárního signálu a aktivaci transkripčních faktorů z rodiny Smad proteinů (84). K přenosu intracelulárního signálu dochází prostřednictvím receptorů nazývaných activin-like kinázy (ALK), v endotelových buňkách se konkrétně jedná o typ ALK1 a ALK5 (85). Kromě TGF $\beta$ RI a TGF $\beta$ RII se zde nachází pomocné receptory typu III (TGF $\beta$ III, betaglykan a endoglin). TGF $\beta$ III není typický receptor schopný přenášet signál, jelikož neobsahuje doménu se serin/threoninovou aktivitou, ale má funkci koreceptoru, který je schopný prezentovat TGF $\beta$  cytokin receptorovému komplexu a nepřímo modifikovat jeho aktivity v extracelulárním prostoru (86, 87).

Smad proteiny se dělí do tří skupin podle své funkce na regulační (Smad 1, 2, 3, 5 a 8), mediátorové (Smad 4) a inhibiční (Smad 6 a 7) (88). Aktivovaná receptorová podjednotka TGF $\beta$ RI zahajuje fosforylaci regulačního Smad proteinu, což je rozhodující pro přenos signálu. Fosforylací aktivovaný regulační Smad vytváří komplex se Smad 4 za vzniku heterotrimeru, který sestává z dvou fosforylovaných regulačních Smad proteinů a jednoho mediátorového Smad proteinu (84). Tento komplex je transportován do buněčného jádra, kde se spojuje s dalšími kofaktorovými proteiny a dochází k zahájení procesu genové transkripce (89). Inhibiční Smad proteiny jsou zodpovědné za negativní přenos signálů kompeticí s regulačními Smad proteiny ve vazbě na receptor nebo mediátorový Smad protein. Výsledný efekt vede k proteolytické degradaci regulačních Smad proteinů (90). Kromě intracelulárního přenosu signálu Smad proteiny může TGF $\beta$  receptorový komplex využívat i jiné aktivační cesty (91). Další možnou cestou pro přenos signálu do jádra jsou mitogenem aktivované proteinkinázy či fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza (92, 93).

Schéma Smad dependentní regulace TGF $\beta$  signální dráhy je znázorněno v obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma TGFβ signalizace v endotelových buňkách. TGFβ reguluje stav endotelu prostřednictvím aktivace dvou typů receptoru I s následnou signalizací Smad proteinů. Aktivace ALK-1 vede k fosforylaci transkripčního faktoru Smad 1/5 (pSmad 1/5), kdežto aktivace ALK-5 vede k fosforylaci transkripčního faktoru Smad 2/3 (pSmad 2/3). Fosforylované Smad proteiny vytváří komplex s mediátorovým Smad 4 a následně vstupují do jádra, kde regulují transkripci příslušných genů. Signalizační dráha ALK-1 a pSmad 1/5 vede ke zvýšené proliferaci a migraci endotelových buněk, naopak signalizační dráha ALK-5 a pSmad 2/3 inhibuje oba tyto procesy. Endoglin, též označován CD105, v této signalizaci vystupuje jako pomocný receptor (85, 94).

### 2.3.2. TGFβ1 cytokin a jeho význam v aterogenezi

Je známo, že řada členů TGFβ rodiny hraje roli ve vaskulární biologii a úloha TGFβ cytokinu v aterosklerotickém procesu je předmětem diskuze již po desetiletí. TGFβ1 cytokin je prvním objeveným a též nejlépe prozkoumaným členem TGFβ rodiny. Ve vysokých hladinách je přítomen ve stěně zdravých cév, kdežto izoforma TGFβ2 se zde nenachází vůbec a izoforma TGFβ3 jen v nízkých hladinách (95).

Předpokládalo se, že TGF $\beta$ 1 cytokin hraje důležitou roli při udržování normální struktury cévní stěny a že ztráta tohoto ochranného účinku přispívá k rozvoji aterosklerózy (95). Řada studií se zaměřila na studium vlivu TGF $\beta$ 1 na buňky hladké svaloviny v cévní stěně, kde se podařilo prokázat, že tento cytokin inhibuje proliferaci buněk hladkého svalstva (96-98). Mimo to se také prokázal inhibiční efekt na migraci hladkých svalových buněk (99).

Kromě protektivního působení TGF $\beta$ 1 cytokinu na buňky hladké svaloviny se ve studii ukázalo i jeho protizánětlivé působení. Při knockoutu genu, který vede v důsledku ke ztrátě funkce, dochází k nekontrolované extravazaci leukocytů na úrovni téměř každého orgánového systému (100). Akumulace leukocytů, a to zejména makrofágů, je charakteristickým znakem reflektujícím změnu struktury cévní stěny směrem k tvorbě aterosklerotických lézí. Snížená aktivita TGF $\beta$ 1 cytokinu byla považována za signál vedoucí ke zvýšené akumulaci leukocytů současně se zvýšenou proliferací, migrací a dediferenciací buněk hladké svaloviny (9, 101).

S ohledem na stabilitu aterosklerotického plátu je důležité zmínit, že TGF $\beta$ 1 cytokin stimuluje produkci extracelulární matrix (102). Následná interakce extracelulární matrix a buněk hladké svaloviny je dynamický proces, který vede k aktivaci signálních drah, jež regulují proliferaci, migraci, kontraktilitu a produkci cytokinů buňkami hladké svaloviny (95). TGF $\beta$ 1 cytokin se také podílí na udržování stability plátu prostřednictvím své imunoregulační úlohy, kdy potlačuje infiltraci leukocytů a také prostřednictvím své fibrogenní aktivity (103).

Na druhou stranu je nutno zmínit, že TGF $\beta$ 1 cytokin jako regulátor syntézy extracelulární matrix má i řadu účinků na syntézu proteoglykanů. Konkrétně se jedná o duální efekt, který může zvýšit aterogenitu extracelulární matrix. TGF $\beta$ 1 stimulace syntézy proteoglykanů vede ke zvýšenému vychytávání částic LDL cholesterolu, čímž se následně zvyšuje i jejich retence v cévní stěně, což urychluje aterosklerotický proces (104, 105). Navíc LDL částice podléhají lipoperoxidaci, což může vést ke zvýšené produkci TGF $\beta$ 1 makrofágy, čímž je opět podpořena syntéza proteoglykanů a vytváří se tak cyklus dějů podporujících rozvoj aterosklerózy (106). Také bylo prokázáno, že TGF $\beta$ 1 cytokin je vysoce exprimován v aterosklerotických plátech (107).

Role TGF $\beta$ 1 cytokinu v aterosklerotickém procesu je tedy ambivalentní.

### 2.3.3. TGF $\beta$ receptor I a jeho vztah k ateroskleróze

Endotelové buňky exprimují dva typy TGF $\beta$ RI, a to ALK-5 a ALK-1, který ovšem pro svou funkci vyžaduje přítomnost ALK-5. Aktivace ALK-1 je zprostředkována serin/threonin kinázovou aktivitou ALK-5, který zároveň umožňuje jeho vazbu na TGF $\beta$  receptorový komplex (108). Na úrovni endotelových buněk TGF $\beta$ /ALK-1 signalizace indukuje opačné biologické procesy než TGF $\beta$ /ALK-5 a tuto signalizaci je schopna i přímo antagonizovat (85). Tyto dvě signalizační dráhy umožňují přirozenou rovnováhu v ladění základních funkcí endotelových buněk na efektorové úrovni TGF $\beta$  receptorového komplexu (109).

Z hlediska funkční složky a výsledných efektů aktivace TGF $\beta$ RI platí, že TGF $\beta$ /ALK-5 signalizační dráha prostřednictvím fosforylace transkripčního faktoru Smad 2/3 vede k inhibici buněčné proliferace a migrace, zatímco TGF $\beta$ /ALK-1 signalizační dráha prostřednictvím fosforylace transkripčního faktoru Smad 1/5 oba tyto procesy stimuluje (109). Rovnováha mezi klidovým a aktivovaným stavem endotelových buněk je regulována interakcemi mezi TGF $\beta$ /ALK-5 a TGF $\beta$ /ALK-1, které se mezi sebou vzájemně přepínají a určují tak osud migrační a proliferační aktivity (110).

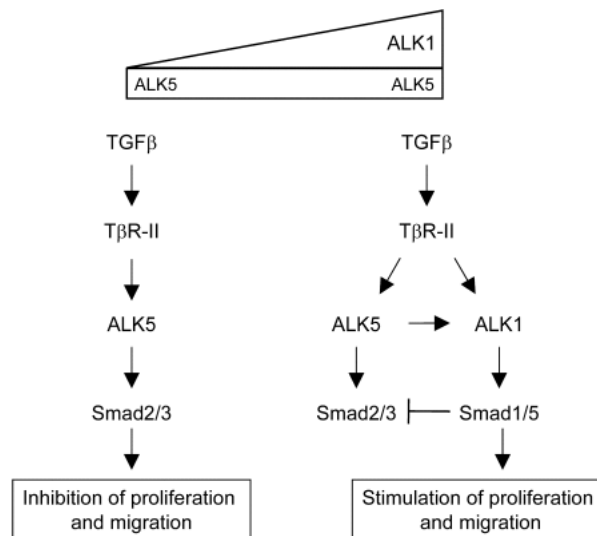
ALK-1 je převážně exprimován endotelovými buňkami, kde hraje významnou roli v regulaci angiogeneze, a dále je exprimován buňkami hladké svaloviny, monocyty či makrofágy. ALK-5 je exprimován převážně buňkami hladké svaloviny (111, 112). ALK-1 interaguje s ostatními členy TGF $\beta$  rodiny, včetně TGF $\beta$ RII a ALK-5, se kterými vytváří komplex, jehož tvorba je zvyšována působením TGF $\beta$ 1 cytokinu. Zaměříme-li se na vztah ALK-1 a ALK-5, je nutno zmínit, že zvýšená exprese ALK-1 tlumí ALK-5 signalizaci, kdežto zvýšená exprese ALK-5 potencuje ALK-1 signalizaci (85).

Bylo prokázáno, že exprese ALK-1 hladkými svalovými buňkami zvyšuje jejich proliferaci a diferenciaci a exprese ALK-1 endotelovými buňkami vede k jejich zvýšené proliferaci a migraci (80, 113). Z hlediska aterosklerotického procesu bylo dokázáno, že exprese ALK-1 je indukována v několika oblastech aterosklerotických lézí včetně endotelu, neointimy a jádra léze (114). ALK-1 signalizace tedy hraje důležitou roli při rozvoji aterosklerotické léze a dále vystupuje jako regulátor proliferace a diferenciaci hladkých svalových buněk, a to během vývoje i progresu aterosklerotického procesu (115). Dále byla pozorována zvýšená exprese ALK-1 současně se sníženou velikostí aterosklerotických plátů u ApoE/LDLR deficientních myší po podávání atorvastatinu (ATV) (116) a zároveň u těchto myší byla zaznamenána snížená exprese ALK-1 po podávání cholesterolové diety (117).

Naproti tomu bylo zjištěno, že apikálně lokalizovaná extracelulární doména ALK-1 může vázat cirkulující ApoB100 složku LDL cholesterolu, čímž zprostředkovává transcytózu LDL částic do subendotelového prostoru a iniciuje tak tvorbu aterosklerotických lézí (118).

Jak již bylo zmíněno, signalizační dráha TGF $\beta$ /ALK-5 vede k udržování klidového stavu endotelu prostřednictvím inhibice proliferace a migrace endotelových buněk. Syntéza ALK-5 byla v nízké míře detekována ve stěně zdravé cévy, kdežto ve fázi lipidových proužků a fibro-lipidových lézí byla zaznamenána vysoká exprese naznačující aktivní roli ALK-5 při retenci lipidů v subendotelovém prostoru a aktivaci proteolytického systému makrofágů (107). V pokročilé fázi aterosklerotického procesu je ovšem exprese ALK-5 opět snížena, což vede k utlumení proliferace buněk hladké svaloviny (107).

Úloha TGF $\beta$ RI v rozvoji aterosklerózy je značně kontroverzní a nelze ji přesně definovat jako proaterogenní či antiaterogenní. Výsledné působení tohoto receptoru na endotelové buňky je určováno rozdílnou expresí ALK-1 a ALK-5 v různých podmínkách. Základní mechanismus působení je znázorněn v obrázku 7.



Obrázek 7: Schematické znázornění aktivace TGF $\beta$  receptorů v endotelových buňkách. ALK-1 a ALK-5 mají opačný efekt na migraci a proliferaci endotelových buněk. Poměr mezi expresí ALK-1 a ALK-5 určuje, zda TGF $\beta$  signalizace povede k aktivovanému či klidovému stavu endotelových buněk (85).

## 2.4. Tkáňový endoglin

### 2.4.1. Struktura a exprese tkáňového endoglinu

Endoglin (Eng, CD105, TGF $\beta$ RIII) je homodimerický transmembránový glykoprotein tvořený dvěma identickými podjednotkami, vzájemně vázanými disulfidickými můstky, o molekulové hmotnosti 95 kDa (119). Molekula endoglinu sestává ze tří domén, a to extracelulární, transmembránové a krátké intracelulární (120). Homologní struktura byla identifikována u myši, kde aminokyselinové sekvence vykazují více než 70% identitu se sekvencemi lidského Eng (121). Při studiu struktury této molekuly bylo zjištěno, že existují dvě izoformy, jež se liší délkou intracelulární domény a stupněm fosforylace. L-endoglin (L-Eng), převažující izoforma exprimovaná zejména endotelovými buňkami, má ve své intracelulární doméně sekvenci 47 aminokyselin, zatímco minoritní izoforma S-endoglin (S-Eng) obsahuje intracelulární doménu o pouhých 14 aminokyselinách (122). Eng tvoří vazbu s různými členy TGF $\beta$  rodiny, avšak děje se tak pouze v přítomnosti signalizačních TGF $\beta$  receptorů typu I a II (123, 124).

Eng je exprimován různými typy buněk, které se nachází ve stěně krevních cév. Expresi Eng byla detekována u endotelových buněk, monocytů a makrofágů, fibroblastů a buněk hladkého svalstva cév (125). Zvýšená exprese byla zaznamenána v průběhu hypoxie či cévního poškození. Během hypoxického stavu dochází k tvorbě multiproteinového komplexu Eng s transkripčními faktory Smad 3 a Smad 4, což vede ke stimulaci specifického proteinu 1 (SP1) a hypoxií indukovaného proteinu 1 (126). Bylo prokázáno, že SP1 je nezbytný pro bazální expresi Eng a také, že interaguje s transkripčním Kruppel-like faktorem 6 (KLF6), což významně ovlivňuje transkripci Eng během poškození cévy (127, 128). Smad dependentní dráha TGF $\beta$  signalizace taktéž podporuje zvýšenou expresi Eng, a to prostřednictvím synergického působení se SP1 a následnou přímou interakcí v oblasti proximálního promotoru pro Eng (129, 130). Dále bylo zjištěno, že Eng hraje významnou roli v procesu angiogeneze, kdy jeho vysoká exprese je spojována s neovaskularizací hypoxií postižených oblastí jako jsou aterosklerotické tkáně či nádory (125, 131-133).

