

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Hradec Králové 2008

Iva Uhlárová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Sledování vlivu atorvastatinu na expresi endoglinu a endoteliální NO syntázy (eNOS) u myšního modelu aterosklerózy.

Studying of atorvastatin effects on endoglin and endothelial NO synthase (eNOS) expression in mouse model of atherosclerosis.

Konzultant: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové 2008

Iva Uhlárová

Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D., za odborné vedení rigorózní práce, poskytování rad a materiálových podkladů k práci, dále Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc., a celé katedře biologických a lékařských věd za umožnění vykonávání experimentální části na této katedře.

Seznam použitých zkratek

Apo	apolipoprotein; bílkovina tvořící součást pláště lipoproteinu
COX-2	cyklooxygenáza typu 2
CRP	C – reaktivní protein
Eng	endoglin
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
GIT	gastrointestinální trakt
HDL	high density lipoprotein; lipoprotein s nízkou hustotou
HHT1	vrozená hemoragická telangiectasie typu 1
HMG-CoA reductáza	3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-koenzym A reductáza
ICAM-1	intercellular adhesion molekule – 1; adhezivní molekula z imunoglobulinové superrodiny
ICHS	ischemická choroba srdeční
IFN- γ	interferon – γ
IL	interleukiny
IM	infarkt myokardu
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	low density lipoprotein; lipoprotein s nízkou hustotou
Lp	lipoprotein
NF- κ B	nuclear faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PBS	0,01M fosfátový fyziologický roztok, pH 7,4
PG	prostaglandiny
T β RI, T β RII	serin/threonin kynázové receptory typu I a II
TGF- β	transforming growth factor β , transformující růstový faktor β
TLR	patří do skupiny tzv. Pattern recognition receptors; modelové rozpoznávací receptory
TNF	tumor necrosis factor; tumor nekrotizující faktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molekule - 1; adhezivní molekula z imunoglobulinové superrodiny
VLA	very late antigen; pozdní aktivační antigen
VLDL	very low density lipoprotein; lipoprotein s velmi nízkou hustotou

Abstrakt

Ateroskleróza je degenerativní onemocnění cévní stěny. Je to dlouhodobý proces vyznačující se ztvrdnutím tepenné stěny, ztrátou elasticity a zúžením průsvitu.

Dvojnásobně knokautované myši (apoE/LDL – receptor double – knockout) reprezentují nový model pro studium aterogeneze, který je schopen rozvinout závažný stupeň hyperlipidémie a aterosklerózy.

Statiny (neboli kompetitivní inhibitory 3hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A-reduktázy) patří v současné době mezi nejúčinnější a celosvětově nejpoužívanější hypolipidemika s příznivými účinky na hladiny sérových lipidů i na celkovou a kardiovaskulární mortalitu. Snižují především hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu.

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi endoglinu a jeho případnou kolokalizaci s endoteliální NO syntázou eNOS v aterosklerotických plátech a u apoE/LDL-receptor deficientních myší. Dále jsme chtěli zjistit, jak jsou tyto proteiny ovlivněny podáváním atorvastatinu.

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Výsledky biochemické analýzy prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu mělo výrazně hypolipidemický efekt.

Expresie endoglinu byla pozorována hlavně v cévním endotelu, a to jak v oblasti aorty, tak u menších cév a kapilár v okolním myokardu. U velkých aterosklerotických plátů byla expresie endoglinu na několika místech pozorována i v aterosklerotických plátech.

Fluorescenční imunohistochemie prokázala kolokalizaci exprese endoglinu a eNOS pouze na povrchu aterosklerotického plátu v aortě u obou skupin myší.

Tyto výsledky naznačují, že endoglin může být potenciálním cílem účinku atorvastatinu a zároveň proteinem působícím protektivně na cévní endotel a tudíž antiaterogenně díky zvyšování exprese eNOS a tudíž množství NO.

Abstract

Atherosclerosis, or sclerosis of arteries, is a degenerative disease of arteries. Sometimes it is called „the disease of 20th century“.

ApoE/LDL – receptor double knockout mice represent a new animal model for study of atherogenesis, which is characterized by severe hyperlipidaemia and atherosclerosis.

Statins (or competitive inhibitors 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-coenzym A-reductase) currently belong to the most efficient and the most useful hypolipidemic drugs for all over the world. They decrease mainly levels of total cholesterol and LDL cholesterol.

The aim of this thesis was to describe the expression of endoglin in atherosclerotic plaques in apoE/LDL-receptor deficient mice. Moreover we wanted to determine endoglin colocalization with eNOS and the effect of atorvastatin treatment on the expression of both molecules.

ApoE/LDLR-deficient mice on were subdivided into 2 groups. The control group of animals was fed with the western type diet. The same atherogenic diet was used in ATV group, where atorvastatin was added to the atherogenic diet at the dosage of 100 mg/kg per day.

The results of this thesis confirmed the expression of endoglin in atherosclerotic lesions in ApoE/LDLR-deficient mice. The expression of endoglin was located on the aortic vascular endothelium and in other smaller vessels and capillaries of surrounding myocardium. Immunohistochemical analysis showed endoglin co-expression with eNOS in aortic endothelium in both control and atorvastatin treated mice. Atorvastatin treatment resulted in a strong hypolipidemic effect. Stereological analysis demonstrated that atorvastatin significantly increased expression of endoglin and eNOS in mice aorta.

In conclusion, we propose, that endoglin might play protective role in atherogenesis by increasing eNOS expression in aortic endothelium in apoE/LDLr-deficient mice.

Úvod

Ateroskleróza je degenerativní onemocnění cévních stěn. Je to dlouhodobý proces vyznačující se ztvrdnutím tepenné stěny, ztrátou elasticity a zúžením průsvitu. Základním patogenním pochodem je porušená dynamická rovnováha mezi tvorbou, ukládáním a exkrecí aterogenních látek v arteriální stěně. Její primární příčinou může být nadbytek aterogenních lipoproteinů v cirkulující krvi, porucha endotelu arterie nebo porucha metabolické aktivity v arteriální stěně. Většinou se ale jedná o kombinaci uvedených poruch. Ateroskleróza se zásadně odlišuje od fyziologických stařeckých změn tepenného systému, které spočívají ve ztluštění stěny, prodloužení tepenné trubice, rozšíření průsvitu a snížené pružnosti¹.

Kardiovaskulární onemocnění (KVO), zvláště ischemická choroba srdeční (ICHS) a infarkt myokardu (IM) stojí na prvním místě v pořadí příčin celkové morbiditity a mortality v České republice. V pozadí naprosté většiny případů ICHS a IM je koronární ateroskleróza. V době před nástupem padesátky trpí ve vyspělých zemích aterosklerózou téměř všichni muži. U žen v reprodukčním věku je riziko poměrně nízké, protože estrogen udržuje nízkou hladinu cholesterolu. Po menopauze se však ateroskleróza může velice rychle vyvinout. A to ještě před 100 lety byla tato nemoc vzácnou a neprobádanou chorobou.

Její příčinou je změna životního stylu lidí ve vyspělých státech. Je typické, že se lidé méně pohybují, kouří, stresují se a přijímají potravu bohatou na tuky a s vysokým obsahem cholesterolu. Lidé, kteří chtějí snížit riziko vzniku aterosklerózy by měli především omezit nasycené tuky, přestat kouřit a zařadit do svých denních programů pohyb. Nasycené tuky by měli nahradit mono- a polynenasycenými, čerstvým ovocem a zeleninou. Je dokázáno, že v zemích, kdy byla veřejnost dostatečně informována o rizikových faktorech aterosklerózy, a pacienti uposlechli rady lékařů, úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění klesla².

Ovšem, ateroskleróza je složitý proces a stále musíme objevovat nové a nové souvislosti ve vztahu k ní. Do tohoto složitého děje zasahuje celá řada faktorů, z čehož vyplývá, že ještě neznáme všechny možnosti, jak ji ovlivnit. Proto je nutné věnovat ateroskleróze a její léčbě pozornost na všech úrovních výzkumu, jak v rovině experimentální – preklinické, tak klinické. Naším cílem by mělo být stále hlouběji poznávat jak ateroskleróze předcházet, včas ji detekovat, efektivně léčit a omezit tak její následky.