### 2.4.2. Funkce tkáňového endoglinu

Eng byl identifikován jako nesignalizační koreceptor pro členy TGF $\beta$  rodiny, jelikož neobsahuje vnitřní kinázovou aktivitu. Předpokládá se, že hlavní funkcí Eng je regulace TGF $\beta$

signalizace prostřednictvím interakce s TGF $\beta$  receptory. Eng váže izoformy TGF $\beta$ 1 a TGF $\beta$ 3 cytokinu, což následně vede k zacílení cytosolové domény Eng serin/threonin kinázami a poté dochází k tvorbě funkčního receptorového komplexu (134). Přestože Eng není skutečným TGF $\beta$  receptorem, tak je schopen silně modulovat úroveň fosforylace TGF $\beta$ RII, ALK-1 a ALK-5, což výsledně vede k rozdílným účinkům na endotelové buňky (135). Signalizační dráha Eng/ALK-1/Smad 1/5 stimuluje migraci, proliferaci a tvorbu nových endotelových buněk, což vede k podpoře angiogeneze (136). Naproti tomu signalizační dráha Eng/ALK-5/Smad 2/3 inhibuje migraci a proliferaci endotelových buněk, čímž inhibuje jejich aktivitu i angiogenezi (137). Jak již bylo zmíněno, obě izoformy L-Eng a S-Eng jsou schopné vazby na své ligandy a následné interakce s ALK-1 a ALK-5, nicméně se mezi sebou liší afinitou k jednotlivým receptorům, úrovní fosforylace a schopností regulovat signály z TGF $\beta$  kaskády (138). L-Eng má proangiogenní účinky zprostředkované indukci exprese eNOS, kdežto S-Eng vykazuje antiangiogenní účinky (139).

Také je důležité zmínit, že Eng hraje významnou roli v kardiovaskulárním vývoji a vaskulární remodelaci. Exprese Eng je modulována během vývoje srdce a typicky je zvýšena na úrovni mesenchymálních buněk atrioventrikulárního kanálu při formování srdečních chlopní a přepážek (140, 141). Funkce Eng ve vaskulární morfogenezi byla prokázána u Eng deficientních myší, jejichž embrya umírají v 10.-11. dni intrauterinního vývoje v důsledku vaskulárních a srdečních abnormalit (142, 143).

### **2.4.3. Úloha tkáňového endoglinu v rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy**

Endotelová dysfunkce hraje zásadní roli ve vývoji aterosklerózy, jejíž nedílnou součástí je migrace a proliferace buněk hladké svaloviny, což jsou procesy ovlivňující stabilitu aterosklerotického plátu. TGF $\beta$  signalizace, jejímž je Eng členem, podporuje regeneraci endotelových buněk a též bylo zaznamenáno, že inhibice této signalizace snižuje obsah kolagenu, a tím pádem i stabilitu aterosklerotického plátu u myšího modelu aterosklerózy (144, 145). Na základě těchto dat lze usuzovat, že Eng, jakožto pomocný receptor exprimovaný endotelovými buňkami a buňkami hladké svaloviny, může hrát důležitou roli v modifikaci vývoje aterosklerotického procesu prostřednictvím regulace ateroprotektivních účinků indukovaných TGF $\beta$  signalizací (139).

Exprese Eng ve zdravých arteriích je velmi nízká, kdežto u časných aterosklerotických lézí byla detekována zvýšená exprese makrofágy, buňkami hladkého svalstva a endotelovými

buňkami (125). V pokročilých aterosklerotických lézích buňky hladké svaloviny exprimovaly Eng ve vysoké míře, což byl parametr nezávislý na morfologii buněk hladké svaloviny či na infiltraci leukocytů. Eng navíc moduluje expresi genů, které jsou spojeny s proangiogenními účinky, mezi něž patří vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), angiopoetin-1 či angiopoetin-2 (146, 147).

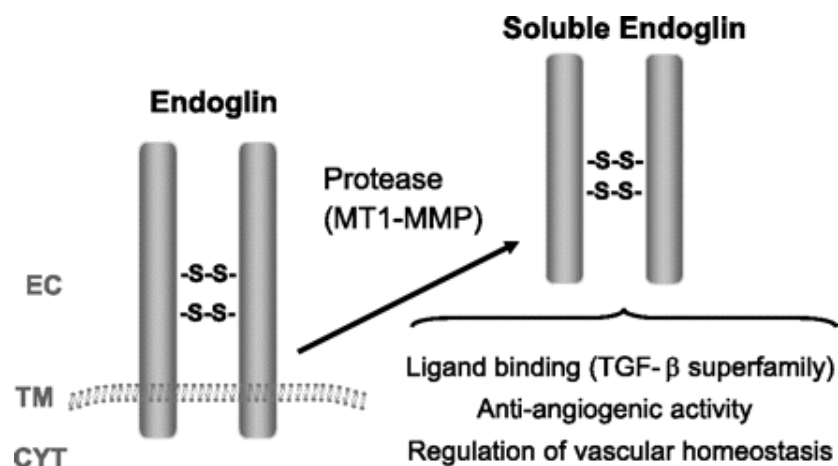
Z pohledu rozvoje endotelové dysfunkce je nutno poukázat na vztah Eng a eNOS. eNOS je klíčový enzym zodpovědný za produkci NO endotelem a jeho pokles je spojován s rozvojem endotelové dysfunkce. Experimentálně bylo prokázáno, že endoglin haploinsuficientní myši (Eng<sup>+/-</sup>) vykazují pokles v expresi eNOS, což má za následek narušení endotel dependentní vasodilatace u těchto myší (148). Dále bylo zjištěno, že Eng je nezbytnou složkou komplexu aktivujícího eNOS, podílí se také na udržování stability tohoto enzymu a usnadňuje asociaci eNOS s proteinem tepelného šoku 90 (heat shock protein 90), což ukazuje na klíčovou roli Eng ve správné funkci endotelových buněk a lokální regulaci vaskulárního tonu (149). Eng zvyšuje hladinu, úroveň fosforylace a stabilitu transkripčního faktoru Smad 2, čímž zvyšuje expresi eNOS endotelovými buňkami a podporuje tak funkci eNOS (150). Studium eNOS deficientního myšího modelu aterosklerózy prokázalo zrychlenou tvorbu aterosklerotických lézí u těchto myší a také byla detekována koexprese Eng a eNOS v cévním endotelu (53, 151). Všechna tato data nasvědčují tomu, že Eng v patogenezi endotelové dysfunkce zaujímá protektivní roli.

## **2.5.Solubilní endoglin**

### **2.5.1. Vznik a struktura solubilního endoglinu**

Solubilní forma endoglinu (sEng) vzniká odštěpením extracelulární domény tkáňově vázaného Eng do cirkulace působením metaloproteázy membránového typu 14 (MMP-14) (Obr. 8). MMP-14 štěpí Eng v pozici 586 a následně dochází k uvolnění téměř celé extracelulární domény. MMP-14 je vysoce exprimována maligními epitelovými a endotelovými buňkami a také bylo zjištěno, že může přirozeně vystupovat jako antagonist TGFβ signalizace (152, 153).





Obrázek 8: Vznik sEng proteolytickým štěpením extracelulární domény ikáňového Eng pomocí metaloproteázy MMP-14 (MT1-MMP). MMP-14 působí v juxtamembránové oblasti a vede tak k uvolnění ektodomény Eng (152, 154).

### 2.5.2. Solubilní endoglin v kontextu hypercholesterolémie a endotelové dysfunkce

Hypercholesterolémie je jeden z hlavních rizikových faktorů rozvoje endotelové dysfunkce a následně i aterosklerotického procesu. Stav hypercholesterolémie a současně zvýšené hladiny sEng v plazmě byly zaznamenány u pacientů s aterosklerózou. Korelace zvýšených hladin sEng s hladinou celkového cholesterolu avšak nebyla doprovázena korelací s dalšími ukazateli endotelové dysfunkce, jako je např. exprese E-selektinu (155). Zvýšené hladiny sEng byly detekovány u pacientů s familiární hypercholesterolémií a i v tomto případě hladiny sEng korelovaly s hladinou celkového cholesterolu. Terapeutická intervence v podobě LDL-aferézy vedla kromě poklesu celkového cholesterolu i k poklesu hladin sEng. Pozorovaný pokles hladin sEng nebyl přičítán pouze LDL-aferéze, ale došlo také ke snížené aktivitě endotelových buněk a buněk imunitního systému po odstranění aterogenních prvků (155). Jiná studie ukázala, že počáteční stádia aterosklerotického procesu jsou doprovázena zvýšenými hladinami sEng v důsledku poškození endotelových buněk, kdežto v pozdějších stádiích dochází k poklesu hladin sEng z důvodu zvýšené tvorby komplexu Eng s TGFβ1 (156).

Z pohledu rozvoje endotelové dysfunkce je nutné zmínit, že oxidační stres a zánět hrají v tomto patologickém procesu důležitou roli. Endotelové buňky po podání prozánětlivého cytokinu tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a po indukci oxidačního stresu pomocí

peroxidu vodíku vykazovaly zvýšené hladiny sEng (157). Protektivní úlohu v tomto procesu může hrát antioxidační enzym hemoxygenáza 1 (HO-1), která inhibuje uvolňování sEng z endotelových buněk a placenty (158).

Další rizikové faktory spojené s endotelovou dysfunkcí jsou arteriální hypertenze a diabetes mellitus. Byla pozorována korelace hladin sEng s glykemií, glykovaným hemoglobinem, systolickým krevním tlakem, hypertrofií levé komory a samozřejmě s endotelovou dysfunkcí. Mimo to byly vyšší hladiny sEng detekovány u pacientů s diabetem, hypertenzí a retinopatií (159).

sEng je považován za možný indikátor stárnutí endotelových buněk, zánětu a oxidačního stresu v srdečních cévách a tato data naznačují, že hladiny sEng reflektují vaskulární poškození (157). Zvýšené hladiny sEng také odráží morfologii aterosklerotických plátů a koreluje s nestabilní anginou pectoris, akutním infarktem myokardu a remodelací srdce po infarktu (160).

Experimentální studie s dvojité deficičním myším modelem aterosklerózy pro apolipoprotein E (ApoE) a LDL receptor (LDLR) prokázala, že tyto myši po podávání cholesterolové diety mají zvýšené hladiny sEng a celkového cholesterolu, což bylo doprovázeno zvětšením aterosklerotickým plátů a zároveň poklesem exprese tkáňového Eng v aortě těchto myší (117). Následně bylo zjištěno, že podávání ATV vede ke snížení hladin sEng, celkového cholesterolu a velikosti aterosklerotických plátů a současně došlo ke zvýšení exprese tkáňového Eng v aortě (116). I další studie potvrzují, že zvýšené hladiny sEng jsou detekovány společně s hypercholesterolémií a jedná se tedy o jasnou korelaci mezi těmito dvěma parametry u myších modelů aterosklerózy (C57BL/6J, ApoE a ApoE/LDLR deficiční myší model) (161, 162).

### **2.5.3. Solubilní endoglin jako možný induktor endotelové dysfunkce v různých částech vaskulárního řečiště**

Na základě výše uvedených dat lze považovat sEng za biomarker poškození endotelu. Otázkou zůstává, zda se aktivně zapojuje do tohoto procesu a aktivně indukuje rozvoj endotelové dysfunkce. sEng je schopen inhibovat tvorbu nových endotelových buněk, což naznačuje jeho antiangiogenní efekt (153). Dále bylo prokázáno, že myši, jimž byl podáván adenovirus uvolňující sEng, vykazovaly zvýšenou permeabilitu kapilár v plicích, játrech a ledvinách. V rámci této studie bylo též testováno podávání rekombinantního sEng potkanům,

keré vedle k interferenci sEng a TGF $\beta$ 1 cytokinu ve vazbě na TGF $\beta$ RII, což mělo za následek sníženou aktivitu transkripčních faktorů Smad 2/3, v důsledku čehož byla inhibována eNOS dependentní vasodilatace v izolovaných renálních mezenterických cévách. Výsledky této studie naznačují možný hypertenzní efekt sEng (153). Preeklampsie, onemocnění spojené s hypertenzí a endotelovou dysfunkcí, patří mezi další patologické stavy, kde byly detekovány zvýšené hladiny sEng a v tomto případě zde reflektují závažnost onemocnění (153, 163).

Další studie byla zaměřena na hodnocení stavu endotelu v mezenterických venulách po podání adenoviru uvolňujícího sEng. Expres sEng adenovirem vedla k neutralizaci efektů TGF $\beta$  a VEGF s následným zvýšením exprese P-selektinu, hladin solubilní formy E-selektinu a VCAM-1 a také ke zvýšenému přichytávání leukocytů k povrchu endotelu. Dále byla pozorována narušená vasodilatace (164).

Souhrnně lze říci, že sEng ovlivňuje různé části cévního řečiště, avšak přesný mechanismus, kterým se podílí na rozvoji endotelové dysfunkce, není znám. Lze očekávat různé účinky sEng na úrovni aorty, muskulárních artérií a žil.

#### **2.5.4. Význam solubilního endoglinu v TGF $\beta$ signalizaci**

Z řady studií vyplývá, že sEng je schopen interagovat s TGF $\beta$  signalizací. V rámci TGF $\beta$  signalizace má sEng roli v regulaci signálů a je považován za přirozeného antagonistu této signalizační kaskády. První studie zabývající se interakcí sEng a TGF $\beta$  signalizace prokázala, že zvýšené hladiny cirkulujícího sEng snižují aktivitu TGF $\beta$ 1 cytokinu, v důsledku čehož dochází k proaterogennímu efektu (156, 165). Působení sEng vede ke snížené koncentraci aktivního a nevázaného TGF $\beta$ 1 cytokinu, což podporuje aterogenezi (166).

Dalším aspektem kompetice sEng s TGF $\beta$ 1 cytokinem o vazbu na TGF $\beta$  receptory je ovlivnění dalších členů signalizace, což následně oslabuje aktivitu eNOS v endotelových buňkách (153). Výsledný pokles ve funkci eNOS je spojován se zvýšenou expresí buněčných adhezních molekul, zvýšenou permeabilitou cév, antiangiogenními účinky, změnou vasodilatační schopnosti cév, rozvojem endotelové dysfunkce, arteriální hypertenze a aterosklerózy (167). Všechny tyto konsekvence snížené funkce eNOS lze spojit s možným proaterogenním působením sEng.

Na základě hypotézy, která předpokládala tvorbu přímé vazby sEng a TGF $\beta$ 1 cytokinu v cirkulaci, bylo navrženo, že v přítomnosti komplexu tkáňového Eng s TGF $\beta$  receptory v endotelových buňkách dochází ke kompetici sEng a TGF $\beta$ 1 cytokinu o vazbu na příslušný

receptor, což v důsledku vede k inhibici vazby TGF $\beta$ 1 cytokinu (161). Na druhou stranu lze u některých buněčných linií při absenci tkáňového Eng pozorovat snazší tvorbu vazby TGF $\beta$ 1 cytokinu na své receptory v přítomnosti sEng (168). Pokud se ovšem zaměříme na afinitu TGF $\beta$ 1 cytokinu, je nutno konstatovat, že tento cytokin vykazuje vyšší afinitu k TGF $\beta$ RII než k sEng (169, 170). Z tohoto tvrzení vyplývá, že s vysokou pravděpodobností sEng není schopen přímé vazby s TGF $\beta$ 1 cytokinem bez předchozí tvorby komplexu sEng a TGF $\beta$ RII (168). Další studie je dokonce v rozporu s přímou vazbou těchto molekul a inklinuje k možnosti přímé vazby sEng s jinými biologicky aktivními molekulami, jako je BMP-9. V této studii byla prokázána schopnost TGF $\beta$ RII navázat TGF $\beta$ 1 cytokin a následně blokovat fosforylaci transkripčních faktorů Smad 1, 5 a 8, čehož sEng není schopen (170). Ovšem sEng je schopen vázat BMP-9 a tím tak blokovat fosforylaci Smad 1, 5 a 8, která je aktivována právě BMP-9. V souladu s tímto tvrzením je i další studie, která potvrzuje preferenční vazbu sEng a BMP-9 (170, 171). Úloha BMP-9 v cévní patologii není dosud objasněna, avšak jedna studie demonstrovala možný vliv BMP-9 na indukci ET-1 na úrovni endotelu, který je významný pro regulaci krevního tlaku a cévní stabilitu (172).