Proto také tato rigorózní práce byla zaměřena na sledování změn exprese vybraných markerů u myšího modelu aterosklerózy po podávání dnes již klinicky dobře známého atorvastatinu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rizikové faktory aterosklerózy

Aterosklerózy je považována za multifaktoriální onemocnění, proto je vznik této nemoci zpravidla důsledkem současného působení více rizikových faktorů najednou. Vyskytne-li se u jedince několik rizikových faktorů současně, jejich efekt se nesčítá, ale násobí.

Rizikové faktory můžeme rozdělit na neovlivnitelné a ovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné patří věk, u mužů je to nad 45 let a u žen nad 55 let. Větší náchylnost k onemocnění mají muži než ženy, zřejmě díky protektivnímu efektu estrogenu u žen. Genetické faktory rovněž patří významným neovlivnitelným rizikům, hlavně pokud se v rodinné anamnéze u příbuzného 1. stupně vyskytne nemoc u muže do 55 let věku a u ženy do 65 let. Osobní anamnéza je významný rizikový faktor pro svůj další průběh³. Mezi nejrizikovější ovlivnitelné faktory patří diabetes mellitus, arteriální hypertenze, kouření cigaret a hyperlipidemie⁴.

Hyperlipidemie. Asi 75% cholesterolu je v krvi vázáno v LDL částicích a ateroskleróza úzce souvisí se zvýšenými hodnotami LDL. Defekt LDL receptorů vede velmi časně k ateroskleróze⁵. Dalším možným rizikovým faktorem se zdá být apolipoprotein(a). Apo(a) se podobá plazminogenu a soutěží s ním o vazbu na plazmin a tím zasahuje do fibrinolýzy. Působí proto antifibrinolyticky a tím trombogenně. Souvislost s aterosklerózou však potvrdily jen některé studie⁵.

Hypertenze se podílí na vzniku aterosklerózy zejména zvýšenou tvorbou volných radikálů a taky zvýšenou hladinou angiotenzinu II a endotelinu-1⁶.

Kouření zvyšuje riziko úmrtí následkem koronární aterosklerózy na 1,4 až 2,4násobek (i slabé kouření), u silných kuřáků je zvýšeno až na 3,5násobek. Příčiny nejsou úplně objasněny, může to být způsobeno vytěsněním O₂ na hemoglobinu CO, alterací produkce oxidu dusnatého (NO), zvýšenou přilnavostí trombocytů a propustností endotelu, způsobenou látkami obsaženými v kouři⁷.

Diabetes mellitus je metabolické onemocnění, proto se u něj na vzniku aterosklerózy může podílet více faktorů jako např. snížení hladiny HDL současně s vyšší hladinou Lp(a) a VLDL, zvýšená glykace kolagenu a oxidace LDL částic⁸.

Mezi další ovlivnitelné rizikové faktory patří: porucha glukózové tolerance, inzulinorezistence, hyperinzulinismus, nedostatek tělesné aktivity, hyperhomocysteinemie a trombogenní faktory⁸.

Nejčastější místem výskytu aterosklerotických plátů jsou břišní aorta, koronární tepny, aa. popliteae, vzestupná hrudní aorta, aa. carotis internae a circulus arteriosus cerebri, tzn. místa se zvýšeným průtokem a tlakem krve, tudíž hemodynamický stres je také jeden z rizikových faktorů⁹.

1.2 Ateroskleróza

1.2.1 Definice

Ateroskleróza je chronické degenerativní onemocnění, při kterém se ukládají zejména tukové látky do cévní stěny a tím dochází k patologickým změnám ve vnitřní a střední vrstvě cév.

Cévy postupně ztrácejí pružnost a jejich stěna se ztlušťuje, lumen cévy se zužuje a vznikají tzv. aterosklerotické pláty¹⁰.

1.2.2 Patogeneze aterosklerózy:

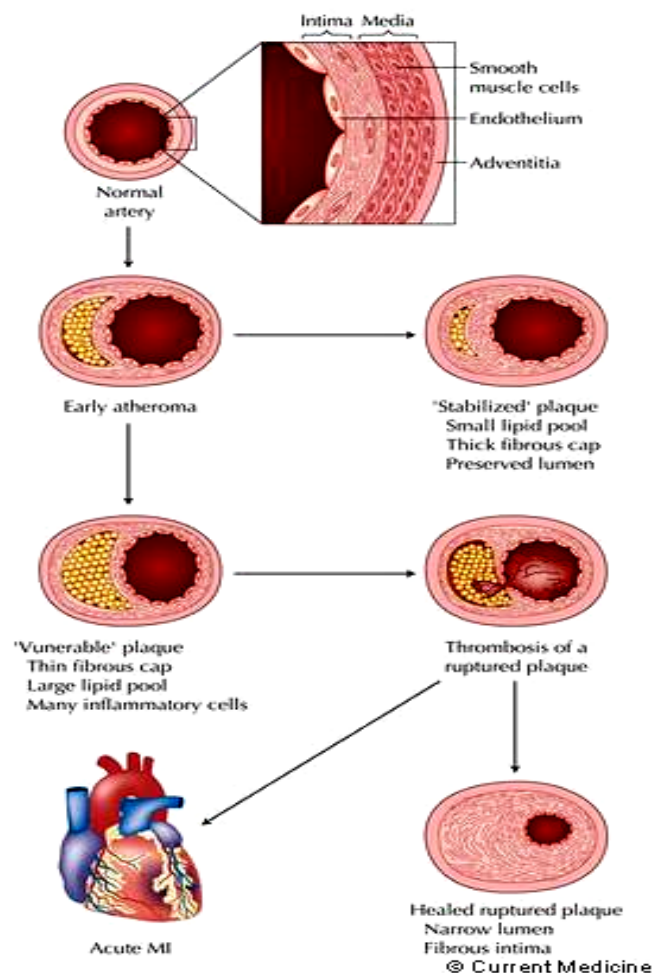
Podle současných vědeckých studií je ateroskleróza formou chronického zánětu, kterého se účastní některé lipoproteiny, makrofágy, T-lymfocyty, endotelové buňky, buňky hladké svaloviny cév a případně i další buněčné elementy. Výsledkem zánětlivého procesu je vznik komplexních lézí v cévní stěně, které označujeme jako pláty. Pláty často vyčnívají do průsvitu cévy a způsobují její zúžení. Na aterosklerotickém plátu se směrem do lumen cévy nachází fibrózní kryt. Ruptura plátu a následná trombóza mají za následek akutní komplikace jako srdeční infarkt, mozkové příhody, ischemii končetin s nekrózou či gangrénou anebo vznik dalších patofyziologických stavů vyplývajících z poškození cév na periferii nebo v jiných orgánech¹⁰.

Buněčné procesy při ateroskleróze se (s výjimkou kalcifikace a trombotických jevů) zásadně neodlišují od procesů uplatňujících se při zánětlivě fibroproliferálních chorobách jako je např. jaterní cirhóza nebo revmatoidní artritida. Aterosklerotické léze vznikají jako výsledek série specifických buněčných a molekulových odpovědí na různé endogenní rizikové faktory a potenciální exogenní antigeny. Při těchto odpovědích se aktivují zúčastněné buňky a uvolňují velké množství zánětlivých hydrolytických enzymů, chemokinů, růstových faktorů a jiných cytokinů. Poté následuje akumulace lipidů v buňkách, proliferace hladkosvalových buněk a tvorba vazivové tkáně. Klíčovým dějem při vzniku aterosklerózy je dysfunkce endotelu a subendotelová retence lipoproteinů bohatých na cholesterol¹¹.

Ateroskleróza postihuje zejména velké a střední artérie a to obvykle v určitých predispozičních místech. To jsou nejčastěji větvení, zúžení a ohyby artérií.

I když při vzniku a rozvoji aterosklerózy jde o dlouhodobý vývoj, je možné v něm pozorovat období relativního klidu s obdobími rychlého rozvoje patologického procesu. Rychlost progresu závisí na působení rizikových faktorů. Čím je jich víc, tím dřív se ateroskleróza manifestuje i klinicky. Klinickým projevem postižení koronárních artérií je ischemická choroba srdeční (viz Obrázek č. 1).

Obrázek č. 1: Vývoj sklerotického plátu a jeden z jeho možných klinických projevů

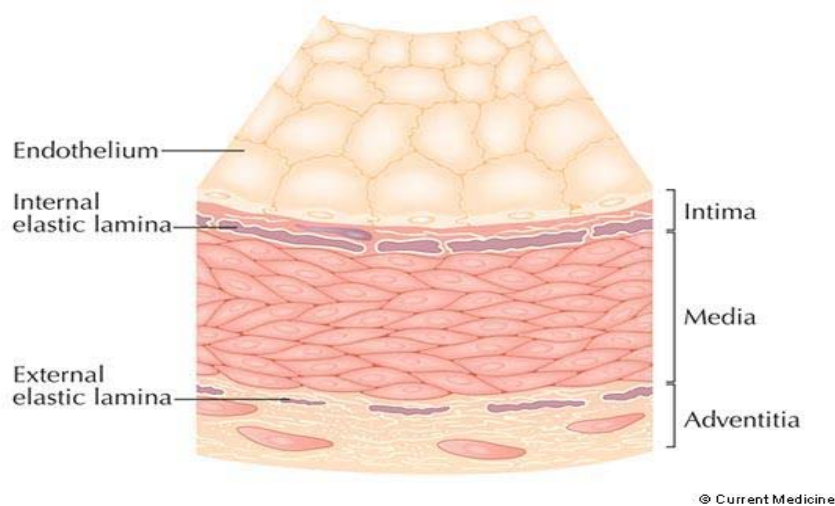


Zúžení karotických a mozkových artérií se manifestuje ischemickým atakem nebo náhlou cévní mozkovou příhodou s poruchou hybnosti a řeči. Klinickým projevem aterosklerózy v periferních tepnách dolních končetin je claudicatio intermittens a kritická končetinová ischemie s klidovými bolestmi, nekrózami a gangrény končetin ¹².

1.2.3 Stavba artérií a jejich změny při ateroskleróze

Stěny krevních cév se obvykle skládají z několika vrstev (viz Obrázek č. 2). Vnitřní vrstvu, tuniku intimu, pokrývá vrstva endotelových buněk. Jsou těsně pospojované a tvoří tak překážku pro samovolný přestup všeho, co se nachází v cévách a tím regulují přestup různých látek a buněk z krevního řečiště do okolního tkaniva. Můžou se nacházet normálním (klidovým) nebo aktivovaném stavu. Buňky v klidovém stavu uvolňují faktory udržující jejich nontrombogenní a neadhezivní povrch. V aktivním stavu uvolňují velké množství různých cytokinů, které se podílejí na průběhu zánětlivých reakcí a imunitních odpovědí¹³.

Obrázek č. 2: Skladba stěny cévní



Pod endotelovou vrstvou se nachází lamina elastica interna. Ta je nejmohutnější ve středních a velkých artériích.

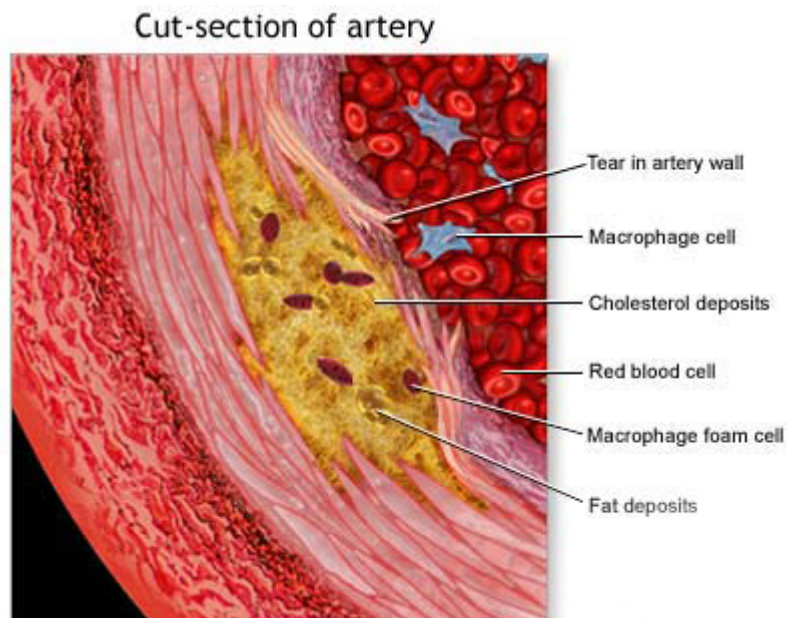
Střední cévní vrstva, tunika media, obsahuje hladkou svalovinu v jedné nebo v několika vrstvách. Mezi hladkosvalovými elementy se nacházejí v různém množství elastická vlákna, kolagenní vlákna a proteoglykany. Zdrojem tohoto extracelulárního materiálu jsou hladkosvalové buňky.

Tunika adventicia tvoří vnější vrstvu cév. Od medie ji odděluje lamina elastica externa. Adventicia se skládá z kolagenových a elastických vláken, hladkosvalových buněk a fibroblastů. Media a adventicia spolu tvoří silnou, elastickou a kontraktlní část cév. Udržují napětí ve stěně cévy tak, aby krevní proud směřoval na periferii do malých cév a kapilár¹⁴.

Při ateroskleróze je možné v cévách pozorovat dva druhy lézí. První pozorovatelnou změnou jsou tukové (lipoidní) proužky. Obvykle vznikají v místech ložiskového zvýšení

obsahu lipoproteinů v intimě. Tato místní akumulace není výsledkem zvýšené propustnosti, ale vazby na makromolekuly extracelulárního matrixu, díky ní zůstávají lipoproteinové částice v intimě déle než obvykle. Tukové proužky jsou prvním stupněm rozvoje aterosklerózy. Je možné pozorovat zhrubnutí intimy a subendotelovou akumulaci buněk s vysokým obsahem lipidů (pěnové buňky). Pěnové buňky jsou většinou makrofágy pocházející z monocytů. Menší část pěnových buněk tvoří hladkosvalové buňky obsahující velké množství lipidů. Tukové proužky jsou nebezpečné v tom, že se mohou dále vyvíjet a progredovat¹⁵.

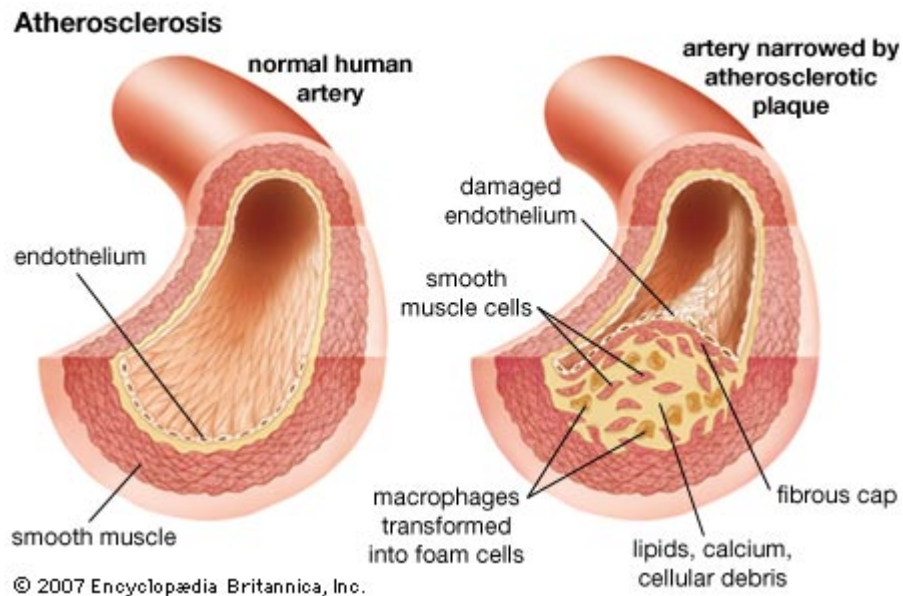
Obrázek č. 3: Průřez cévní stěnou s aterosklerotickými změnami



Fibrózní aterosklerotický plát je pevná bleďošedá vyvýšenina v lumen cévy. Má typickou strukturu (viz Obrázek č.4). Na straně do lumen cévy je fibrózní čepička. Její nesvrchnější část tvoří endotel, pod ním jsou proliferované hladkosvalové buňky, makrofágy, T-lymfocyty, pěnové buňky a extracelulární matrix. Na okrajích jsou nově vytvořené cévní kanálky. Pod fibrózní čepičkou je jádro plátu, které obsahuje nekrotický materiál složený ze zbytků buněčné hmoty, extracelulárních lipidů s cholesterolovými krystalky a menšího množství pěnových buněk¹⁶. V plátu nebo na jeho okraji se mohou tvořit štěrby. Ty bývají místem, kde se začne tvořit trombus. Trombus může ucpat celý lumen cévy nebo se jeho částičky mohou přesunout periferněji, tedy embolizovat. Štěrbiny (fisury) na okraji plátu se

mohou stát místem přestupu krve do nitra plátu. Při jeho ruptuře vzniká aterotrombóza. Přítomnost plátu se rovněž stává základem pro možné vytvoření aneurysma velké cévy.