## **2.6. Myší modely endotelové dysfunkce a aterosklerózy**

### **2.6.1. Význam myších modelů**

Myší modely jsou v současné době nejčastěji používaným modelem ve výzkumu aterosklerózy, a to především díky snadným genetickým manipulacím (173). Dalším benefitem tohoto zvířecího modelu je snadnost chovu a možnost monitorovat aterogenezi a její komplikace v relativně krátkém časovém horizontu. Samozřejmě je důležité mít na paměti, že vývoj a průběh aterosklerotického procesu se u myší a lidí liší v několika parametrech (174).

Distribuce aterosklerotických lézí není u lidí a myší totožná. U lidí nacházíme léze nejčastěji v koronárních arteriích a karotidách, kdežto u myší se typicky nachází v aortálním oblouku a aortálním kořenu (70). Další odlišností je vývoj pozdní fáze aterosklerózy, kdy se u myších modelů nemanifestuje stádium nestabilního aterosklerotického plátu doprovázené trombózou, což je klinický stav spojený s významnými akutními kardiovaskulárními epizodami u lidí. Rovněž myší léze nejsou pokryté fibrózní čepičkou, kterou lze pozorovat v případě chronické aterosklerózy u lidí (175). Zásadní rozdíl je ve složení lipidového spektra, jelikož dominantní frakcí u myší je HDL, jež vykazuje rozdílné spektrum HDL částic oproti lidskému lipidovému profilu, jemuž dominuje LDL frakce (174, 176).

V této disertační práci se v následujících kapitolách zaměřím na myší modely vhodné pro studium endotelové dysfunkce a vlivu sEng na tento patologický stav.

### **2.6.2. Normocholesterolemické myší modely**

Vhodné inbrední myší kmeny umožňují identifikovat buněčné a molekulární mechanismy a interakce v průběhu aterogeneze (177). C57BL/6J a CH3/HeJ jsou dva nejčastěji využívané normocholesterolemické myší kmeny, které se od sebe liší schopností rozvíjet stádium lipidních proužků v aortě po podání aterogenní diety s vysokým obsahem cholesterolu. Aterogenní dieta vede k výraznému snížení HDL cholesterolu u C57BL/6J kmenu, kdežto CH3/HeJ kmen zůstává vůči tomuto jevu inertní. Myší kmen C57BL/6J tedy rozvíjí tuková depozita v proximální oblasti aorty, zatímco CH3/HeJ kmen nikoli (178, 179). Tyto odlišnosti po podání aterogenní diety jsou přisuzovány rozdílné citlivosti k rozvoji aterosklerózy (180). Dalším následkem podávání aterogenní diety je výrazná indukce exprese řady zánětlivých genů v játrech u C57BL/6J kmenu (181) a obecně rozdílná exprese proteinů oxidačního stresu a lipidového metabolismu (182). Predispozice obou myších kmenů k rozvoji aterosklerózy je pravděpodobně výrazně ovlivněna endotelovými buňkami (180), makrofágy (183) a hladkými svalovými buňkami (184).

### **2.6.3. Apolipoprotein E deficientní myší model**

Delece genu spojená s možností kontroly genové exprese se ukázala jako vhodná alternativa pro výzkum aterosklerózy v porovnání s podáváním často toxické diety s vysokým podílem tuků a rozdílnou morfologií aterosklerotických lézí u geneticky nemodifikovaných myších kmenů (též označované jako wild type) (185).

Prvním geneticky modifikovaným myším modelem byl ApoE deficientní model (ApoE<sup>-/-</sup>), u nějž došlo k cílenému vypnutí genu pro apolipoprotein E (186). ApoE je strukturální složkou všech lipoproteinů s výjimkou LDL a jako součást plazmatických lipoproteinů se účastní vazby na LDLR, kde slouží k vychytávání aterogenních částic z cirkulace (187, 188). ApoE<sup>-/-</sup> myši vykazují signifikantní hypercholesterolémii (10 mmol/L, což představuje pětinasobně vyšší plazmatické hladiny cholesterolu ve srovnání s wild type), přestože jim je podávána dieta s nízkým obsahem tuku (189, 190). Výhodou tohoto modelu je spontánní vývoj aterosklerotických lézí převážně v oblasti aortálního kořenu a oblouku, a to v mnohem kratším časovém intervalu než u wild type myší (191). Pokud jsou ApoE<sup>-/-</sup> myši krmeny cholesterolovou dietou po dobu 10-14 týdnů, vykazují následně vysoké plazmatické hladiny cholesterolu převyšující hladinu 25 mmol/L a dochází k rozvoji

komplexního fibrózního aterosklerotického plátu v oblasti aortálního sinu (185). Nicméně je nutno zmínit, že extrapolace dat z tohoto modelu na lidský průběh aterosklerózy má své limity. Zaprvé, lipidový metabolismus je odlišný, přičemž většina plazmatického cholesterolu je u ApoE<sup>-/-</sup> modelu uložena ve formě tzv. very low density lipoprotein (VLDL), kdežto u lidí je dominantní formou LDL (192, 193). A zadruhé, ApoE má v organismu, kromě funkce lipoproteinové clearance, také ateroprotektivní antioxidační, antiproliferační a protizánětlivou funkci (194).

#### **2.6.4. LDL receptor deficientní myší model**

LDLR je membránový receptor, který zprostředkovává endocytózu LDL cholesterolu, čímž přispívá k regulaci LDL hladin v plazmě. Také usnadňuje vychytávání lipoproteinů s apolipoprotein B a E složkou (195). Myší model s cílenou inaktivací LDLR (LDLR<sup>-/-</sup>) byl vytvořen v roce 1993 (196). LDLR<sup>-/-</sup> myši vykazují mírně zvýšené plazmatické hladiny cholesterolu a nevyvíjí žádnou nebo pouze mírnou aterosklerózu, pokud jsou krmeny standardní dietou (197). Podání cholesterolové diety vyvolá výraznou změnu lipoproteinového profilu s vysokou pravděpodobností rozvoje aterosklerotických lézí (198). Vývoj aterosklerotického plátu začíná v proximální části aorty a šíří se směrem k distální aortě. Podobně jako u lidí jsou zde oblasti, kde je narušeno kontinuální krevní proudění a následně jsou tyto oblasti náchylnější k rozvoji aterosklerotických lézí (187).

LDLR<sup>-/-</sup> myší model má jisté výhody oproti ApoE<sup>-/-</sup> modelu. Dominantní složkou plazmatického cholesterolu LDLR<sup>-/-</sup> myší je LDL frakce, což reflektuje lidský lipidový profil. Dále absence LDLR nemá vliv na rozvoj zánětu ve srovnání s deficiencí genu pro ApoE, tudíž tvorba aterosklerotického plátu je podmíněna zvýšenými hladinami lipidů v plazmě a nikoli jinými funkcemi spojenými s LDLR (174).

#### **2.6.5. Apolipoprotein E/LDL receptor deficientní myší model**

ApoE/LDLR deficientní myši (ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup>) představují model, který vyvíjí závažnější hyperlipidémii a rozvoj aterosklerózy než uvedené předchozí modely (199). Jedná se o experimentální model se spontánním vývojem aterosklerotického plátu a bylo zaznamenáno, že již po podávání standardní diety dochází k progresi aterosklerózy (200). Lipidový profil nevykazuje významný rozdíl s ApoE<sup>-/-</sup> modelem, u obou jsou detekovány vysoké hladiny VLDL a LDL (201). ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myší model je tedy vhodný pro studium endotelové dysfunkce a aterosklerózy bez potřeby podávání aterogenní diety (202).

## **2.7. Myší modely pro studium vlivu endoglinu ve vztahu k endotelové dysfunkci**

### **2.7.1. Endoglin conditional knockout myší model**

Tento model byl vyvinut pro studium role Eng v pozdním vývojovém a dospělém období myší, jelikož Eng deficientní myší homozygoti umírají již během intrauterinního vývoje (142, 203). V roce 2007 byl vyvinut model s inaktivovaným genem pro Eng, tzv. conditional knockout. Cílem zásahu do genotypu je dosáhnout prostřednictvím enzymu Cre-rekombinázy delece exonů 5 a 6 v genu pro Eng, což vede k posunové mutaci v exonu 7 a vzniku nulové alely. Ve výsledku se tak gen pro Eng stává nefunkčním. Jak již bylo zmíněno, Eng je významným multifunkčním proteinem, který je důležitý pro správný vývoj a funkci kardiovaskulárního systému. Zde popsáný myší model poskytuje skvělou příležitost pro zkoumání role Eng *in vivo* a jeho potenciálu jako terapeutického cíle (203).

Conditional knockout pro gen ALK-1, běžně označován jako *Acvrl1*, je obdobným modelem, kdy dochází k deleci exonů 4, 5, a 6 s následnou posunovou mutací (204). Oba dva zde zmíněné myší modely jsou vhodné pro studium léčby arteriovenózních malformací (205).

### **2.7.2. Transgenní myší model s vloženým genem pro lidský solubilní endoglin**

Tento transgenní myší model vykazuje vysoké hladiny sEng v plazmě (Sol-Eng<sup>+</sup>) a je tak vhodný pro studium vlivu sEng na endotel a rozvoj endotelové dysfunkce. Vznik tohoto unikátního myšího modelu je zprostředkován Eng konstruktem, který obsahuje aminokyseliny 26-437 a jež je řízen aktinovým promotorem. Eng konstrukt je injikován do oplodněných vajíček kmene CBAxC57BL/6J. Původně byl tento model vyvinut pro studium preeklampsie, jež se vyznačuje hypertenzí a proteinurií. Sol-Eng<sup>+</sup> však fenotypově vykazuje i renální poškození typické obsahem hyalinu v dřevné části a malou velikostí narozených mláďat (206). Strukturní homologie myšího a lidského Eng vykazuje vysokou úroveň (z 99 % se sekvence překrývají a z 69 % jsou identické), a proto lze tento model využít pro studium vlivu lidského sEng u myší (120, 121). Také bylo prokázáno, že lidský sEng může ovlivnit myší signalizaci Eng (206).

## 2.8. Léčiva ovlivňující tkáňový a solubilní endoglin

### 2.8.1. Tkáňový endoglin a statiny

Statiny jsou hypolipidemická léčiva, která inhibují 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A (HMG-CoA) reduktázu, jenž je klíčovým enzymem v syntéze cholesterolu a patří tak mezi široce používanou skupinu léčiv v terapii hypercholesterolemie. Ze studií vyplývá, že statiny snižují progresi aterosklerózy a podílí se tak na významném snížení kardiovaskulární morbidity a mortality (207). Příznivé účinky statinů jsou obvykle přisuzovány jejich schopnosti snížit endogenní syntézu cholesterolu prostřednictvím kompetitivní inhibice s HMG-CoA reduktázou (208). Mevalonát, produkt reakce HMG-CoA reduktázy, je prekurzorem cholesterolu a také mnoha jiných nesteroidních isoprenoidních sloučenin, tudíž inhibice tohoto enzymu může mít za následek pleiotropní účinky. Mezi přímé lipidové účinky patří inhibice endogenní syntézy cholesterolu, zvýšené vychytávání a následně degradace LDL cholesterolu, zvýšená exprese LDL receptorů a snížená oxidativní modifikace LDL cholesterolu (209, 210). Kromě příznivého působení na lipidový profil mají statiny celou řadu dalších účinků. Modulují procesy vedoucí ke snížené akumulaci esterů cholesterolu v makrofázích, stimuluje produkci eNOS, působí protizánětlivě, zvyšují stabilitu aterosklerotických plátů a příznivě ovlivňují aktivitu trombocytů a koagulační procesy (209).

Statiny jsou schopné modulovat funkci endotelu, a to nezávisle na své schopnosti redukovat hladinu LDL cholesterolu. Bylo prokázáno, že statiny indukují transkripční aktivaci genu pro eNOS v lidských endotelových buňkách za podmínek *in vitro*. Aktivace eNOS je poté statiny stimulována posttranslačně (211). Jiná studie dokázala schopnost statinů snížit transcytózu částic LDL cholesterolu a zlepšit tak endotel dependentní vasodilataci prostřednictvím zvýšené syntézy NO. Tato studie také potvrdila, že statiny zvyšují expresi eNOS a zabraňují regulaci exprese tohoto enzymu hladinami LDL cholesterolu (212). Další data také naznačují, že statiny zabraňují tvorbě superoxidového radikálu endotelovými buňkami, čímž pozitivně modifikují produkci ve prospěch NO (213). Statiny také snižují expresi adhezních molekul (214) a tím podporují zlepšení endotelové dysfunkce.

Bylo zjištěno, že statiny mohou ovlivňovat také expresi tkáňového Eng. Statiny jsou totiž schopné snižovat hladiny cholesterolu nejen u lidí, ale i u myších modelů (215, 216). Byla provedena řada studií zaměřená na vliv ATV na expresi tkáňového Eng v aortě i hladiny sEng v plazmě, a to společně i s dalšími členy TGF $\beta$  signalizace včetně ALK-1, ALK-5, Smad 1, Smad 2, eNOS a VEGF u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myšího modelu, jež vykazoval rozvoj aterosklerotických lézí (116, 151, 217). Podání ATV vedlo ke snížení hladin cholesterolu



a sEng, naopak došlo ke zvýšené expresi tkáňového Eng, ALK-1, ALK-5, Smad proteinů, eNOS i VEGF v myší aortě (116, 217). Navíc ATV zvýšil expresi všech uvedených ateroprotektivních členů TGF $\beta$  signalizace spolu se zmenšením plochy aterosklerotických lézí, a to prostřednictvím svých nelipidových účinků. Současně byla také prokázána koexprese těchto členů s tkáňovým Eng (151). Následující studie prokázala, že ATV brání poklesu exprese tkáňového Eng a eNOS v endotelových buňkách pod vlivem zánětu (218). Tato data souhrnně potvrzují, že Eng hraje významnou regulační roli v mechanismu působení ATV na endotel.

Jiná studie byla zaměřena na vliv podávání simvastatinu, rosuvastatinu a pravastatinu na uvolňování sEng endotelovými buňkami, která prokázala, že všechna tato hypolipidemika uvolňování sEng v pupečnickových cévách či přímo z placenty zvyšují (219, 220). Kromě toho bylo zjištěno, že působení oxysterolů zvyšuje uvolňování sEng a pravastatin na tento proces nemá žádný signifikantní vliv (221). Výsledky těchto studií je ovšem nutné posuzovat v kontextu *in vitro* studií, které reflektují akutní změny v řádu hodin a jsou prováděny na izolovaných buněčných liniích, kdežto *in vivo* experimenty spíše simulují skutečný fyziologický/patofyziologický stav organismu v dlouhodobém horizontu.

### **2.8.2. Tkáňový endoglin a protinádorová léčba**

Eng je silně exprimován na povrchu proliferujících endotelových buněk (222) a také během hypoxie indukované inhibicí VEGF signalizace (223). Navíc Eng je nezbytný pro angiogenezi (224). Všechny tyto vlastnosti činí Eng atraktivním cílem pro antiangiogenní léčbu rakoviny (225).

Eng je ve vysoké míře exprimován proliferujícími endotelovými buňkami v cévách nádoru, a to včetně nádorů plic, tlustého střeva, žaludku, jater, endometria či vaječníků (223). Exprese Eng je prognostickým faktorem u pacientů se solidními nádory a jeho míra exprese koreluje se špatnou prognózou v klinických studiích u řady nádorů (226-228). V současné době je testován antineoplastický potenciál dvou nových konjugátů monoklonálních protilátek OMTX503 a OMTX703, který je testován na buněčných liniích a zvířecích modelech Ewingova sarkomu. Zatím z preklinické fáze vyplývá, že oba konjugáty potlačují buněčnou proliferaci, významně oddalují růst nádoru a vykazují silnou anti Eng aktivitu (229). Dalším příkladem je monoklonální protilátka TRC105, která se váže na Eng a na základě klinických studií by mohla být součástí terapie rakoviny prostaty, močového měchýře či hepatocelulárního karcinomu (230, 231).