Obrázek č. 4: Srovnání zdravé artérie a artérie s aterosklerotickým plátem



1.2.4 Příčiny vzniku aterosklerózy

Příčiny vzniku se snaží vysvětlit několik teorií vycházejících zejména se známými rizikových faktorů. Mezi nejznámější teorie patří: teorie odpovědi na poškození endotelu, teorie změněných molekul lipoproteinů, teorie oxidačního stresu, teorie klonové proliferace hladkosvalových buněk a teorie chronické infekce a autoimunitní odpovědi¹⁷.

1.2.5 Funkce endotelu za fyziologických i patologických podmínek

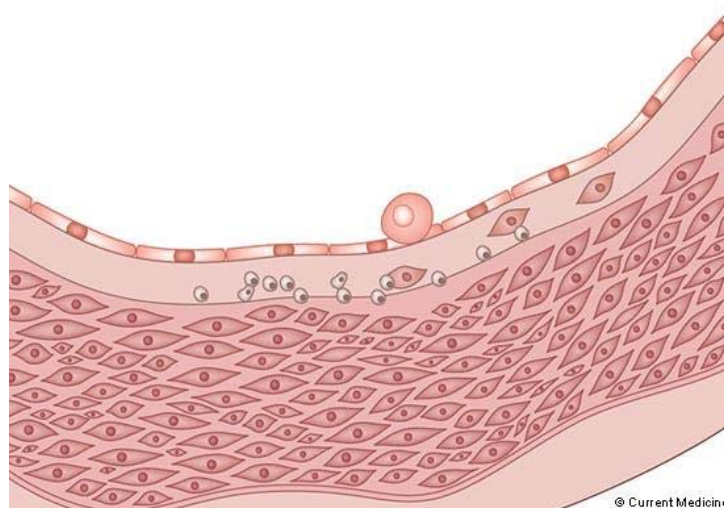
Cévní endotel je metabolicky aktivní endokrinní orgán, který je zdrojem mnoha faktorů a mediátorů regulujících udržování normální hemostázy a homeostázy. Patří sem zejména vasodilatační látky (NO, PG₂), vazokonstrikční látky (endotelin-1, tromboxan A₂, PGH₂), některé složky renin-angiotenzního systému, různé trombogenní a antitrombogenní faktory, fibrinolytické aktivátory a inhibitory, metabolity kys. arachidonové, lysozomové enzymy, volné radikály, adhezivní molekuly, cytokiny a neuropeptidy. Všechny tyto látky

jsou biologicky velmi účinné a proto jich normální (neaktivovaný) endotel tvoří ve fyziologických množstvích a potřebném poměru ¹⁸.

Pokud je endotel v aktivovaném stavu, tak jeho buňky začnou produkovat zvýšené množství mnohých výše zmíněných faktorů např. adhezních molekul (selektiny E a P, ICAM-1, VCAM-1), prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-1, IL-6), chemokinů, volných radikálů a dalších látek nezbytných pro realizaci obranného zánětu a které zároveň mohou vyústit až do poškozující zánětlivé reakce. Proto se předpokládá, že poškození endotelu nebo jeho abnormální aktivita (dysfunkce) může být základní změnou, která navodí vznik a rozvoj aterosklerotického procesu ¹⁹.

Dysfunkci endotelu je možné charakterizovat jako stav jeho poškození nebo abnormální funkce, který může vyvolat kompenzační opatření, ale i těžké poškození cév a okolní tkáně (viz Obrázek č. 5).

Obrázek č. 5: Dysfunkce endotelu - počátek aterosklerotických změn v tepnách



Ke kompenzačním odpovědím dysfunkčního endotelu patří zvýšená adhezivita pro leukocyty a trombocyty, zvýšená propustnost, změna antikoagulačních vlastností na prokoagulační a produkce prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů. Když tato primárně obranná zánětlivá reakce není schopna odstranit vyvolávající agens, pokračuje nekontrolovaně dál, přičemž stimuluje migraci a proliferaci hladkosvalových buněk, které se v místě zánětu promíchají s jinými buňkami. Pokud zánět stále pokračuje stejnou intenzitou, tak stěna artérie zhrubne, postupně se rozšíří, ale lumen zůstává stejný. Tomuto projevu se říká remodelace ¹⁰.

Základními zánětlivými buňkami v aterosklerotických lézích jsou makrofágy pocházející z monocytů a některé subpopulace T-lymfocytů, v počátečních stádiích i proliferující hladkosvalové buňky²⁰.

Všechny faktory vyvolávající dysfunkci endotelu nejsou známé. Předpokládá se, že mezi patří zejména: působení zvýšených koncentrací prozánětlivých cytokinů, růstových faktorů a jiných mediátorů, oxidační stres, některé infekční agens a jejich produkty a některé choroby (hypertenze, diabetes mellitus)²¹.

Oxidační stres vzniká následkem zvýšení množství oxidantů vůči antioxidantům. Výsledkem je poškození buněk jejich struktur v místech nerovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty. Oxidanty jsou látky schopné od jiných látek odebrat elektron nebo elektrony a tím je oxidovat. Patří mezi ně volné radikály s nespárovaným elektronem (superperoxid, hydroxylový radikál), reaktivní molekuly odvozené od kyslíku (peroxid vodíku, kys. chlorná) nebo od dusíku (oxid dusnatý). Antioxidanty jsou látky, které inaktivují nebo omezují působení oxidantů, obzvláště jejich poškozující účinky. Mezi antioxidanty patří např. enzymy, nízkomolekulární látky (tokoferoly, kys. askorbová) a některé proteiny (feritin)⁸.

Oxidanty vznikají v organismu endogenně nebo působením exogenních faktorů. Endogenním zdrojem jsou fyziologické i patologické procesy. Mezi exogenní faktory patří zejména cigaretový kouř, ionizující záření, ultrafialové světlo, ozón a mnohé xenobiotické metabolity léčiv²².

Mnohé z těchto oxidantů mohou vyvolat dysfunkci endotelu buď jeho přímým poškozením, případně aktivací zánětu, anebo nepřímo prostřednictvím oxidace LDL a jiných fosfolipidů. Oxidované fosfolipidy aktivují mnoho genů zánětu, stimulují adhezní a prokoagulační aktivitu endotelu. Kromě toho se stávají autoantigeny a tím aktivují imunitní systém proti sobě. Výsledkem je nejen iniciace, ale i podpora rozvoje aterosklerózy.

Reaktivní intermediáty kyslíku jsou schopné aktivovat NF-κB transkripční faktor, jehož přítomnost se zjišťuje v aterosklerotických lézích a který spouští transkripci mnoha genů zánětu v endotelových a hladkosvalových buňkách. Dalším účinkem reaktivních intermediátů kyslíku může být snížení vasodilatační schopnosti odstraňováním NO, který produkují endotelové buňky, stimulace proliferace hladkosvalových buněk a aktivace zánětlivého procesu prostřednictvím zvýšené tvorby prozánětlivých cytokinů a adhezních molekul zúčastněnými buňkami²³.