### **2.8.3. Solubilní endoglin a metformin**

Metformin je známý především jako perorální antidiabetikum s antihyperglykemickým účinkem (232). Metformin má ovšem celou řadu účinků, mezi něž patří i vasoprotektivní vlastnosti. Epidemiologické studie prokázaly, že snižuje kardiovaskulární morbiditu u pacientů se syndromem polycystických ovárií či diabetem mellitem II. typu (233, 234). Metformin je také schopen navodit vasodilataci v cévách postižených diabetem včetně aorty (235).

Na základě těchto poznatků byla provedena studie zaměřující se mimo jiné na hodnocení efektu metforminu na uvolňování sEng z primárních endotelových a také placentárních buněk/tkání a také na roli metforminu v redukci endotelové dysfunkce prostřednictvím svého vasodilatačního působení. Nutno podotknout, že tato studie byla zaměřena na studium preeklampsie. Výsledky studie prokázaly vliv metforminu na snížené uvolňování sEng z endotelových buněk. Metformin také pozitivně působil proti TNF $\alpha$  navozenému stavu endotelové dysfunkce, a to prostřednictvím snížené exprese mRNA pro VCAM-1, podporou angiogeneze a zlepšením vasodilatace (236). Přestože se jedná o studii zaměřenou primárně na stav preeklampsie, nabízí se zde možnost tato data extrapolovat a při provedení dalších studií o vlivu metforminu na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění (včetně aterosklerózy) je zahrnout do výstupů, jelikož endotelová dysfunkce tvoří patofyziologický podklad v obou případech.

### **2.8.4. Solubilní endoglin a resveratrol**

Další studie, opět zaměřená na preeklampsii, se zabývala vlivem resveratrolu na uvolňování sEng. Resveratrol má významné antioxidační a protizánětlivé účinky (237, 238). Výstupy studie ukazují, že resveratrol úspěšně snižuje uvolňování sEng z linie endotelových buněk, a to zřejmě prostřednictvím snížené exprese MMP-14. Navíc signifikantně snižuje expresi vasokonstrikčně působícího ET-1 a také zlepšuje poměr mezi fosforylovanou a nefosforylovanou formou eNOS. Zvýšená fosforylace eNOS následně může zvýšit produkci NO, protektivního faktoru cévního endotelu (239). Z uvedených dat vyplývá, že resveratrol je potenciálním pozitivně působícím agens v rozvoji endotelové dysfunkce.

### 3. Cíle práce

- Analýza současné odborné literatury zabývající se rolí tkáňového a solubilního endoglinu v rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy.
- Studium endotelové dysfunkce u transgenního myšího modelu s vysokou expresí lidského solubilního endoglinu v plazmě po podání vysokotukové diety, která indukuje stav hypercholesterolémie.
- Studium morfologických a funkčních změn na úrovni srdce u transgenního myšího modelu s vysokou expresí lidského solubilního endoglinu v plazmě po podání standardní (chow) diety, nebo vysokotukové diety.
- Studium raného vývoje endotelové dysfunkce u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myšího modelu, spontánně rozvíjejícího hypercholesterolémii, po podání standardní diety.

## 4. Komentáře k pracím

Tato disertační práce je koncipována jako komentovaný soubor prací. Všechny tři uvedené původní (experimentální) práce jsou publikovány v odborných časopisech s impaktním faktorem.

- 4.1. Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta
  
- 4.2. High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart
  
- 4.3. Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction *in vivo* and *in vitro*

#### **4.1. Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta**

Vitverova B., Blazickova K., Najmanova I., Vicen M., Hyspler R., Dolezelova E., Nemeckova I., Tebbens J.D., Bernabeu C., Pericacho M., Nachtigal P.; *Atherosclerosis* 271 (2018) s. 15-25; (IF = 4.467)

Tato práce byla zaměřena na studium vlivu vysokých hladin sEng v kombinaci s hypercholesterolémií na rozvoj endotelové a vaskulární dysfunkce v myši aortě. Záměrem této studie bylo objasnit úlohu sEng v těchto procesech a potvrdit či vyvrátit, zda je sEng jen pouhým biomarkerem vaskulárního poškození nebo zda je i aktivním induktorem endotelové dysfunkce. Tato hypotéza vychází z dat z klinické praxe, která uvádějí, že zvýšené hladiny sEng byly detekovány u pacientů s hypercholesterolémií (240), aterosklerózou (155) či hypertenzí (241). Součástí naší hypotézy byl také předpoklad, že kombinace sEng a hypercholesterolémie ovlivní na úrovni myši aorty Eng/eNOS signalizaci.

Ve studii jsme použili tříměsíční transgenní myši samice kmene CBAXC57BL/6J s vysokou hladinou lidského sEng v plazmě (Sol-Eng<sup>+</sup> high) a jejich sourozence s nízkými hladinami lidského sEng jako kontrolní skupinu (Sol-Eng<sup>+</sup> low), jež byly následujících 6 měsíců krmeny vysokotukovou dietou (1,25 % cholesterolu, 40 % tuku). Vzorky plazmy byly použity pro biochemickou analýzu hladin celkového cholesterolu, ELISA analýzu hladin sEng a Luminex analýzu zánětlivých markerů. Funkční parametry aorty byly testovány pomocí myografu 620M. Také byla provedena Western blot analýza Eng/eNOS signalizace a markerů reflektujících rozvoj endotelové dysfunkce a zánětu v aortě.

Biochemická analýza prokázala, že obě skupiny po podávání vysokotukové diety vykazují stav mírné hypercholesterolémie. Také byly ELISA analýzou, dle očekávání, potvrzené signifikantně vyšší hladiny sEng u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny. Funkční analýza aortálních segmentů odhalila signifikantně zhoršenou schopnost vasokonstrikce po podání KCl u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny, což bylo v rámci Western blot analýzy potvrzeno i na proteinové úrovni, a to signifikantně sníženou expresí fosforylovaných lehkých řetězců myosinu u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny, jež jsou hlavní regulační komponentou reaktivity hladkých svalových buněk (242). Funkční analýza dále prokázala zhoršenou schopnost endotel dependentní vasodilatace po podání acetylcholinu (Ach) i zhoršenou schopnost vasodilatace hladkých svalových buněk po podání nitroprusidu sodného. V rámci funkčního vyšetření byla také hodnocena endotel dependentní vasodilatace po podání Ach, avšak tentokrát v přítomnosti

specifického inhibitoru eNOS N ( $\omega$ )-nitro-L-arginin methylesteru (L-NAME). Vasodilatační odpověď byla signifikantně zvýšena u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny, což vypovídá o aktivovaném kompenzačním mechanismu u této skupiny, který generuje NO z alternativních zdrojů a pokrývá tak fyziologické potřeby endotelu během funkčního poškození aorty. V rámci Western blot analýzy byla stanovena exprese členů Eng/Smad 2/3/eNOS signalizace, a to včetně aktivovaných fosforylovaných forem. Výsledky prokázaly signifikantně sníženou expresi všech členů této signalizace u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny, což je pravděpodobně mechanismus zodpovědný za sníženou produkci NO.

Souhrnně lze říci, že dlouhodobý stav hypercholesterolemie doprovázený vysokými hladinami sEng v plazmě vede k rozvoji endotelové a vaskulární dysfunkce v myší aortě a tyto děje jsou doprovázeny změnou na úrovni Eng/eNOS signalizace. Jelikož nebyl mezi skupinami signifikantní rozdíl v hladinách celkového cholesterolu, lze usuzovat, že vysoké hladiny sEng by mohly být rizikovým faktorem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění.

## **4.2. High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart**

Rathouska J., Fikrova P., Jezkova K., Varejckova M., Mrkvicova A., Dolezelova E., Nemeckova I., Vitverova B., Peslova L., Gallardo-Vara E., Pericacho M., Nachtigal P.; *Heart and Vessels vol. 32 (2017) s. 1013-1024; (IF = 3.434)*

Jelikož nebyla dostupná žádná relevantní data o působení vysokých hladin sEng samotných a/nebo v kombinaci s hypercholesterolemií na rozvoj endotelové dysfunkce a zánětu v srdci, rozhodli jsme se provést studii za účelem objasnění této role. Je známo, že zvýšené hladiny sEng se objevují v plazmě při poškození endotelu a zánětlivé reakci (153, 243) a také jsou detekovány u pacientů s hypertenzí (241) či po infarktu myokardu (244). V této studii jsme vycházeli z hypotézy, že vysoké hladiny sEng se podílí na rozvoji hypertenze prostřednictvím interference s TGF $\beta$  signalizací, což může vyvolat zánětlivé, strukturální a fibrózní změny v srdci.

Zde jsme použili tentýž transgenní myší model jako v předchozí studii, tedy Sol-Eng<sup>+</sup> high (sledovaná skupina) a Sol-Eng<sup>+</sup> low samice (kontrolní skupina). První část studie byla hodnocena u čtyř až šestiměsíčních myší krměných standardní (chow) dietou, kdežto druhá část studie hodnotila změny po tříměsíčním podávání vysokotukové diety (1,25 % cholesterolu, 40 % tuku). Vzorky srdce byly následně hodnoceny pomocí qRT-PCR, Western blot analýzy a histologickou analýzou řezů srdeční tkáně se zaměřením na barvení hematoxylin eosin, které může odhalit potenciální zánětlivé změny v srdci a barvení pomocí zeleného trichromu pro detekci kolagenu.

Výsledky studie ovšem neprokázaly žádné signifikantní změny v morfologické struktuře, s ohledem na rozvoj hypertrofie a fibrózních změn, mezi jednotlivými skupinami. Přítomnost zvýšených hladin sEng významně neovlivnila ani expresi vybraných členů TGF $\beta$  signalizační kaskády (tkáňový Eng, TGF $\beta$ RII, ALK-1, ALK-5, fosforylované formy Smad proteinů či inhibitor plazminogenového aktivátoru). Taktéž nebyl prokázán vliv vysokých hladin sEng na rozvoj zánětu (VCAM-1, ICAM-1) a remodelaci srdce u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny v porovnání s kontrolní skupinou na standardní i vysokotukové dietě.

Vysoké hladiny sEng v plazmě tedy neindukují fibrózní a degenerativní změny kardiomyocytů a nepodílí se na rozvoji endotelové dysfunkce a zánětu v srdcích Sol-Eng<sup>+</sup> high myšího modelu, a to ani v normocholesterolemickém, ani v hypercholesterolemickém stavu.

### 4.3. Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction *in vivo* and *in vitro*

Vicen M.\*, Vitverova B.\*, Havelek R., Blazickova K., Machacek M., Rathouska J., Najmanova I., Dolezelova E., Prasnicka A., Sternak M., Bernabeu C., Nachtigal P.; *The FASEB Journal* vol. 33 (2019) s.6099-6114; (IF = 5.595)

\* These authors contributed equally to this work.

Expres tkáňového Eng byla detekována v endotelových buňkách aorty myšího modelu aterosklerózy (245) a tato exprese byla snížena u pokročilých aterosklerotických lézí, kdežto hladiny sEng byly zvýšeny (117, 161). Na druhou stranu bylo také prokázáno, že tkáňový Eng i sEng se účastní zánětlivé infiltrace *in vivo* i *in vitro* (246, 247). Tato data ukazují určité protichůdné působení tkáňového Eng ve studiích simulujících aterogenezi. Proto jsme se v této studii snažili propojit *in vivo* a *in vitro* přístup s cílem objasnit vliv zvýšené hladiny cholesterolu, jež doprovází aterosklerotický proces, na expresi a regulaci tkáňového Eng se zaměřením na rozvoj endotelové a vaskulární dysfunkce. Působení zvýšených hladin cholesterolu bylo v *in vivo* části studie zkoumáno u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myšího modelu, který spontánně rozvíjí hypercholesterolémii (200, 202) a v podmínkách *in vitro* byla použita buněčná linie lidských aortálních endotelových buněk a 7-ketocholesterol pro simulaci hypercholesterolémie. Vzhledem k tomu, že předkladatelka má hlavní podíl na *in vivo* části studie, bude v následujícím textu diskutována tato část.

Pro experimentální *in vivo* část studie byly použity dvouměsíční samice ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myšího modelu (sledovaná skupina) a normocholesterolemické samice C57BL/6J kmene téhož věku (kontrolní skupina). Následně byla provedena biochemická a Luminex analýza ze vzorků plazmy. Vaskulární reaktivita byla měřena pomocí myografu a exprese markerů reflektujících endotelovou dysfunkci byla hodnocena Western blot analýzou. Výsledky *in vivo* části studie ukazují, že stav hypercholesterolémie je doprovázen signifikantně zvýšenými hladinami sEng, prozánětlivého P-selektinu a narušením metabolismu NO u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny. Biochemická analýza prokázala sníženou koncentraci nitrátu (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) v plazmě i moči, což odráží sníženou produkci NO u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny, jež je považována za charakteristický projev rozvoje endotelové dysfunkce (248). Funkční analýza odhalila signifikantně sníženou vasodilatační schopnost buněk hladké svaloviny a aktivaci kompenzačního mechanismu, generujícího NO nezávisle na eNOS signalizací, v aortě ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny. Western blot analýza prokázala signifikantně sníženou



expresi tkáňového Eng, eNOS včetně aktivní formy p-eNOS a také fosforylovanou formu Smad 2/3 v aortě ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny, což může vést k narušení endotel dependentní vasodilatace (249). Dále byla detekována signifikantně snížená exprese HO-1 a fosforylovaných lehkých řetězců myosinu, což jsou další důležité parametry reflektující stav vaskulární reaktivity.

V rámci *in vivo* části studie se poprvé podařilo prokázat, že hypercholesterolémie ovlivňuje expresi a signalizaci tkáňového Eng, což vyúsťuje v rozvoj endotelové a vaskulární dysfunkce, a to ještě před strukturálními aterosklerotickými změnami na úrovni aorty.

## 5. Souhrnná diskuze

Hlavním tématem této disertační práce bylo zhodnocení a objasnění role tkáňového Eng a jeho solubilní formy (sEng) v rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy u vybraných myších modelů. Hypercholesterolemie a ateroskleróza jsou patologickým podkladem mnoha kardiovaskulárních onemocnění, u nichž byla prokázána spojitost se zvýšenými hladinami sEng, který je považován za biomarker poškození endotelu (250). Otázkou ovšem zůstává, zda je sEng schopen modulovat funkci tkáňového Eng a endotelu v průběhu endotelové dysfunkce, která bývá doprovázena hypercholesterolémií.

sEng vzniká proteolytickým štěpením extracelulární domény tkáňového Eng, který je exprimován zejména endotelovými buňkami a buňkami hladké svaloviny v krevních cévách (251). Několik studií prokázalo přímý efekt sEng na krevní cévy. Podání rekombinantního sEng vedlo k narušení vazby TGF $\beta$ 1 cytokinu na příslušný TGF $\beta$  receptor, což následně vyústilo v inhibici eNOS dependentní vasodilatace v mezenterických cévách u potkanů (153). Jiná studie došla k závěru, že podávání adenoviru, uvolňujícího sEng, vedlo u myši k rozvoji endotelové dysfunkce v mezenterických venulách, jež byla charakterizována zvýšenou expresí buněčných adhezních molekul a poruchou vasodilatace (164). Jelikož tyto studie nebyly provedeny v oblastech vaskulárního řečiště, které jsou náchylné k rozvoji aterosklerózy, rozhodli jsme se provést studii objasňující působení zvýšených hladin sEng na aortu.