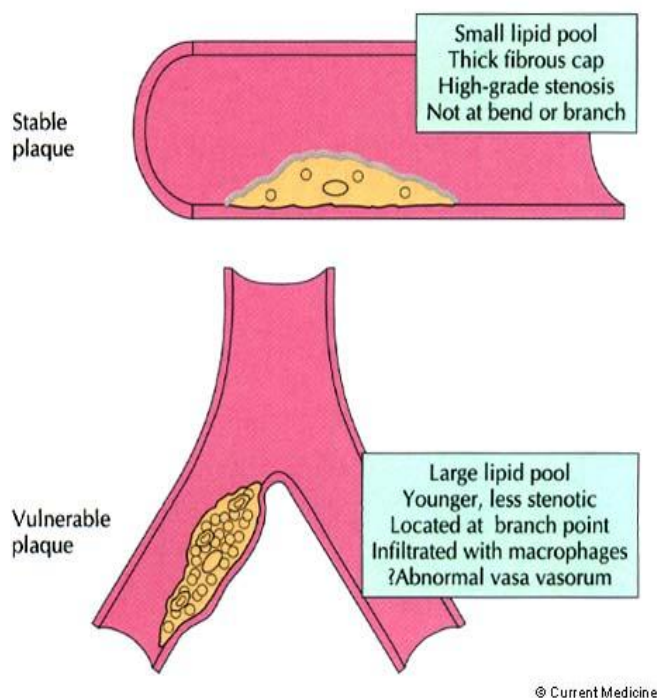
1.2.6 Ruptura plátu a mechanismy působící při ruptuře nestabilních plátů

Nestabilní aterosklerotický plát může být příčinou různých forem nestabilní anginy pectoris, akutního infarktu myokardu nebo náhlé srdeční smrti. Ruptura aterosklerotického plátu je vždy doprovázena tvorbou trombu. Tvorba trombu nad aterosklerotickým plátem je proces primárně závislý na trombocytech a plazminu. Trombocyty adherují do míst ruptury plátu (oblasti bez cévního endotelu) a jsou rychle aktivovány prostřednictvím tkáňového faktoru a jiných mediátorů uvolněných z plátu. Nejdůležitějšími mediátory jsou Willebrandův faktor, trombin a kolagen. Současně s aktivací trombocytů dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin²⁴.

Vytvořený aterotrombotický plát zužuje průřez artérie, což má za následek lokální zvýšení rychlosti průtoku krve zúženým místem. Za stenózou naopak dochází ke zpomalování toku krve v důsledku rozšiřování průřezu artérie. Pokud je ukončení plátu dostatečně strmé, potom se v tomto místě začnou tvořit turbulence. Z popsaných jevů vyplývá, že na plát nepůsobí po celé jeho ploše stejný tlak a to může mít negativní dopad na jeho stabilitu.

Ruptura plátu vzniká následkem zvýšení zranitelnosti plátu (viz Obrázek č. 6), což může záviset na velikosti a konzistenci ateromatózního jádra, tloušťce a integritě fibrózní čepičky, zánětlivých změnách ve fibrózní čepičce, snížení odolnosti fibrózní čepičky vůči místním hemodynamickým stresům a také na lokalizaci plátu²⁵.

Obrázek č. 6: Srovnání stabilního a zranitelného plátu



Zvětšení objemu nekrotického jádra negativně působí na stabilitu plátu. Pokud jádro tvoří více jak 40% obsahu plátu, považujeme plát za nestabilní. Stabilita rovněž úzce souvisí s hladinou lipidů a jejich oxidačních produktů v cirkulaci.

Fibrózní čepička je struktura bránící trombogenní jádro vůči hemokoagulačnímu systému. Ztenčení tloušťky fibrózní čepičky vzniká porušením rovnováhy mezi produkcí a degradací kolagenu. Kolagen je zodpovědný za odolnost plátu vůči vnitřnímu napětí stěny cévy a také vůči tlaku krve v ní. Jeho produkce zase závisí na množství a aktivitě hladkosvalových buněk. Aktivitu těchto buněk regulačně ovlivňují mediátory zánětu, jako $\text{IFN-}\gamma$, který v nich inhibuje tvorbu kolagenu. $\text{IFN-}\gamma$ současně aktivuje makrofágy na uvolňování metaloproteináz, které odbourávají kolagen, proteoglykany a elastin v mezibuněčné hmotě. Při zeslabování fibrózní čepičky působí i další proteázy a antiproteázy. Výsledek závisí na posunutí jejich vzájemné rovnováhy. Z antiproteáz jsou nejdůležitější ty, které patří do skupiny serinů²⁶.

Nicméně základní příčinou snížení tvorby kolagenu a ztenčení fibrózní čepičky je snížený počet hladkosvalových buněk. Tloušťka fibrózní čepičky je různá v různých částech plátu. Nejtenčí většinou bývá v hraniční oblasti, kde plak přechází do okolní intimy. Ruptura se nejčastěji vyskytuje právě v této nejzranitelnější části plátu.

V hraniční oblasti nestabilních plátů se aktivují také žírné buňky, které sekretují proteolytické enzymy. Tyto enzymy dodatečně zvyšují proteolytickou kapacitu matrixových metaloproteináz.

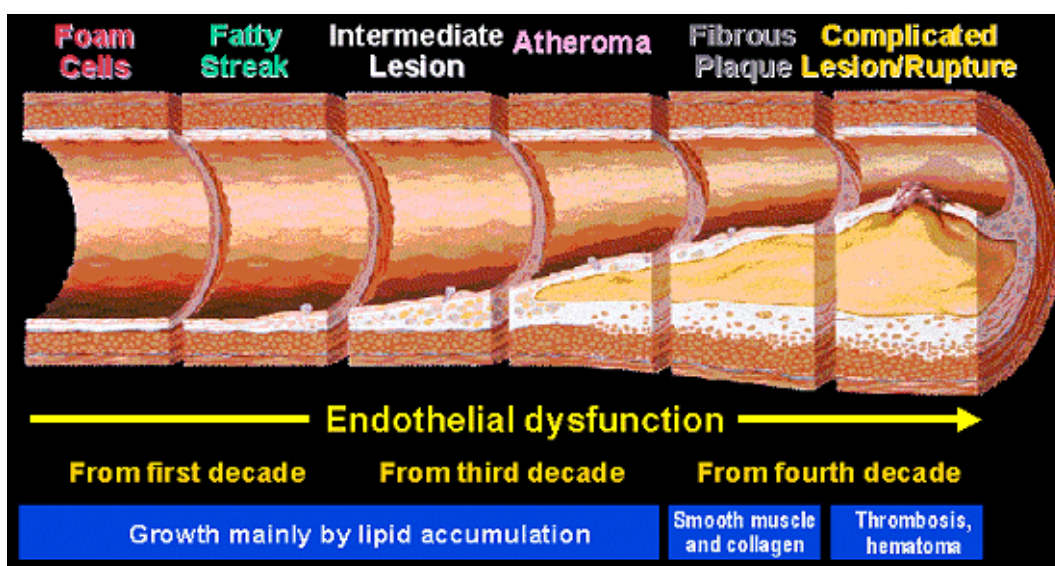
Místo ruptury nemusí vždy souhlasit s místem největšího napětí fibrózní čepičky, ale může se vyskytnout v místě maximální aktivace makrofágů nebo v důsledku tření kalcifikované části s okolní nekalcifikovanou částí fibrózní čepičky při změnách tlaku. Na stabilitu plátu působí negativně náhlé opakující se změny krevního tlaku (z hypertenze do hypotenze), změny lokálního proudění krve v místě stenózy a přechod krve do širšího průsvitu cévy²⁷.

Spasmus cévy způsobí zmenšení průměru cévy a teoreticky sníží vnitřní napětí působící na plak. Vnější komprese však může stlačit plak a způsobit jeho rupturu. Spasmus také úzce souvisí s funkcí endotelu. Paradoxní vasokonstrikce při fyzické zátěži může být spouštěcím mechanismem ruptury.

Patofyziologickým mechanismem uzávěru cévy je kombinace ruptury plátu, trombózy v místě ruptury a vasokonstrikce. Výskyt ruptury může být závislý i na vnějších faktorech jako je hladina katecholaminů a jejich fluktuace během dne a ročního období, v důsledku fyzické zátěže a psychosociálních stresů. Zvýšená hladina katecholaminů způsobuje zvýšení krevního tlaku, zvýšení pulzace průtoku, vasokonstrikci a aktivaci trombocytů.

V trombotických segmentech koronárních artérií se zjistily dva odlišné typy ruptury plátů. Podstatou prvního z nich jsou hluboké trhliny přecházející přes fibrózní čepičku až do jádra bohatého na lipidy. Tato forma umožňuje krvi vstoupit do lipidového jádra, čímž se rychle rozšíří původní trhlina. Trombogenní materiál se dostává do lumen artérie, což vede k vytvoření masivního trombu. To ve většině případů vede úplné trombotické obstrukci artérie²⁸.