Němečková et al. použila ve studii unikátní transgenní myší model, který exprimuje hladiny lidského sEng (Sol-Eng<sup>+</sup>). Tento model vykazuje celou řadu symptomů preeklampsie, jako je hypertenze, proteinurie či renální poškození (206). Studie ovšem neprokázala žádné negativní účinky sEng na funkci aorty či rozvoj endotelové dysfunkce (252). Proto v navazující studii byla myšim podávána vysokotuková dieta po dobu 3 měsíců, která měla simulovat skutečný stav pacientů s aterosklerózou v klinické praxi. Ježková et al. prokázala, že tato kombinace vede k indukci prozánětlivého fenotypu v aortě, jež je doprovázen zvýšenou expresí buněčných adhezních molekul. Ovšem překvapivě vyšetření vaskulární reaktivity neprokázalo funkční poškození aorty (253). Tyto kontroverzní výsledky vedly k úvaze, že zvýšené hladiny sEng a hypercholesterolemie si zaslouží další studium.

Předpokládali jsme, že dlouhodobé podávání vysokotukové diety (1,25 % cholesterolu, 40 % tuku) v kombinaci s vysokými hladinami sEng povede ke změnám v aortě na funkční úrovni u Sol-Eng<sup>+</sup> myšního modelu. Myši samice byly rozděleny do dvou skupin podle hladin lidského sEng v plazmě na skupinu s vysokými hladinami (Sol-Eng<sup>+</sup> high) a skupinu s nízkými hladinami (Sol-Eng<sup>+</sup> low). Obě skupiny byly krmeny vysokotukovou dietou po dobu 6 měsíců.

Výsledky studie potvrdily, že tato kombinace vede ke zhoršené endotel dependentní vasodilataci zprostředkované Ach, zhoršené schopnosti vasodilatace hladkých svalových buněk zprostředkované nitroprusidem sodným, aktivaci kompenzačního mechanismu reflektujícího poškození endotel dependentní vasodilatace, zhoršené schopnosti vasokonstrikce po podání KCl a snížené míře fosforylace lehkých řetězců myosinu, která vede ke zhoršené schopnosti vasokonstrikce a vysvětluje tak výsledek zhoršené vasokonstrikce z funkčního měření. Všechny tyto změny naznačují funkční poškození endotelu u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny. Také je důležité zdůraznit, že hladiny celkového cholesterolu nebyly mezi skupinami signifikantně rozdílné, tudíž pozorované efekty jsou pravděpodobně způsobené pouze vlivem sEng.

Myši a lidský sEng vykazují vysokou míru homologie (z 99 % se sekvence překrývají, z 69 % jsou identické) (120, 121) a experimenty s myšimi modely dlouhodobě potvrzují, že lidský sEng interaguje s myší Eng signalizací (206, 253). Dalším důležitým faktem je, že sEng je schopen antagonizovat účinky tkáňového Eng (246). Bylo prokázáno, že tkáňový Eng je nezbytný pro správnou funkci eNOS, a tím pádem i pro eNOS dependentní vasodilataci (249). Eng také přímo zvyšuje expresi eNOS prostřednictvím transkripčních faktorů Smad 2/3 bez kooperace s TGFβ1 cytokinem (150). V souladu s těmito tvrzeními jsme v naší studii pozorovali u Sol-Eng<sup>+</sup> high skupiny signifikantně sníženou expresi všech členů signalizace Eng/Smad 2/3/eNOS v důsledku možné interference se sEng.

Z této studie tedy vyplývá, že dlouhodobý stav hypercholesterolemie (indukovaný vysokotukovou dietou) v kombinaci s vysokými hladinami sEng vede ke zhoršené funkci endotelu i cévní stěny v aortě s alterací na úrovni Eng/Smad 2/3/eNOS signalizace.

Z předchozích dat lze usuzovat, že tkáňový Eng má protektivní účinek na cévní endotel. Ovšem v současné době je stále málo informací o vztahu exprese tkáňového Eng a jeho signalizace v rozvoji endotelové/vaskulární dysfunkce v *in vivo* navozeném stavu hypercholesterolemie. Proto jsme se v další studii rozhodli použít dvouměsíční ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myši samice bez detekovatelných aterogenních změn v aortě (254), a to za účelem popsání a zhodnocení vlivu Eng/Smad 2/3/eNOS signalizace na funkční stav aorty v porovnání s kontrolní skupinou C57BL/6J. ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myši model spontánně rozvíjí stav hypercholesterolemie (200, 202). Výsledky studie ukazují, že spontánní hypercholesterolemie u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny je doprovázena zvýšenou hladinou prozánětlivého P-selektinu, sníženou koncentrací NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v plazmě a moči a zvýšenými hladinami sEng, což naznačuje časný vývoj endotelové dysfunkce u těchto myší. Je nutno zmínit, že snížené hladiny NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, stabilního koncového produktu NO metabolismu, reflektují sníženou produkci a/nebo aktivitu NO, a tudíž je lze považovat za zřejmý projev rozvoje endotelové

dysfunkce (248, 255). V souladu s tím jsme u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny detekovali signifikantně sníženou expresi HO-1, jež se účastní vasodilatačního mechanismu na úrovni interakce se solubilní guanylátcyklázou s následným uvolňováním NO (256). Souhrnně lze tato data interpretovat jako významně nižší produkci NO u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myši v porovnání s normocholesterolemickými myši.

sEng vzniká odštěpením ektodomény z tkáňového Eng působením MMP-14, která je považována za hlavní proteázu štěpící Eng (251). Překvapivě jsme v této studii zaznamenali signifikantně sníženou expresi MMP-14 u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny, což naznačuje, že MMP-14 není jedinou a hlavní proteázou, jež způsobuje v aortě odštěpení ektodomény Eng do cirkulace. Podobné výsledky byly prezentovány již dříve, kdy endotelové buňky pod vlivem oxysterolů vykazovaly zvýšenou produkci sEng, avšak exprese MMP-14 s tímto výsledkem nekorelovala (221). V souladu s tímto závěrem je nutné upozornit na skutečnost, že je nepravděpodobné, aby změny hladin sEng byly reflektovány pouze na úrovni exprese tkáňového Eng v jednom typu cévy (zde aorty). Pravděpodobně je sEng v průběhu kardiovaskulárních onemocnění, včetně aterosklerózy, uvolňován z celého vaskulárního řečiště.

Stanovení exprese členů Eng/Smad 2/3/eNOS signalizace, včetně aktivních forem pSmad 2/3 a p-eNOS, prokázalo signifikantně sníženou úroveň exprese všech těchto členů u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny, což naznačuje možnou poruchu vasodilatace. Následovala funkční analýza vaskulární reaktivity, která prokázala signifikantně poškozenou schopnost vasodilatace buněk hladké svaloviny po podání nitroprusidu sodného a také aktivaci kompenzačního mechanismu po podání L-NAME u ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> skupiny, což svědčí o změněné vaskulární funkci aorty těchto myši. Schopnost endotel dependentní vasodilatace po podání Ach nevykazovala mezi skupinami signifikantní rozdíl, avšak testování téže schopnosti v přítomnosti L-NAME, specifického inhibitoru eNOS, svědčí o aktivaci kompenzačního mechanismu v aortě ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myši. Kompenzační mechanismy, mezi něž patří zvýšená produkce PGI<sub>2</sub> či EDHF způsobující zvýšené uvolňování NO, které mohou krátkodobě pokrývat fyziologické potřeby endotelu a zakrývat tak funkční poškození (254). Z funkčního hlediska jsme také detekovali signifikantně sníženou expresi fosforylovaných hladkých řetězců myosinu, hlavní regulační složky reaktivity buněk hladké svaloviny, což odráží narušení vaskulární reaktivity (257).

V této studii jsme poprvé prokázali, že hypercholesterolemie ovlivňuje expresi a signalizaci tkáňového Eng, což je následováno rozvojem endotelové/vaskulární dysfunkce, a to ještě před formací aterosklerotických lézí v aortě ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myši.

Jak již bylo zmíněno, sEng je schopen interferovat s tkáňovým Eng a antagonizovat tak jeho funkci. Tato interference má za následek modulaci adheze leukocytů a hladkých svalových buněk k endotelu (246, 258). Z výše uvedených dat také vyplývá, že sEng indukuje známky rozvoje endotelové dysfunkce a zánětu v různých částech vaskulárního řečiště (153, 164), což naznačuje, že by mohl hrát roli i v rozvoji arteriální hypertenze (241). Endotelová dysfunkce a arteriální hypertenze jsou významné rizikové faktory pro rozvoj strukturálních a funkčních změn v srdci (hypertrofie, fibróza, srdeční selhání) (259). Z tohoto důvodu jsme použili Sol-Eng<sup>+</sup> myší model, kde Sol-Eng<sup>+</sup> high skupina vykazuje vyšší systolický krevní tlak v porovnání se Sol-Eng<sup>+</sup> low skupinou (206). Předpokládali jsme, že vysoké hladiny lidského sEng v plazmě mohou vyvolat patologické změny v srdci, a to v důsledku hypertenze a endotelové dysfunkce v srdečních cévách a/nebo interferencí s TGFβ signalizací.

První část studie byla hodnocena u čtyř až šestiměsíčních samic krmených standardní dietou. V této části studie se nám nepodařilo prokázat signifikantní rozdíl mezi skupinami v morfologické struktuře, s potenciálním rozvojem hypertrofie, či detekovat v srdci fibrózní změny. Dále jsme hodnotili změny na molekulární úrovni. sEng prostřednictvím interakce s BMP-9 ovlivňuje ALK-1/Smad 1/5 signalizaci (170). Na úrovni srdce bylo také prokázáno, že sEng interakcí se signalizací TGFβ1 cytokinu a kolagenu vede k potlačení tvorby kolagenu typu I (260) a k redukci fibrózy v oblasti po infarktu myokardu (261). Proto jsme analyzovali úroveň exprese vybraných členů TGFβ signalizace (tkáňový Eng, TGFβRII, ALK-1, ALK-5, pSmad 2/3 a pSmad 1/5, inhibitor plazminogenového aktivátoru a inhibitor diferenciaci 1), ovšem neprokázali jsme vliv vysokých hladin sEng na žádný z členů TGFβ signalizace. Taktéž nebyly prokázány změny na úrovni markerů zánětu, oxidačního stresu a endotelové dysfunkce, což vede k závěru, že vysoké hladiny sEng v plazmě neindukují žádné morfologické a funkční změny v srdci u těchto myší na standardní dietě.

Druhá část studie hodnotila změny po tříměsíčním podávání vysokotukové diety (1,25 % cholesterolu, 40 % tuku) u téhož myšího modelu, jelikož vysoké hladiny sEng jsou spojovány především s hypercholesterolémií, a to u myších modelů i lidí (250). Přestože jsme předpokládali, že kombinace vysokých hladin sEng a hypercholesterolémie bude působit jako dvojitý rizikový faktor, ani v této části studie se neprokázal signifikantní vliv této kombinace na morfologickou strukturu či expresi markerů totožných s první částí studie. Tato data souhrnně naznačují, že ani stav mírné hypercholesterolémie nepotencuje vliv sEng na srdce.

Celkově lze tedy konstatovat, soudě dle dosažených výsledků ve studiích konfrontovaných s aktuálními poznatky odborné veřejnosti o roli tkáňového a solubilního Eng,

že obě dvě tyto formy participují v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. Tkáňový Eng se zdá být zásadní pro správné fungování cévního endotelu a sEng může být považován za prognostický marker rozvoje kardiovaskulárních onemocnění, jež jsou spojeny s endotelovou dysfunkcí a hypercholesterolémií.

## 6. Závěry

- Myší model s vysokou hladinou lidského sEng v plazmě (Sol-Eng<sup>+</sup> high) po podávání vysokotukové diety (1,25 % cholesterolu, 40 % tuku) rozvíjí fenotyp endotelové dysfunkce, jež je charakterizován narušenou schopností aorty vasodilatace a vasokonstrikce. Sol-Eng<sup>+</sup> high skupina také vykazovala signifikantně sníženou expresi tkáňového Eng, transkripčního faktoru Smad 2/3 a eNOS a též jejich aktivních fosforylovaných forem v aortě. Výsledky studie potvrzují, že dlouhodobý stav hypercholesterolémie vede k rozvoji endotelové dysfunkce reflektované na úrovni Eng/eNOS signalizace, což dále naznačuje, že vysoké hladiny sEng v plazmě mohou být považovány za rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárních onemocnění.
- Hypercholesterolémie, jež ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> myší model spontánně rozvíjí, byla doprovázena signifikantně zvýšenými hladinami sEng, prozánětlivého P-selektinu a rozvratem metabolismu NO u těchto myší. Hypercholesterolémie také vedla ke snížené expresi všech členů Eng/Smad 2/3/eNOS signalizační kaskády v aortě, což vyústilo v rozvoj endotelové a vaskulární dysfunkce, charakterizované narušenou vasodilatační schopností endotelových a hladkých svalových buněk v aortě. Tyto změny jsou tedy reflektovány na úrovni změněné exprese tkáňového Eng a hladin sEng, což naznačuje významnou roli obou forem endoglinu v cévní patologii.
- Vysoké hladiny sEng v plazmě neovlivňují expresi vybraných členů TGFβ signalizační kaskády, rozvoj endotelové dysfunkce či zánětlivého procesu a taktéž se nepodílí na rozvoji strukturálních a fibrózních změn v srdcích Sol-Eng<sup>+</sup> transgenního myšího modelu, jež byl krměn standardní dietou. Navzdory skutečnosti, že vysoké hladiny sEng v plazmě bývají v klinické praxi často doprovázeny stavem hypercholesterolémie, ani tato dvojkombinace nevedla k signifikantním změnám u výše hodnocených parametrů v srdcích Sol-Eng<sup>+</sup> transgenního myšího modelu krměného vysokotukovou dietou (1,25 % cholesterolu, 40 % tuku).

## 7. Podíl předkladatelky na publikovaných pracích zahrnutých v disertační práci

Vitverova B., Blazickova K., Najmanova I., Vicen M., Hyspler R., Dolezelova E., Nemeckova I., Tebbens J.D., Bernabeu C., Pericacho M., Nachtigal P. (2018); Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis* 271:15-25; (IF = 4.467)

- Příprava zvířat ke studii, zpracování biologického materiálu (aorty a krevní sérum)
- ELISA a Luminex analýza
- Funkční analýza pomocí myografu
- Western blot analýza
- Hlavní podíl na analýze dat
- Hlavní podíl na sepsání textu publikace

Rathouska J., Fikrova P., Jezkova K., Varejckova M., Mrkvicova A., Dolezelova E., Nemeckova I., Vitverova B., Peslova L., Gallardo-Vara E., Pericacho M., Nachtigal P. (2017); High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart. *Heart and Vessels* vol. 32:1013-1024; (IF = 3.434)

- Podíl na textu publikace

Vicen M.\*, Vitverova B.\*, Havelek R., Blazickova K., Machacek M., Rathouska J., Najmanova I., Dolezelova E., Prasnicka A., Sternak M., Bernabeu C., Nachtigal P. (2019); Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction *in vivo* and *in vitro*. *The FASEB Journal* vol. 33:6099-6114; (IF = 5.595)

- Podíl na zpracování biologického materiálu pro *in vivo* část studie (aorty a krevní sérum)
- Funkční analýza pomocí myografu pro *in vivo* část studie
- Western blot analýza pro *in vivo* část studie
- Hlavní podíl na analýze dat pro *in vivo* část studie
- Hlavní podíl na sepsání textu publikace týkající se *in vivo* části studie



## 8. Přehled publikační činnosti

Vicen M.\*, Vitverova B.\*, Havelek R., Blazickova K., Machacek M., Rathouska J., Najmanova I., Dolezelova E., Prasnicka A., Sternak M., Bernabeu C., Nachtigal P. (2019); Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction *in vivo* and *in vitro*. *The FASEB Journal* vol. 33:6099-6114; (IF = 5.595)

\* These authors contributed equally to this work.