Obrázek č. 7: Vývoj aterosklerotických změn v cévě vedoucí až k ruptuře plátu



Druhým typem ruptury je povrchová eroze. Vyskytuje se v oblasti endotelového obnažení plátu, jež zůstává intaktní. Vznikají tak přepážkovité neokluzivní a na trombocyty bohaté tromby, typické pro pacienty s méně těžkými koronárními syndromy. Tyto tromby jsou potenciálním zdrojem embolizace distálního koronárního řečiště.

V mnohých případech trombóza po ruptuře plátu probíhá subklinicky. Často se opakující subklinické ruptury plátů, trombózy a hemoragie do plátu tvoří pravděpodobně patofyziologický mechanismus akcelerované aterosklerózy. Klinické důsledky masivní trombózy po ruptuře plátu jsou závislé na lokalizaci plátu, závažnosti a délce trvání totální okluze a také na přítomnosti kolaterální cirkulace. Detekce nestabilních plátů je jedním z cílů klinické medicíny²⁹.

1.2.7 Biomarkery zánětu a ateroskleróza

V rozsáhlých klinických studiích byl ověřen význam mnohých ukazatelů imunitního systému, popisujících zánětovou odpověď, jako biomarkerů s prediktivní vahou určující klinické komplikace aterosklerózy. Z mnohých vybíráme zvýšené hladiny prozáněťových cytokinů (IL-6, IL-1, IL-18, TNF), látek uvolňovaných degranulací buněk zánětu (myeloperoxidáza, metaloproteinázy), solubilní formy regulačních membránových molekul (sCD40L), solubilní formy adhezních molekul leukocytů i endotelových buněk (sVCAM-1, P-selektin, E-selektin, ICAM-1), fibrinogen či adipokiny nebo leptin³⁰.

Uvedené biomarkery jsou tvořeny různými buněčnými typy, které se podílejí na patogenezi aterosklerózy. Zdrojem nejsou pouze buňky imunitního systému, ale i jiné buněčné typy např. endotelové buňky, buňky hladké svaloviny a především hepatocyty. Právě játra jsou nejvýznamnějším zdrojem bílkovin akutní fáze. Ty se zde tvoří po ovlivnění prozáněťovými cytokiny, zvláště IL-6. Z bílkovin akutní fáze má nepochybně největší význam sérový C-reaktivní protein (sCRP). Ten je v každém ohledu nejvýznamnějším markerem aterosklerózy. C-reaktivní protein je totiž prokazatelný v aterosklerotických plátech, kde se váže na chemicky modifikované LDL lipoproteiny. Svou vazbou stimuluje aktivaci komplementové kaskády a zesiluje akumulaci monocytárních elementů. Navíc CRP snižuje tvorbu oxidu dusnatého v endotelových buňkách a zesiluje tvorbu chemokinů v buňkách hladké svaloviny a endotelových buňkách. Pokusem bylo prokázáno, že infuze CRP dobrovolníkům indukuje výrazné prozáněťové a protrombotické aktivity. Z těchto údajů

vyplývá, že případná neutralizace biologických vlastností CRP by mohla mít terapeutický potenciál³¹.

1.2.8 Genetická dispozice

Charakteristiky každého jedince jsou určovány jeho genetickou dispozí podmíněnou polymorfismem mnohých genů. Genová proměnlivost určuje spolu s vlivem vnějších podmínek i konečnou individuální imunitní reaktivitu. Zaměříme se na přehled důsledků genetické proměnlivosti receptorů TLR na vznik a rozvoj aterosklerózy. Nejvíce je známo o substituci kyseliny asparagové za glycin (D299G) v molekule pro TLR-4. Osoby s polymorfismem D299G mají snížené riziko rozvoje aterosklerózy. Je u nich prokazatelná nižší schopnost produkovat prozáněťové cytokiny, např. IL-6, ale i fibrinogen a solubilní adhezní molekulu sVCAM-1³².

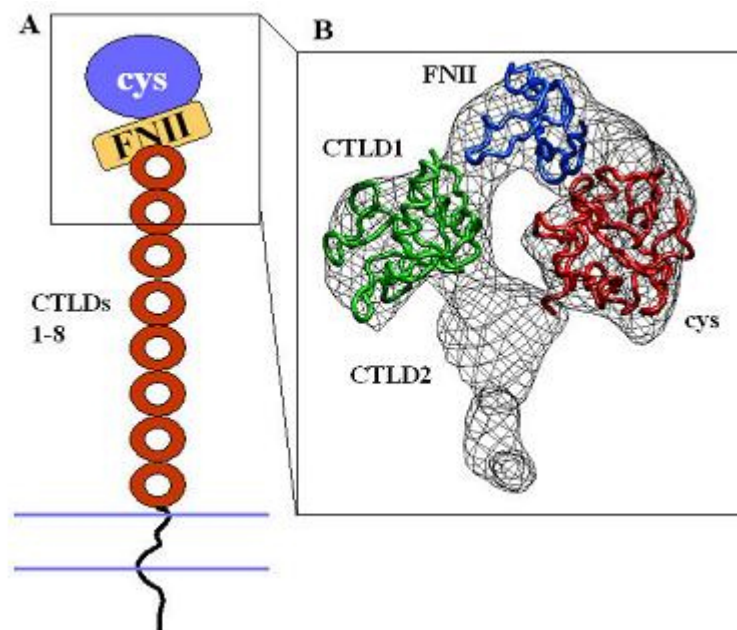
Problematika polymorfismu receptorů TLR, ale také polymorfismu v genu pro molekuly IgG je v kardiologii studována mimořádně aktivně. Získané výsledky poskytují další doklady pro hypotézu, že na aterosklerotický proces je třeba pohlížet jako na záněťový proces, který může být indukován infekčními podněty i mnohými podněty neinfekční povahy. Na rozvoj záněťového procesu ústícího v aterosklerózu mají nepochybně zásadní vliv především signální systémy přirozené imunity. U disponovaných lidí bude zřejmě možné předcházet rozvoji onemocnění například důslednou eliminací infekčních agens s potenciálním podílem na imunopatogenezi aterosklerózy. Možné je rovněž ovlivnění manipulací s jejich lipidovým metabolismem a záněťovou reakcí, např. pomocí statinů. Působení statinů je mimořádně pleiotropní. Kromě ovlivnění lipidového metabolismu mají i výrazné imunomodulační účinky. Ovlivňují jak složky přirozené, tak specifické imunity³³

1.3 Endoglin

Endoglin (CD105) je 180 kDa velký glykoprotein s homodimerickou membránou (viz Obrázek č. 8). Je silně exprimován lidskými endoteliálními buňkami. Účastní se angiogeneze, kardiovaskulárního vývoje a regulace cévní homeostázy³⁴.

Bylo zjištěno, že gen kódující endoglin je rozhodujícím faktorem u cévních obtíží známých jako vrozená hemoragická telangiectasie typu 1 (HHT1) (³⁵). HHT je autozomálně dominantní cévní dysplazie. Je doprovázená častou epistaxí, krvácením z GITu, telangiectasií a arteriovenózními malformacemi v mozku, plicích a játrech. Mechanismus působení endoglinu v procesu angiogeneze a remodelace cév není přesně znám, ale pravděpodobně souvisí s transformujícím růstovým faktorem β (TGF- β). Tato souvislost vyplývá z toho, že endoglin je funkční komponentou membrány receptorového komplexu TGF- β a zároveň je to substrát pro fosforylaci zprostředkovanou TGF- β receptorem ³⁶. Signalizaci indukce pomocí TGF- β a dalších příbuzných členů této superrodiny se regulují různé druhy lidských chorob včetně rakoviny, fibrózy, vývojových vad a kardiovaskulárních patologií ³⁷. TGF- β signalizaci zahájí ligand indukující tvorbu heteromerního komplexu typu I a typu II serin / threonin kinázových receptorů (T β RI a T β RII), což zpustí aktivní přesun této Smad rodiny proteinů směrem k jádru ³⁸.

Obrázek č. 8: Struktura endoglinu



Spojením endoglinu s T β RII a T β RI (ALK1 a ALK5) je regulována Smad signalizace a také buněčné odpovědi k TGF- β ³⁹. Endoglin tudíž reguluje signální transdukcí TGF- β 1. Zesílení indukce je realizováno prostřednictvím ALK1/Smad1 a zeslabení prostřednictvím ALK5/Smad3 ³⁹. Endoglin také zlepšuje ALK5/Smad2 signalizaci ⁴⁰. Naopak, u endoglin deficientních myši se ukázalo, že TGF- β /ALK5 signalizace z endoteliálních buněk

k sousedním mezoteliálním buňkám je defektní, což dokazuje snížená fosforylace Smad2. Nedávno bylo zjištěno, že endoglin reguluje jak na NO závislou vazodilataci, tak i expresi a aktivitu eNOS⁴¹. Navíc, NO vzniklý na základě eNOS hraje zřejmě ústřední roli v endoglin dependentní angiogenezi a v expresi regulované pomocí COX-2⁴¹. Role endoglinu při ovlivňování cévního tonu byla sledována porovnáváním NO-dependentní vazodilatace u myši s Eng +/- a jejich příbuzných z vrhu s Eng+/+⁴¹. Koncentrace dusitanů v plazmě a moči byla nižší u myši s Eng +/- než u Eng+/+ myši. Hladiny eNOS v ledvinách a stehenních artériích byly asi poloviční u Eng +/- než u Eng+/+ myši a zároveň tyto hladiny byly sníženy i při primární kultivaci aortálních endoteliálních buněk u Eng +/- myši ve srovnání s Eng+/+. Mimoto, zvyšování exprese endoglinu nebo naopak její snižování indukuje v kultivovaných buňkách výrazné zvýšení nebo snížení eNOS v proteinových hladinách⁴². Mechanismy působení endoglinu na regulaci eNOS exprese sice nejsou dostatečně vysvětleny, ale v některých novějších pracích se prokázalo, že endoglin stupňuje eNOS expresi pomocí zvyšující se hladiny Smad proteinů, čímž roste TGF- β dependentní indukce eNOS v endoteliálních buňkách. Endoglin tedy zvyšuje eNOS expresi stimulovanou přes TGF- β 1⁴².

Dále studie dokazují, že zvýšení exprese TGF- β 1 vede u některých druhů myši ke zvýšení vazodilatace. Tato TGF- β dependentní vazodilatace byla silně snížena u Eng +/- myši, což dokazuje význam endoglinu v tomto procesu.

Endoglin up-reguluje eNOS expresi v transkripční hladině v přítomnosti i v nepřítomnosti exogenního TGF- β v endoteliálních buňkách. Endoglin dependentní indukce eNOS je zprostředkována typem I TGF- β receptoru ALK 5 a jeho spodním substrátem Smad 2 (Inoue et al., 1995). Účinek endoglinu na eNOS expresi vysvětlují endoglin dependentní TGF- β hladiny. Zajímavé je, že mechanismus, kterým endoglin indukuje TGF- β /Smad2 signalizaci, můžeme brát při stoupajících hladinách Smad2 proteinu jako následek stupňující se Smad2 stability. Bylo objeveno, že na růstu proteinových hladin Smad2 se sekundárně podílí rostoucí asociace Smad2 s receptorovým komplexem, vyšší hladiny Smad2 fosforylace a růst heteromerického komplexu Smad2/Smad4. TGF- β zodpovídá za regulaci hladin Smad2 proteinu.

Pokusy prováděné v několika studiích dokazují, že endoglin indukuje stupňující se ALK5/Smad2 signalizaci³⁶. A naopak, endoglin dokáže inhibovat ALK5/Smad3 signalizaci v endoteliálních buňkách³⁹. Důležitým faktem také je, že aktivita genových promotorů je i v dalších buňkách velmi závislá na Smad3⁴⁰. Přitom Smad2 nebo Smad3 se liší v regulaci těchto genů. Tudíž Smad2 a Smad3 deficitní myši představují rozdílné fenotypy.

Při celkovém shrnutí výsledků studií je patrné, že endoglin stupňuje proteinové hladiny Smad2 zesílením TGF- β signalizace. Rovněž ovlivňuje růst eNOS exprese v endoteliálních buňkách, z čehož vyplývá, že má zásadní roli při fungování kardiovaskulárního systému.

1.4 NOS (nitric oxide synthases)

Asi před 10 lety byl rozpoznán biologický zdroj NO u savců. Stalo se tak díky klonování a následné charakterizaci tří isoform syntáz oxidu dusnatého. Jsou to isoforma uNOS, iNOS a eNOS⁴³. V následujících desíti letech bylo napsáno velké množství literatury popisující role NO v důležitých molekulárních, buněčných a fyziologických pochodech. NOS enzymy vytváří NO katalytickým slučováním L-argininu s molekulárním kyslíkem a jejich následnou redukcí pomocí NADPH⁴⁴.

V souvislosti s procesem NOS a NO samotným byl popsán rostoucí počet fyziologických pochodů, ale i některých patologických okolností. Můžeme zde zahrnout například apoptózu, abiogenezi, peristaltiku, močení, reprodukci, hojení kožních poranění, kontrakci kosterních svalů, uvolňování Ca²⁺ ze sarkoplazmatického retikula, metabolismus glukózy, aktivaci žírných buněk a vývoj srdce. Důležité je, že souhrn biologických efektů NO tvoří tři isoformy. Vyskytují se v různých místech buňky a pod kontrolou odlišných podněcujících signálů vznikají velmi komplexní a složité děje⁴³.

Byla prokázána jasná role NO primárně vznikajícího z eNOS. NO se podílí na regulaci cévního tonu a tím následně ovlivňuje i homeostázu krevního tlaku a tkáňovou perfuzi⁴⁵.

1.4.1 eNOS

Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS nebo NOS3) je rozhodujícím regulátorem kardiovaskulární homeostázy, remodelace cév a angiogeneze. Porucha této syntázy vede k různým typům patologických změn v cévách (Kawashima and Yokoyama, 2004). Oxid dusnatý (NO) vzniklý díky endoteliální syntáze (eNOS) funguje jako endogenní vazodilatační molekula, která reguluje tonus krevních cév a která rovněž zajišťuje antitrombotické, antiproliferativní a antiapoptické prostředí v cévní stěně²³. K tomu, aby se dalo porozumět

změnám v produkci cévního NO, je třeba objasnění mechanismů a faktorů určujících expresi a aktivitu eNOS za rozdílných fyziologických a patofyziologických podmínek. Exprese eNOS je regulována extracelulárními podněty jako je smykové napětí, estrogeny, hypoxie a růstové faktory ⁴⁶.

Endoteliální konstitutivní NOS je hlavní isoformou NOS exprimovanou v kardiovaskulárním systému. Zatímco eNOS exprese je situována hlavně do cévního endotelu a hraje důležitou roli v regulaci cévního tonu a tkáňové perfuze, tato isoforma je exprimována také ve velkém množství jiných typů buněk. Regulace aktivity eNOS je komplexní. Rychlá regulace probíhá přes reverzibilní, nekovalentní, Ca-dependentní vazbu s kalmodulinem, následná pomalejší regulace zahrnuje i další mechanismy jako je indukce kluzových senzorů, post-translační targeting ve sklípcích a fosforylaci serinu, threoninu a (nebo) tyrosinu. Tyto údaje vyzdvihují ústřední roli eNOS při udržování cévního tonu, při účasti na oběhové fyziologii a na regulaci krevního tlaku. Také reprezentují integraci různých stimulačních signálů ⁴⁴.

1.5 Statiny

O statinech toho jistě bylo již mnoho napsáno a ještě více řečeno. Jsou nejužívanějšími léčivými přípravky ze skupiny hypolipidemik a atorvastatin je dokonce nejprodávanější molekulou na celém světě ⁴⁷. Jsou to hypolipidemika s největším účinkem na snížení LDL cholesterolu (20-60%) a mají nejvíce důkazů v ovlivnění kardiovaskulární mortality a morbidity. Navíc také zvyšují HDL cholesterol o 10-30% ⁴⁸. Ukázalo se, že léčba statiny chrání před infarktem myokardu i ty pacienty, kteří mají normální hladinu cholesterolu v plazmě, a u nichž protektivní působení nemůže být založeno na snížení hladin lipidů ⁴⁹.

Statiny jsou účinné kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu – 3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-koenzym A reduktázy (HMG-CoA reduktázy). Tím je zabrzděna syntéza cholesterolu na počátku metabolického řetězce. Deficit cholesterolu v játrech vede k vzestupu počtu receptorů pro LDL na povrchu buněk a následnému zvýšenému vychytávání cholesterolu z plazmy. Statiny také vedou k inhibici syntézy apolipoproteinu B v játrech a snižují sekreci lipoproteinů s vysokým obsahem triglyceridů ⁵⁰. Jejich předností je velmi dobrá tolerance a dnes už i ekonomická dostupnost.