Vitverova B., Blazickova K., Najmanova I., Vicen M., Hyspler R., Dolezelova E., Nemeckova I., Tebbens J.D., Bernabeu C., Pericacho M., Nachtigal P. (2018); Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis* 271:15-25; (IF = 4.467)

Rathouska J., Fikrova P., Jezkova K., Varejckova M., Mrkvicova A., Dolezelova E., Nemeckova I., Vitverova B., Peslova L., Gallardo-Vara E., Pericacho M., Nachtigal P. (2017); High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart. *Heart and Vessels* vol. 32:1013-1024; (IF = 3.434)

Varejckova M., Gallardo-Vara E., Vicen M., Vitverova B., Fikrova P., Dolezelova E., Rathouska J., Prasnicka A., Blazickova K., Micuda S., Bernabeu C., Nemeckova I., Nachtigal P. (2017); Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF-kB and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sciences* vol. 175:52-60; (IF = 2.936)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Fikrova P., Dolezelova E., Varejckova M., Vitverova B., Tysonova K., Serwaczak A., Buczek E., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P. (2016); High levels of soluble endoglin induce pro-inflammatory and oxidative stress phenotype associated with preserved NO-dependent vasodilatation in aorta from mice fed high fat diet. *Journal of Vascular Research* vol. 53:149-162; (IF= 2.186)

## 9. Prezentace na konferencích

B. Vitverova, K. Jezkova, J. Rathouska, I. Nemeckova, S. Chlopicki, P. Nachtigal; Effect of high fat diet on aorta from mice overexpressing soluble endoglin. New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, Paříž, Francie (2016)

B. Vitverova, K. Jezkova, J. Rathouska, I. Nemeckova, S. Chlopicki, P. Nachtigal; Changes of membrane and soluble endoglin levels as a possible biomarker of endothelial dysfunction. XX. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn (2016)

B. Vitverova, K. Blazickova, J. Rathouska, I. Nemeckova, S. Chlopicki, P. Nachtigal; The early development of endothelial dysfunction in mice is associated with changes in levels of membrane and soluble endoglin. 7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy, Hradec Králové (2017)

B. Vitverova, K. Blazickova, J. Rathouska, I. Nemeckova, I. Najmanova, S. Chlopicki, P. Nachtigal; Aortic endoglin expression and soluble endoglin levels are changed during early development of endothelial dysfunction in mouse model of atherosclerosis. 12<sup>th</sup> International HHT Scientific Conference, Dubrovnik, Chorvatsko (2017)

B. Vitverova, K. Blazickova, J. Rathouska, I. Nemeckova, M. Vicen, S. Chlopicki, P. Nachtigal; Changes of membrane and soluble endoglin levels during early development of endothelial dysfunction in mice. 85<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress, Praha (2017)

B. Vitverova, K. Blazickova, I. Najmanova, M. Vicen, M. Pericacho, P. Nachtigal; High soluble endoglin levels promote endothelial dysfunction in aorta in mice fed high fat diet. 25<sup>th</sup> Kraków conference on Endothelium, Krakow, Polsko (2017)

B. Vitverova, K. Blazickova, I. Najmanova, M. Vicen, M. Pericacho, P. Nachtigal; High soluble endoglin levels in combination with high fat diet induce the development of endothelial dysfunction in mouse aorta. XXI. kongres o ateroskleróze, Olomouc (2017)

B. Vitverova, K. Blazickova, I. Najmanova, M. Vicen, M. Pericacho, P. Nachtigal; High soluble endoglin levels accompanied by mild hypercholesterolemia aggravate endothelial dysfunction in mouse aorta. 8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy, Hradec Králové (2018)

B. Vitverova, K. Blazickova, I. Najmanova, M. Vicen, M. Pericacho, P. Nachtigal; High soluble endoglin levels accompanied by mild hypercholesterolemia are a risk factor for the development of endothelial dysfunction in mice. 86<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress, Lisabon, Portugalsko (2018)

B. Vitverova, K. Blazickova, J. Rathouska, M. Vicen, S. Chlopicki, P. Nachtigal; Effects of membrane endoglin and its soluble form in early development of endothelial dysfunction in mice. XXII. kongres o ateroskleróze, Olomouc (2018)

B. Vitverova, K. Blazickova, J. Rathouska, M. Vicen, P. Nachtigal; Membrane and soluble endoglin role in early development of endothelial dysfunction in mice. 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy, Hradec Králové (2019)

B. Vitverova, K. Blazickova, J. Rathouska, M. Vicen, P. Nachtigal; Vascular/endothelial dysfunction is related to altered endoglin expression and signaling in hypercholesterolemic mice. 87<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress, Maastricht, Nizozemsko (2019)

## 10. Použitá literatura

1. Davies, M. J., Woolf, N., Rowles, P. M., and Pepper, J. (1988) Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* **60**, 459-464
2. Keaney, J. F., Jr. (2000) Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* **21**, 99-166
3. Marti, C. N., Gheorghide, M., Kalogeropoulos, A. P., Georgiopoulou, V. V., Quyyumi, A. A., and Butler, J. (2012) Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol* **60**, 1455-1469
4. Kinlay, S., Libby, P., and Ganz, P. (2001) Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* **12**, 383-389
5. Charkoudian, N. (2010) Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *J Appl Physiol (1985)* **109**, 1221-1228
6. Beny, J. L., Nguyen, M. N., Marino, M., and Matsui, M. (2008) Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* **51**, 505-512
7. Gericke, A., Sniatecki, J. J., Mayer, V. G., Goloborodko, E., Patzak, A., Wess, J., and Pfeiffer, N. (2011) Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1602-1608
8. Di Wang, H., Ratsep, M. T., Chapman, A., and Boyd, R. (2010) Adventitial fibroblasts in vascular structure and function: the role of oxidative stress and beyond. *Can J Physiol Pharmacol* **88**, 177-186
9. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126
10. Turunen, M. P., Hiltunen, M. O., and Yla-Herttuala, S. (1999) Gene therapy for angiogenesis, restenosis and related diseases. *Exp Gerontol* **34**, 567-574
11. Singh, R. B., Mengi, S. A., Xu, Y. J., Arneja, A. S., and Dhalla, N. S. (2002) Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol* **7**, 40-53
12. Almeida, N. C. C., Queiroz, M. A. F., Lima, S. S., Brasil Costa, I., Ayin Fossa, M. A., Vallinoto, A. C. R., Ishak, M. O. G., and Ishak, R. (2019) Association of Chlamydia trachomatis, C. pneumoniae, and IL-6 and IL-8 Gene Alterations With Heart Diseases. *Front Immunol* **10**, 87

13. Jia, Y. J., Liu, J., Han, F. F., Wan, Z. R., Gong, L. L., Liu, H., Zhang, W., Wardell, T., Lv, Y. L., and Liu, L. H. (2017) Cytomegalovirus infection and atherosclerosis risk: A meta-analysis. *J Med Virol* **89**, 2196-2206
14. Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., and Nasri, H. (2014) Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* **5**, 927-946
15. Gimbrone, M. A., Jr., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R., and Garcia-Cardena, G. (2000) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **902**, 230-239; discussion 239-240
16. Incalza, M. A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., and Giorgino, F. (2018) Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* **100**, 1-19
17. Wu, M. Y., Li, C. J., Hou, M. F., and Chu, P. Y. (2017) New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **18**
18. Seo, J. W., Yang, E. J., Yoo, K. H., and Choi, I. H. (2015) Macrophage Differentiation from Monocytes Is Influenced by the Lipid Oxidation Degree of Low Density Lipoprotein. *Mediators Inflamm* **2015**, 235797
19. Tsimikas, S., and Miller, Y. I. (2011) Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* **17**, 27-37
20. Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809
21. Goubergrits, L., Affeld, K., Fernandez-Britto, J., and Falcon, L. (2002) Atherosclerosis and flow in carotid arteries with authentic geometries. *Biorheology* **39**, 519-524
22. Orekhov, A. N., Andreeva, E. R., and Bobryshev, Y. V. (2016) Cellular mechanisms of human atherosclerosis: Role of cell-to-cell communications in subendothelial cell functions. *Tissue Cell* **48**, 25-34
23. Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J. K., Katagiri, H., Majima, M., Yokode, M., Kita, T., and Narumiya, S. (2004) Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* **114**, 784-794
24. McEver, R. P. (2001) Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* **86**, 746-756

25. Sonnweber, T., Pizzini, A., Nairz, M., Weiss, G., and Tancevski, I. (2018) Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* **19**
26. Hansson, G. K., Libby, P., and Tabas, I. (2015) Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med* **278**, 483-493
27. Badimon, L., and Vilahur, G. (2014) Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med* **276**, 618-632
28. Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., and Wissler, R. W. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1512-1531
29. Newby, A. C., and Zaltsman, A. B. (1999) Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* **41**, 345-360
30. Syed, M. B. J., Fletcher, A. J., Dweck, M. R., Forsythe, R., and Newby, D. E. (2018) Imaging aortic wall inflammation. *Trends Cardiovasc Med*
31. Johnson, J. L., Baker, A. H., Oka, K., Chan, L., Newby, A. C., Jackson, C. L., and George, S. J. (2006) Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* **113**, 2435-2444
32. Inagami, T., Naruse, M., and Hoover, R. (1995) Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* **57**, 171-189
33. Galley, H. F., and Webster, N. R. (2004) Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* **93**, 105-113
34. Baumgartner-Parzer, S. M., and Waldhausl, W. K. (2001) The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **109 Suppl 2**, S166-179
35. Rubanyi, G. M. (1993) The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* **22 Suppl 4**, S1-14
36. Vane, J. R., Anggard, E. E., and Botting, R. M. (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* **323**, 27-36

37. Vanhoutte, P. M. (1988) The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med* **319**, 512-513
38. Nakayama, T. (2006) Prostacyclin analogues: prevention of cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **4**, 351-359
39. Garland, C. J., Hiley, C. R., and Dora, K. A. (2011) EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol* **164**, 839-852
40. Ozkor, M. A., and Quyyumi, A. A. (2011) Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol Res Pract* **2011**, 156146
41. Drexler, H. (1998) Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol* **82**, 3S-4S
42. Fan, J., Unoki, H., Iwasa, S., and Watanabe, T. (2000) Role of endothelin-1 in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* **902**, 84-93; discussion 93-84
43. Feletou, M., Huang, Y., and Vanhoutte, P. M. (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* **164**, 894-912
44. Davignon, J., and Ganz, P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III27-32
45. Sitia, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., Tramontana, S., Perticone, F., Naccarato, P., Camici, P., Picano, E., Cortigiani, L., Bevilacqua, M., Milazzo, L., Cusi, D., Barlassina, C., Sarzi-Puttini, P., and Turiel, M. (2010) From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity reviews* **9**, 830-834
46. Moncada, S., and Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**, 2002-2012
47. Kelm, M. (1999) Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 273-289
48. Cayatte, A. J., Palacino, J. J., Horten, K., and Cohen, R. A. (1994) Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* **14**, 753-759
49. Vallance, P., and Chan, N. (2001) Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* **85**, 342-350
50. Heiss, E. H., and Dirsch, V. M. (2014) Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des* **20**, 3503-3513
51. Harrison, D. G. (1997) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* **100**, 2153-2157

52. Ogonowski, A. A., Kaesemeyer, W. H., Jin, L., Ganapathy, V., Leibach, F. H., and Caldwell, R. W. (2000) Effects of NO donors and synthase agonists on endothelial cell uptake of L-Arg and superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C136-143
53. Kawashima, S., and Yokoyama, M. (2004) Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 998-1005
54. Munzel, T., Daiber, A., Ullrich, V., and Mulsch, A. (2005) Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1551-1557
55. Blankenberg, S., Barbaux, S., and Tiret, L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**, 191-203
56. Auvinen, K., Jalkanen, S., and Salmi, M. (2014) Expression and function of endothelial selectins during human development. *Immunology* **143**, 406-415
57. Fotis, L., Agrogiannis, G., Vlachos, I. S., Pantopoulou, A., Margoni, A., Kostaki, M., Verikokos, C., Tzivras, D., Mikhailidis, D. P., and Perrea, D. (2012) Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model. *In Vivo* **26**, 243-250
58. Schroeder, H. W., Jr., and Cavacini, L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S41-52
59. Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y., and Newman, P. J. (2016) Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol* **23**, 253-259
60. Privratsky, J. R., Newman, D. K., and Newman, P. J. (2010) PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci* **87**, 69-82
61. McEver, R. P. (2002) Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 581-586
62. Gebuhrer, V., Murphy, J. F., Bordet, J. C., Reck, M. P., and McGregor, J. L. (1995) Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells. *Biochem J* **306 ( Pt 1)**, 293-298
63. Johnson-Tidey, R. R., McGregor, J. L., Taylor, P. R., and Poston, R. N. (1994) Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol* **144**, 952-961



64. Huo, Y., and Ley, K. F. (2004) Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* **14**, 18-22
65. Huo, Y., Schober, A., Forlow, S. B., Smith, D. F., Hyman, M. C., Jung, S., Littman, D. R., Weber, C., and Ley, K. (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* **9**, 61-67
66. Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**, 1203-1211
67. Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E., and Abdala-Valencia, H. (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* **15**, 1607-1638
68. Cerutti, C., and Ridley, A. J. (2017) Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res* **358**, 31-38
69. Garin, G., and Berk, B. C. (2006) Flow-mediated signaling modulates endothelial cell phenotype. *Endothelium* **13**, 375-384
70. VanderLaan, P. A., Reardon, C. A., and Getz, G. S. (2004) Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 12-22
71. Kawakami, A., Aikawa, M., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Libby, P., and Sacks, F. M. (2006) Apolipoprotein CIII induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells and increases adhesion of monocytic cells. *Circulation* **114**, 681-687
72. Khan, B. V., Parthasarathy, S. S., Alexander, R. W., and Medford, R. M. (1995) Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **95**, 1262-1270
73. Liao, J. K. (2013) Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest* **123**, 540-541
74. Hubbard, A. K., and Rothlein, R. (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* **28**, 1379-1386
75. Lawson, C., and Wolf, S. (2009) ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* **61**, 22-32
76. Hwang, S. J., Ballantyne, C. M., Sharrett, A. R., Smith, L. C., Davis, C. E., Gotto, A. M., Jr., and Boerwinkle, E. (1997) Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1,

- and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* **96**, 4219-4225
77. Malik, I., Danesh, J., Whincup, P., Bhatia, V., Papacosta, O., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., and Haskard, D. (2001) Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet* **358**, 971-976
78. Kitagawa, K., Matsumoto, M., Sasaki, T., Hashimoto, H., Kuwabara, K., Ohtsuki, T., and Hori, M. (2002) Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis* **160**, 305-310
79. Toma, I., and McCaffrey, T. A. (2012) Transforming growth factor-beta and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res* **347**, 155-175
80. Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., and Ten Dijke, P. (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* **65**, 599-608
81. Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004) Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1161-1165
82. Jenkins, G. (2008) The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1068-1078
83. Huang, T., David, L., Mendoza, V., Yang, Y., Villarreal, M., De, K., Sun, L., Fang, X., Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L., and Hinck, A. P. (2011) TGF-beta signalling is mediated by two autonomously functioning TbetaRI:TbetaRII pairs. *EMBO J* **30**, 1263-1276
84. Inman, G. J. (2005) Linking Smads and transcriptional activation. *Biochem J* **386**, e1-e3
85. Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S., and ten Dijke, P. (2003) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**, 817-828
86. Esparza-Lopez, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., and Lopez-Casillas, F. (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* **276**, 14588-14596
87. Cheifetz, S., Andres, J. L., and Massague, J. (1988) The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem* **263**, 16984-16991

88. Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2009) The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714
89. Inman, G. J., Nicolas, F. J., and Hill, C. S. (2002) Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* **10**, 283-294
90. Li, Y., Wang, M., Carra, C., and Cucinotta, F. A. (2012) Modularized Smad-regulated TGFbeta signaling pathway. *Math Biosci* **240**, 187-200
91. Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573-3584
92. Bakin, A. V., Rinehart, C., Tomlinson, A. K., and Arteaga, C. L. (2002) p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* **115**, 3193-3206
93. Hong, M., Wilkes, M. C., Penheiter, S. G., Gupta, S. K., Edens, M., and Leof, E. B. (2011) Non-Smad transforming growth factor-beta signaling regulated by focal adhesion kinase binding the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **286**, 17841-17850
94. Fonsatti, E., Nicolay, H. J., Altomonte, M., Covre, A., and Maio, M. (2010) Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res* **86**, 12-19
95. Grainger, D. J. (2004) Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 399-404
96. Bjorkerud, S. (1991) Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arterioscler Thromb* **11**, 892-902
97. Grainger, D. J., Kemp, P. R., Witchell, C. M., Weissberg, P. L., and Metcalfe, J. C. (1994) Transforming growth factor beta decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by extending the G2 phase of the cell cycle and delays the rise in cyclic AMP before entry into M phase. *Biochem J* **299 ( Pt 1)**, 227-235
98. Owens, G. K., Geisterfer, A. A., Yang, Y. W., and Komoriya, A. (1988) Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* **107**, 771-780
99. Kojima, S., Harpel, P. C., and Rifkin, D. B. (1991) Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor beta: an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J Cell Biol* **113**, 1439-1445

100. Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., and et al. (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693-699
101. Grainger, D. J., and Metcalfe, J. C. (1995) A pivotal role for TGF-beta in atherogenesis? *Biol Rev Camb Philos Soc* **70**, 571-596
102. Robbie, L., and Libby, P. (2001) Inflammation and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci* **947**, 167-179; discussion 179-180
103. Pardali, E., and Ten Dijke, P. (2012) TGFbeta signaling and cardiovascular diseases. *Int J Biol Sci* **8**, 195-213
104. Little, P. J., Osman, N., and O'Brien, K. D. (2008) Hyperelongated biglycan: the surreptitious initiator of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **19**, 448-454
105. Little, P. J., Tannock, L., Olin, K. L., Chait, A., and Wight, T. N. (2002) Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor-beta1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 55-60
106. Leonarduzzi, G., Scavazza, A., Biasi, F., Chiarpotto, E., Camandola, S., Vogel, S., Dargel, R., and Poli, G. (1997) The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J* **11**, 851-857
107. Bobik, A., Agrotis, A., Kanellakis, P., Dilley, R., Krushinsky, A., Smirnov, V., Tararak, E., Condron, M., and Kostolias, G. (1999) Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* **99**, 2883-2891
108. Curado, F., Spuul, P., Egana, I., Rottiers, P., Daubon, T., Veillat, V., Duhamel, P., Leclercq, A., Gontier, E., and Genot, E. (2014) ALK5 and ALK1 play antagonistic roles in transforming growth factor beta-induced podosome formation in aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol* **34**, 4389-4403
109. Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., and ten Dijke, P. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* **21**, 1743-1753

110. Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., and D'Amore, P. A. (1998) PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* **141**, 805-814
111. Ruiz-Ortega, M., Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., Carvajal, G., and Egido, J. (2007) TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* **74**, 196-206
112. Seki, T., Hong, K. H., and Oh, S. P. (2006) Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* **86**, 116-129
113. Bertolino, P., Deckers, M., Lebrin, F., and ten Dijke, P. (2005) Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* **128**, 585S-590S
114. Yao, Y., Zebboudj, A. F., Torres, A., Shao, E., and Bostrom, K. (2007) Activin-like kinase receptor 1 (ALK1) in atherosclerotic lesions and vascular mesenchymal cells. *Cardiovasc Res* **74**, 279-289
115. Roelen, B. A., van Rooijen, M. A., and Mummery, C. L. (1997) Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn* **209**, 418-430
116. Rathouska, J., Vecerova, L., Strasky, Z., Slanarova, M., Breckova, E., Mullerova, Z., Andrys, C., Micuda, S., and Nachtigal, P. (2011) Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* **64**, 53-59
117. Strasky, Z., Vecerova, L., Rathouska, J., Slanarova, M., Breckova, E., Kudlackova, Z., Andrys, C., Micuda, S., and Nachtigal, P. (2011) Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J* **75**, 1747-1755
118. Roman, B. L., and Hinck, A. P. (2017) ALK1 signaling in development and disease: new paradigms. *Cell Mol Life Sci* **74**, 4539-4560
119. Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**, 19027-19030
120. Gougos, A., and Letarte, M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* **265**, 8361-8364
121. St-Jacques, S., Cymerman, U., Pece, N., and Letarte, M. (1994) Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* **134**, 2645-2657

122. Bellon, T., Corbi, A., Lastres, P. et al. (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmatic regions. In *Eur J Immunol* pp. 2340-2345
123. Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L. M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L., and Bernabeu, C. (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* **273**, 33011-33019
124. Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Moren, A., ten Dijke, P., and Miyazono, K. (1994) Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**, 1995-2001
125. Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, C., and Vary, C. P. (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **153**, 323-335
126. Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Langa, C., and Bernabeu, C. (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* **277**, 43799-43808
127. Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M. P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C. P., Ramirez, J. R., Friedman, S., and Bernabeu, C. (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* **100**, 4001-4010
128. Rius, C., Smith, J. D., Almendro, N., Langa, C., Botella, L. M., Marchuk, D. A., Vary, C. P., and Bernabeu, C. (1998) Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* **92**, 4677-4690
129. Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Rius, C., Corbi, A., and Bernabeu, C. (2001) Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* **276**, 34486-34494
130. Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., Lopez, L. A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1996) Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* **133**, 1109-1121
131. Li, C., Guo, B., Bernabeu, C., and Kumar, S. (2001) Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech* **52**, 437-449

132. Ma, X., Labinaz, M., Goldstein, J., Miller, H., Keon, W. J., Letarte, M., and O'Brien, E. (2000) Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2546-2552
133. Takahashi, N., Haba, A., Matsuno, F., and Seon, B. K. (2001) Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res* **61**, 7846-7854
134. Santibanez, J. F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. (2011) TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* **121**, 233-251
135. Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A., and Bernabeu, C. (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* **277**, 29197-29209
136. Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Pardali, E.,. (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. In *Angiogenesis* pp. 79-89
137. Tian, F., Zhou, A.X., Smits, A.M., et al. (2010) Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/Smad1/5 signaling in vitro. In *Biochem Biophys Res Commun* pp. 283-288
138. Blanco, F. J., Grande, M. T., Langa, C., Oujó, B., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Gomez, E., Quintanilla, M., Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2008) S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* **103**, 1383-1392
139. Jang, Y. S., and Choi, I. H. (2014) Contrasting roles of different endoglin forms in atherosclerosis. *Immune network* **14**, 237-240
140. Qu, R., Silver, M. M., and Letarte, M. (1998) Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* **292**, 333-343
141. Vincent, E. B., Runyan, R. B., and Weeks, D. L. (1998) Production of the transforming growth factor-beta binding protein endoglin is regulated during chick heart development. *Dev Dyn* **213**, 237-247
142. Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A., Burn, J., and Diamond, A. G. (2000)

- Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* **217**, 42-53
143. Bourdeau, A., Dumont, D. J., and Letarte, M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **104**, 1343-1351
144. Gamble, J. R., Khew-Goodall, Y., and Vadas, M. A. (1993) Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* **150**, 4494-4503
145. Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., Fradelizi, D., and Tedgui, A. (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* **89**, 930-934
146. Li, C., Mollahan, P., Baguneid, M. S., McMahon, R. F., Kumar, P., Walker, M. G., Freemont, A. J., and Kumar, S. (2006) A comparative study of neovascularisation in atherosclerotic plaques using CD31, CD105 and TGF beta 1. *Pathobiology* **73**, 192-197
147. Post, S., Peeters, W., Busser, E., Lamers, D., Sluijter, J. P., Goumans, M. J., de Weger, R. A., Moll, F. L., Doevendans, P. A., Pasterkamp, G., and Vink, A. (2008) Balance between angiopoietin-1 and angiopoietin-2 is in favor of angiopoietin-2 in atherosclerotic plaques with high microvessel density. *J Vasc Res* **45**, 244-250
148. Jerkic, M., Rivas-Elena, J. V., Prieto, M., Carron, R., Sanz-Rodriguez, F., Perez-Barriocanal, F., Rodriguez-Barbero, A., Bernabeu, C., and Lopez-Novoa, J. M. (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* **18**, 609-611
149. Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., Husain, M., and Letarte, M. (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* **96**, 684-692
150. Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C. P., Lopez-Novoa, J. M., Attisano, L., and Bernabeu, C. (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* **210**, 456-468
151. Vecerova, L., Strasky, Z., Rathouska, J., Slanarova, M., Brcakova, E., Micuda, S., and Nachtigal, P. (2012) Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. *J Atheroscler Thromb* **19**, 115-126



152. Hawinkels, L. J., Kuiper, P., Wiercinska, E., Verspaget, H. W., Liu, Z., Pardali, E., Sier, C. F., and ten Dijke, P. (2010) Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* **70**, 4141-4150
153. Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K. H., Yuan, H. T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., and Karumanchi, S. A. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* **12**, 642-649
154. Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H959-974
155. Blann, A. D., Wang, J. M., Wilson, P. B., and Kumar, S. (1996) Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **120**, 221-226
156. Li, C. G., Bethel, H., Wilson, P.B. et al. (2000) The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease. In *Atherosclerosis* pp. 249-256
157. Ikemoto, T., Hojo, Y., Kondo, H. et al. (2012) Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. In *Heart Vessels* pp. 344-351
158. Cudmore, M., Ahmad, S., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Coxall, H., Chudasama, K., Devey, L. R., Wigmore, S. J., Abbas, A., Hewett, P. W., and Ahmed, A. (2007) Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation* **115**, 1789-1797
159. Blazquez-Medela, A. M., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M. A., Recio-Rodriguez, J. I., Sanchez-Rodriguez, A., Lopez-Novoa, J. M., and Martinez-Salgado, C. (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* **8**, 86
160. Cui, S., Lu, S. Z., Chen, Y. D., He, G. X., Meng, L. J., Liu, J. P., Song, Z. Y., Liu, X. L., Song, X. T., Ge, C. J., and Liu, H. (2008) Relationship among soluble CD105, hypersensitive C-reactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study. *Chin Med J (Engl)* **121**, 128-132
161. Rathouska, J., Jezkova, K., Nemeckova, I., Nachtigal, P. (2015) Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. In *Atherosclerosis* pp. 383-388

162. Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H. M., and Kooistra, T. (2007) Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1706-1721
163. Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., Maynard, S. E., Sachs, B. P., Sibai, B. M., Epstein, F. H., Romero, R., Thadhani, R., Karumanchi, S. A., and Group, C. S. (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* **355**, 992-1005
164. Walshe, T. E., Dole, V. S., Maharaj, A. S., Patten, I. S., Wagner, D. D., and D'Amore, P. A. (2009) Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1185-1192
165. Stefoni, S., Cianciolo, G., Donati, G., Dormi, A., Silvestri, M. G., Coli, L., De Pascalis, A., and Iannelli, S. (2002) Low TGF- $\beta$ 1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int* **61**, 324-335
166. Li, C., Hampson, I. N., Hampson, L., Kumar, P., Bernabeu, C., and Kumar, S. (2000) CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor  $\beta$ 1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* **14**, 55-64
167. Forstermann, U., and Sessa, W. C. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* **33**, 829-837, 837a-837d
168. Van Le, B., Franke, D., Svergun, D. I., Han, T., Hwang, H. Y., and Kim, K. K. (2009) Structural and functional characterization of soluble endoglin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **383**, 386-391
169. De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., and O'Connor-McCourt, M. D. (2003) Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) binding to the extracellular domain of the type II TGF- $\beta$  receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *J Mol Biol* **328**, 1173-1183
170. Gregory, A. L., Xu, G., Sotov, V., and Letarte, M. (2014) Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta* **35 Suppl**, S93-99
171. Castonguay, R., Werner, E. D., Matthews, R. G., Presman, E., Mulivor, A. W., Solban, N., Sako, D., Pearsall, R. S., Underwood, K. W., Seehra, J., Kumar, R., and Grinberg, A. V. (2011) Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem* **286**, 30034-30046

172. Star, G. P., Giovinazzo, M., and Langleben, D. (2010) Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: a potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res* **80**, 349-354
173. Mukhopadhyay, R. (2013) Mouse models of atherosclerosis: explaining critical roles of lipid metabolism and inflammation. *J Appl Genet* **54**, 185-192
174. Getz, G. S., and Reardon, C. A. (2012) Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1104-1115
175. Bentzon, J. F., and Falk, E. (2010) Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Curr Opin Lipidol* **21**, 434-440
176. Davidson, W. S., Silva, R. A., Chantepie, S., Lagor, W. R., Chapman, M. J., and Kontush, A. (2009) Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 870-876
177. Paigen, B., Morrow, A., Holmes, P. A., Mitchell, D., and Williams, R. A. (1987) Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* **68**, 231-240
178. Paigen, B., Mitchell, D., Reue, K., Morrow, A., Lusis, A. J., and LeBoeuf, R. C. (1987) Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3763-3767
179. Shih, D. M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y. R., Navab, M., Fogelman, A. M., and Lusis, A. J. (1996) Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* **97**, 1630-1639
180. Shi, W., Wang, N. J., Shih, D. M., Sun, V. Z., Wang, X., and Lusis, A. J. (2000) Determinants of atherosclerosis susceptibility in the C3H and C57BL/6 mouse model: evidence for involvement of endothelial cells but not blood cells or cholesterol metabolism. *Circ Res* **86**, 1078-1084
181. Liao, F., Andalibi, A., deBeer, F. C., Fogelman, A. M., and Lusis, A. J. (1993) Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* **91**, 2572-2579
182. Park, J. Y., Seong, J. K., and Paik, Y. K. (2004) Proteomic analysis of diet-induced hypercholesterolemic mice. *Proteomics* **4**, 514-523
183. Shi, W., Pei, H., Fischer, J. J., James, J. C., Angle, J. F., Matsumoto, A. H., Helm, G. A., and Sarembock, I. J. (2004) Neointimal formation in two apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *J Lipid Res* **45**, 2008-2014

184. Miyoshi, T., Tian, J., Matsumoto, A. H., and Shi, W. (2006) Differential response of vascular smooth muscle cells to oxidized LDL in mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Atherosclerosis* **189**, 99-105
185. Lee, Y. T., Lin, H. Y., Chan, Y. W., Li, K. H., To, O. T., Yan, B. P., Liu, T., Li, G., Wong, W. T., Keung, W., and Tse, G. (2017) Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids Health Dis* **16**, 12
186. Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., and Breslow, J. L. (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **71**, 343-353
187. Knowles, J. W., and Maeda, N. (2000) Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2336-2345
188. Krieger, M., and Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* **63**, 601-637
189. Paszty, C., Maeda, N., Verstuyft, J., and Rubin, E. M. (1994) Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* **94**, 899-903
190. Plump, A. S., and Breslow, J. L. (1995) Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr* **15**, 495-518
191. Smith, J. D., and Breslow, J. L. (1997) The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med* **242**, 99-109
192. Knouff, C., Hinsdale, M. E., Mezdour, H., Altenburg, M. K., Watanabe, M., Quarfordt, S. H., Sullivan, P. M., and Maeda, N. (1999) Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J Clin Invest* **103**, 1579-1586
193. Pendse, A. A., Arbones-Mainar, J. M., Johnson, L. A., Altenburg, M. K., and Maeda, N. (2009) Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S178-182
194. Getz, G. S., and Reardon, C. A. (2009) Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S156-161
195. Defesche, J. C. (2004) Low-density lipoprotein receptor--its structure, function, and mutations. *Semin Vasc Med* **4**, 5-11

196. Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., and Herz, J. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* **92**, 883-893
197. Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4431-4435
198. Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., and De Meyer, G. R. Y. (2017) Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* **816**, 3-13
199. Bonthu, S., Heistad, D. D., Chappell, D. A., Lamping, K. G., and Faraci, F. M. (1997) Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 2333-2340
200. Witting, P. K., Pettersson, K., Ostlund-Lindqvist, A. M., Westerlund, C., Eriksson, A. W., and Stocker, R. (1999) Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb J* **13**, 667-675
201. Caligiuri, G., Levy, B., Pernow, J., Thoren, P., and Hansson, G. K. (1999) Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6920-6924
202. Jawien, J., Nastalek, P., and Korbut, R. (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* **55**, 503-517
203. Allinson, K. R., Carvalho, R. L., van den Brink, S., Mummery, C. L., and Arthur, H. M. (2007) Generation of a floxed allele of the mouse Endoglin gene. *Genesis* **45**, 391-395
204. Tual-Chalot, S., Oh, S. P., and Arthur, H. M. (2015) Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia: recent advances and future challenges. *Front Genet* **6**, 25
205. Lebrin, F., Srun, S., Raymond, K., Martin, S., van den Brink, S., Freitas, C., Breant, C., Mathivet, T., Larrivee, B., Thomas, J. L., Arthur, H. M., Westermann, C. J., Disch, F., Mager, J. J., Snijder, R. J., Eichmann, A., and Mummery, C. L. (2010) Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med* **16**, 420-428
206. Valbuena-Diez, A. C., Blanco, F.J., Oujó, B. et al. (2012) Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. In *Circulation* pp. 2612-2624

207. Vaughan, C. J., Gotto, A. M., Jr., and Basson, C. T. (2000) The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **35**, 1-10
208. Stancu, C., and Sima, A. (2001) Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* **5**, 378-387
209. Bellosta, S., Ferri, N., Bernini, F., Paoletti, R., and Corsini, A. (2000) Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* **32**, 164-176
210. Zhou, Q., and Liao, J. K. (2010) Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ J* **74**, 818-826
211. Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., and Liao, J. K. (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* **97**, 1129-1135
212. Simionescu, M., Stancu, C., Costache, G., and Sima, A. (2002) Endothelial cell response to hyperlipemia. Activation-dysfunction-injury, the protective role of simvastatin. *Vascul Pharmacol* **38**, 275-282
213. Wagner, A. H., Kohler, T., Ruckschloss, U., Just, I., and Hecker, M. (2000) Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 61-69
214. Sukhova, G. K., Williams, J. K., and Libby, P. (2002) Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1452-1458
215. Koh, K. K., Son, J. W., Ahn, J. Y., Jin, D. K., Kim, H. S., Choi, Y. M., Ahn, T. H., Kim, D. S., and Shin, E. K. (2004) Vascular effects of diet and statin in hypercholesterolemic patients. *Int J Cardiol* **95**, 185-191
216. Nachtigal, P., Pospisilova, N., Jamborova, G., Pospechova, K., Solichova, D., Andrys, C., Zdansky, P., Micuda, S., and Semecky, V. (2008) Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci* **82**, 708-717
217. Nachtigal, P., Pospisilova, N., Vecerova, L., Micuda, S., Brcakova, E., Pospechova, K., and Semecky, V. (2009) Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* **16**, 265-274
218. Zemankova, L., Varejckova, M., Dolezelova, E., Fikrova, P., Jezkova, K., Rathouska, J., Cerveny, L., Botella, L.M., Bernabeu, C., Nemeckova, I., Nachtigal, P. (2015) Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is

- mediated by endoglin. In *Journal of Physiology and Pharmacology* Vol. 66 pp. 403-413
219. Brownfoot, F. C., Tong, S., Hannan, N. J., Binder, N. K., Walker, S. P., Cannon, P., Hastie, R., Onda, K., and Kaitu'u-Lino, T. J. (2015) Effects of Pravastatin on Human Placenta, Endothelium, and Women With Severe Preeclampsia. *Hypertension* **66**, 687-697; discussion 445
220. Brownfoot, F. C., Tong, S., Hannan, N. J., Hastie, R., Cannon, P., and Kaitu'u-Lino, T. J. (2016) Effects of simvastatin, rosuvastatin and pravastatin on soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and soluble endoglin (sENG) secretion from human umbilical vein endothelial cells, primary trophoblast cells and placenta. *BMC Pregnancy Childbirth* **16**, 117
221. Brownfoot, F. C., Hannan, N., Onda, K., Tong, S., and Kaitu'u-Lino, T. (2014) Soluble endoglin production is upregulated by oxysterols but not quenched by pravastatin in primary placental and endothelial cells. *Placenta* **35**, 724-731
222. Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B., and Wendel, D. P. (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**, 1534-1537
223. Paauwe, M., ten Dijke, P., and Hawinkels, L. J. (2013) Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **17**, 421-435
224. Dallas, N. A., Samuel, S., Xia, L., Fan, F., Gray, M. J., Lim, S. J., and Ellis, L. M. (2008) Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* **14**, 1931-1937
225. She, X., Matsuno, F., Harada, N., Tsai, H., and Seon, B. K. (2004) Synergy between anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies and TGF-beta in suppression of growth of human endothelial cells. *Int J Cancer* **108**, 251-257
226. Romani, A. A., Borghetti, A. F., Del Rio, P., Sianesi, M., and Soliani, P. (2006) The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-positive vessel count. *J Surg Oncol* **93**, 446-455
227. Svatek, R. S., Karam, J. A., Roehrborn, C. G., Karakiewicz, P. I., Slawin, K. M., and Shariat, S. F. (2008) Preoperative plasma endoglin levels predict biochemical progression after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* **14**, 3362-3366
228. Taskiran, C., Erdem, O., Onan, A., Arisoy, O., Acar, A., Vural, C., Erdem, M., Ataoglu, O., and Guner, H. (2006) The prognostic value of endoglin (CD105) expression in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **16**, 1789-1793

229. Puerto-Camacho, P., Amaral, A. T., Lamhamedi-Cherradi, S. E., Menegaz, B. A., Castillo-Ecija, H., Ordonez, J. L., Dominguez, S., Jordan-Perez, C., Diaz-Martin, J., Romero-Perez, L., Lopez-Alvarez, M., Civantos-Jubera, G., Robles-Frias, M. J., Biscuola, M., Ferrer, C., Mora, J., Cuglievan, B., Schadler, K., Seifert, O., Kontermann, R., Pfizenmaier, K., Simon, L., Fabre, M., Carcaboso, A. M., Ludwig, J. A., and de Alava, E. (2019) Preclinical Efficacy of Endoglin-Targeting Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res* **25**, 2228-2240
230. Rosen, L. S., Gordon, M. S., Robert, F., and Matei, D. E. (2014) Endoglin for targeted cancer treatment. *Curr Oncol Rep* **16**, 365
231. Rosen, L. S., Hurwitz, H. I., Wong, M. K., Goldman, J., Mendelson, D. S., Figg, W. D., Spencer, S., Adams, B. J., Alvarez, D., Seon, B. K., Theuer, C. P., Leigh, B. R., and Gordon, M. S. (2012) A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 4820-4829
232. Green, B. D., Irwin, N., Duffy, N. A., Gault, V. A., O'Harte F, P., and Flatt, P. R. (2006) Inhibition of dipeptidyl peptidase-IV activity by metformin enhances the antidiabetic effects of glucagon-like peptide-1. *Eur J Pharmacol* **547**, 192-199
233. Jensterle, M., Sebestjen, M., Janez, A., Prezelj, J., Kocjan, T., Keber, I., and Pfeifer, M. (2008) Improvement of endothelial function with metformin and rosiglitazone treatment in women with polycystic ovary syndrome. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **159**, 399-406
234. Sacks, G. P., Studena, K., Sargent, K., and Redman, C. W. (1998) Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 80-86
235. Sena, C. M., Matafome, P., Louro, T., Nunes, E., Fernandes, R., and Seica, R. M. (2011) Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol* **163**, 424-437
236. Brownfoot, F. C., Hastie, R., Hannan, N. J., Cannon, P., Tuohey, L., Parry, L. J., Senadheera, S., Illanes, S. E., Kaitu'u-Lino, T. J., and Tong, S. (2016) Metformin as a prevention and treatment for preeclampsia: effects on soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin secretion and endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* **214**, 356 e351-356 e315
237. Csiszar, A. (2011) Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* **1215**, 117-122



238. Diaz-Gerevini, G. T., Repossi, G., Dain, A., Tarres, M. C., Das, U. N., and Eynard, A. R. (2016) Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* **32**, 174-178
239. Hannan, N. J., Brownfoot, F. C., Cannon, P., Deo, M., Beard, S., Nguyen, T. V., Palmer, K. R., Tong, S., and Kaitu'u-Lino, T. J. (2017) Resveratrol inhibits release of soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1) and soluble endoglin and improves vascular dysfunction - implications as a preeclampsia treatment. *Scientific reports* **7**, 1819
240. Blaha, M., Cermanova, M., Blaha, V., Jarolim, P., Andrys, C., Blazek, M., Maly, J., Smolej, L., Zajic, J., Masin, V., Zimova, R., and Rehacek, V. (2008) Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **197**, 264-270
241. Blazquez-Medela, A. M., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M.A. et al. (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. In *BMC Med.* p. 86
242. Shirazi, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., and Haystead, T. A. (1994) Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *J Biol Chem* **269**, 31598-31606
243. Gallardo-Vara, E., Blanco, F. J., Roque, M., Friedman, S. L., Suzuki, T., Botella, L. M., and Bernabeu, C. (2016) Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis* **19**, 155-171
244. Cruz-Gonzalez, I., Pabon, P., Rodriguez-Barbero, A., Martin-Moreiras, J., Pericacho, M., Sanchez, P. L., Ramirez, V., Sanchez-Ledesma, M., Martin-Herrero, F., Jimenez-Candil, J., Maree, A. O., Sanchez-Rodriguez, A., Martin-Luengo, C., and Lopez-Novoa, J. M. (2008) Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med* **12**, 955-961
245. Nachtigal, P., Zemankova Vecerova, L., Rathouska, J., and Strasky, Z. (2012) The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **224**, 4-11
246. Rossi, E., Sanz-Rodriguez, F., Eleno, N., Duwell, A., Blanco, F. J., Langa, C., Botella, L. M., Cabanas, C., Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2013) Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* **121**, 403-415
247. Ruiz-Remolina, L., Ollauri-Ibanez, C., Perez-Roque, L., Nunez-Gomez, E., Perez-Barriocanal, F., Lopez-Novoa, J. M., Pericacho, M., and Rodriguez-Barbero, A. (2017)

- Circulating soluble endoglin modifies the inflammatory response in mice. *PLoS One* **12**, e0188204
248. Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., and Munzel, T. (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**, 2673-2678
249. Jerkic, M., Rodriguez-Barbero, A., Prieto, M., Toporsian, M., Pericacho, M., Rivas-Elena, J. V., Obreo, J., Wang, A., Perez-Barriocanal, F., Arevalo, M., Bernabeu, C., Letarte, M., and Lopez-Novoa, J. M. (2006) Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* **69**, 845-854
250. Rathouska, J., Jezkova, K., Nemeckova, I., and Nachtigal, P. (2015) Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* **243**, 383-388
251. Hawinkels, L. J., Kuiper, P., Wiercinska, E. et al. (2010) Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. In *Cancer research* pp. 4140-4150
252. Nemeckova, I., Serwaczak, A., Oujó, B. et al. (2015) High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. In *PLoS One* p. e0119665
253. Jezkova, K., Rathouska, J., Nemeckova, I., Fikrova, P., Dolezelova, E., Varejckova, M., Vitverova, B., Tysonova, K., Serwaczak, A., Buczek, E., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M., Chlopicki, S., and Nachtigal, P. (2016) High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas from Mice Fed a High-Fat Diet. *J Vasc Res* **53**, 149-162
254. Csanyi, G., Gajda, M., Franczyk-Zarow, M., Kostogryś, R., Gwoźdz, P., Mateuszuk, L., Sternak, M., Wojcik, L., Zalewska, T., Walski, M., and Chlopicki, S. (2012) Functional alterations in endothelial NO, PGI(2) and EDHF pathways in aorta in ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice. *Prostaglandins & other lipid mediators* **98**, 107-115
255. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Jax, T., Kerber, S., Gharini, P., Balzer, J., Zotz, R. B., Scharf, R. E., Willers, R., Schechter, A. N., Feelisch, M., and Kelm, M. (2006) Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* **40**, 295-302
256. Kaczara, P., Proniewski, B., Lovejoy, C., Kus, K., Motterlini, R., Abramov, A. Y., and Chlopicki, S. (2018) CORM-401 induces calcium signalling, NO increase and activation of pentose phosphate pathway in endothelial cells. *FEBS J* **285**, 1346-1358

257. Somlyo, A. P., and Somlyo, A. V. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-236
258. Rossi, E., Smadja, D. M., Boscolo, E., Langa, C., Arevalo, M. A., Pericacho, M., Gamella-Pozuelo, L., Kauskot, A., Botella, L. M., Gaussem, P., Bischoff, J., Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2016) Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci* **73**, 1715-1739
259. Frohlich, E. D. (2000) Ischemia and fibrosis: the risk mechanisms of hypertensive heart disease. *Braz J Med Biol Res* **33**, 693-700
260. Kapur, N. K., Wilson, S., Yunis, A. A., Qiao, X., Mackey, E., Paruchuri, V., Baker, C., Aronovitz, M. J., Karumanchi, S. A., Letarte, M., Kass, D. A., Mendelsohn, M. E., and Karas, R. H. (2012) Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation* **125**, 2728-2738
261. Tseliou, E., Reich, H., de Couto, G., Terrovitis, J., Sun, B., Liu, W., and Marban, E. (2014) Cardiospheres reverse adverse remodeling in chronic rat myocardial infarction: roles of soluble endoglin and Tgf-beta signaling. *Basic Res Cardiol* **109**, 443

## 11. Soubor publikovaných prací

- I. **Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta.** Vitverova B., Blazickova K., Najmanova I., Vicen M., Hyspler R., Dolezelova E., Nemeckova I., Tebbens J.D., Bernabeu C., Pericacho M., Nachtigal P. *Atherosclerosis* 271 (2018) s. 15-25; (IF = 4.467)
  
- II. **High soluble endoglin levels do not induce changes in structural parameters of mouse heart.** Rathouska J., Fikrova P., Jezkova K., Varejckova M., Mrkvicova A., Dolezelova E., Nemeckova I., Vitverova B., Peslova L., Gallardo-Vara E., Pericacho M., Nachtigal P.; *Heart and Vessels* vol. 32 (2017) s. 1013-1024; (IF = 3.434)
  
- III. **Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction *in vivo* and *in vitro*.** Vicen M.\*, Vitverova B.\*, Havelek R., Blazickova K., Machacek M., Rathouska J., Najmanova I., Dolezelova E., Prasnicka A., Sternak M., Bernabeu C., Nachtigal P.; *The FASEB Journal* vol. 33 (2019) s.6099-6114; (IF = 5.595) \* These authors contributed equally to this work.