Statiny jsou rovněž známé svými pleiotropními účinky. Kromě přímého účinku na lipidový metabolismus se uplatňuje zřejmě i účinek na endotel, účinek antiagregační a antiproliferační. Patrný je i účinek protizánětlivý ⁵¹. V posledních letech se zkoumají i další účinky statinů. Patří mezi ně např. snížení cytotoxicity a onkoprotektivní účinek navozený apoptózou některých typů nádorových buněk. Statiny také omezují tvorbu trombů a tím snižují riziko tromboembolické nemoci, mění aktivitu enzymů podílejících se na tvorbě anuloиду β a příznivě tím ovlivňují průběh Parkinsonovy choroby ⁵². Podle mnohých studií se rovněž ukazuje, že statiny mají protektivní vliv na vznik Alzheimerovy choroby. Mechanismus tohoto působení není zatím zcela objasněn. Může k tomu docházet ovlivněním cholinergního systému prostřednictvím snížení syntézy ApoE ⁵³.

Statiny jsou ale rovněž léky, které mohou mít závažné komplikace. Opatrnosti je třeba dbát zejména při kombinaci s jinými léky jako jsou fibráty, niacin, cyklosporin, erytromycin a itraconazol. Zvyšují také plazmatické koncentrace kumarinů ⁵⁴. Jejich riziko můžeme omezit správnou indikací, opatrností při užívání s fibráty či jinými léky. Nezbytná je pravidelná kontrola jaterních testů a u pacientů se symptomy svalového postižení také kreatin kinázy. Při dodržování těchto pravidel efekt statinů vysoce převyšuje jejich riziko ⁵⁵.

Jak už bylo zmíněno, že atorvastatin je nejprodávanější molekulou na celém světě. Studie CARDS s atorvastatinem prokázala snížení incidence infarktu myokardu u diabetiků 2. typu o 37% a mozkových příhod o 48% během tříletého sledování ⁵⁶. Díky pleiotropním účinkům se zkoumá vliv atorvastatinu i u dalších indikací např. v prevenci diabetické retinopatie. Zdá se, že účinek atorvastatinu by byl jistě velmi výhodný v prevenci diabetické retinopatie, ale autoři studie se raději z opatrnosti odvolávají na nutnost provedení větších prospektivních studií, ve kterých by se tento zajímavý účinek definitivně ověřil ⁵⁷. Jelikož je atorvastatin tolik používán v léčbě, zkoumají se i jeho další možné interakce s jinými léky ⁵⁸.

Celkově lze tuto kapitolu uzavřít tím, že statiny mají esenciální význam v léčbě pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a jsou rovněž nezbytné u léčby pacientů s metabolickým syndromem. Při dodržení optimální léčby a zabránění interakcí s jinými léky efekt statinů vysoce převyšuje jejich riziko.

1 Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi endoglinu a jeho případnou kolokalizaci s eNOS v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficientních myší. Dále jsme chtěli zjistit, jak jsou tyto proteiny ovlivněny podáváním atorvastatinu.

2 Experimentální část

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15–20 gramů, byly zakoupeny v Taconic Europe (Dánsko) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

2.1 Zvířata a předepsaná dieta

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21 % tuku (11 % nasycených mastných kyselin) a 0,15 % cholesterolu.

Obě skupiny byly krmeny experimentálními dietami po dobu 8 týdnů. Každá z myší byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a bylo provedeno usmrcení předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

2.2 Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

2.3 Imunohistochemie

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na cévách získaných z geneticky modifikovaného kmene myši. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru vážící 15-20 gramů.

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese endoglinu byla použita metodika avidin-biotin s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci. Pro detekci kolokalizace endoglinu a eNOS byla použita fluorescenční mikroskopie.

Primární protilátky

Pro detekci exprese endoglinu v cévní stěně jsme použili pro světelnou i fluorescenční mikroskopii stejnou monoklonální protilátku: Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) ve zředění 1/100 (Pharmingen, USA). Pro detekci eNOS byla použita primární protilátka Rabbit polyclonal to eNOS ve zředění 1:100 (SantaCruz Biotechnology, Inc., USA).

Sekundární protilátky

Jako sekundární protilátka byla pro světelnou mikroskopii použita monoklonální protilátka Goat Anti-Rat IgG (Vector Laboratories). Pro fluorescenční barvení byly použity

protilátky zelená goat anti-rat (CY2) a červená goat anti-rabbit (CY3).

Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) a dále digitální černobílou kamerou VDS Vosskuehler CD-1300QB za pomoci softwaru LUCIA verze 5.0 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika).

Pracovní postup - ABC systém

Tkáňové řezy byly přeneseny na sklíčka předem upravená v roztoku želatiny. Po oschnutí (60 minut) se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v minus 20°C. Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Po patnáctiminutovém usušení se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa třicetiminutovou inkubací s 10% roztokem goat séra (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo) v PBS. V další fázi byly na sklíčka napipetovány roztoky anti-avidinu a anti-biotinu, které zablokovaly reaktivitu těchto látek v myší tkáni.

Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut) a dále do 3% H₂O₂ (15 minut).

Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy 30 minut inkubovaly s biotinylovanou sekundární protilátkou Goat Anti-Rat IgG (Vector Laboratories) a opět se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). V další fázi byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories).

K vizualizaci navázané protilátky se použil chromogen DAB (DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xyleny (10:1) (3 minuty), aceton-xyleny (1:10) (3 minuty) a v xyleny (3 x 2 minuty). Na závěr byla sklíčka zamontována do Eukittu.

2.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie.

Plochy exprese endoglinu byly kvantifikovány pomocí stereologických metod ⁵⁹. Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μ m (0,385 mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé imunohistochemické barvení byl vybrán náhodně, a pak se vybral každý jedenáctý řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 200 průsečíků mezi body sítě a aterosklerotickým plátem na jednu cévu ⁶⁰. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$\text{estA} = a * P,$$

kde parametr a charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a P je počet průsečíků mezi body testovací sítě a aterosklerotickou lézí.

2.5 Statistická analýza

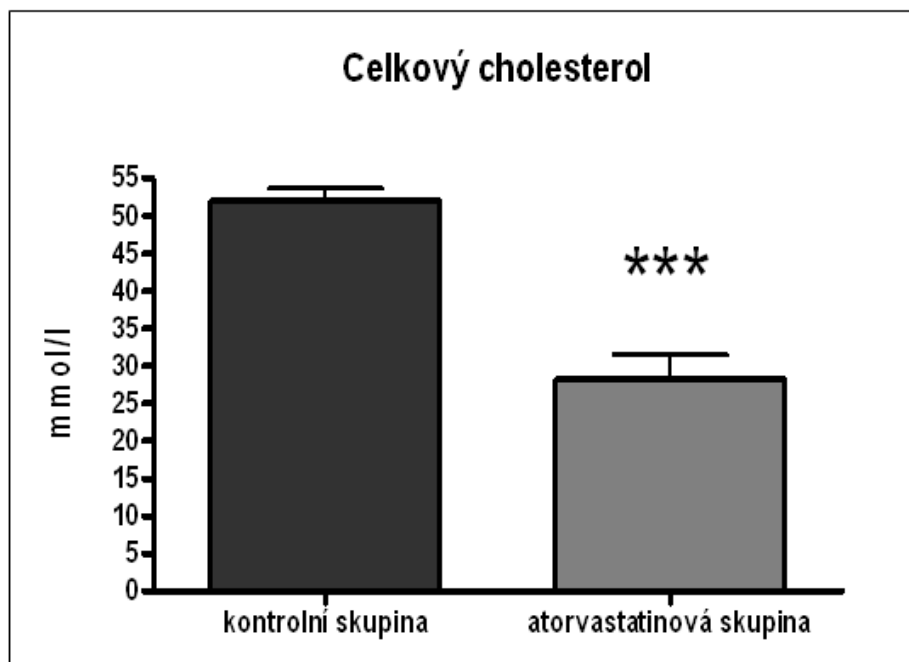
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u atorvastatinové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 4.0).

3 VÝSLEDKY

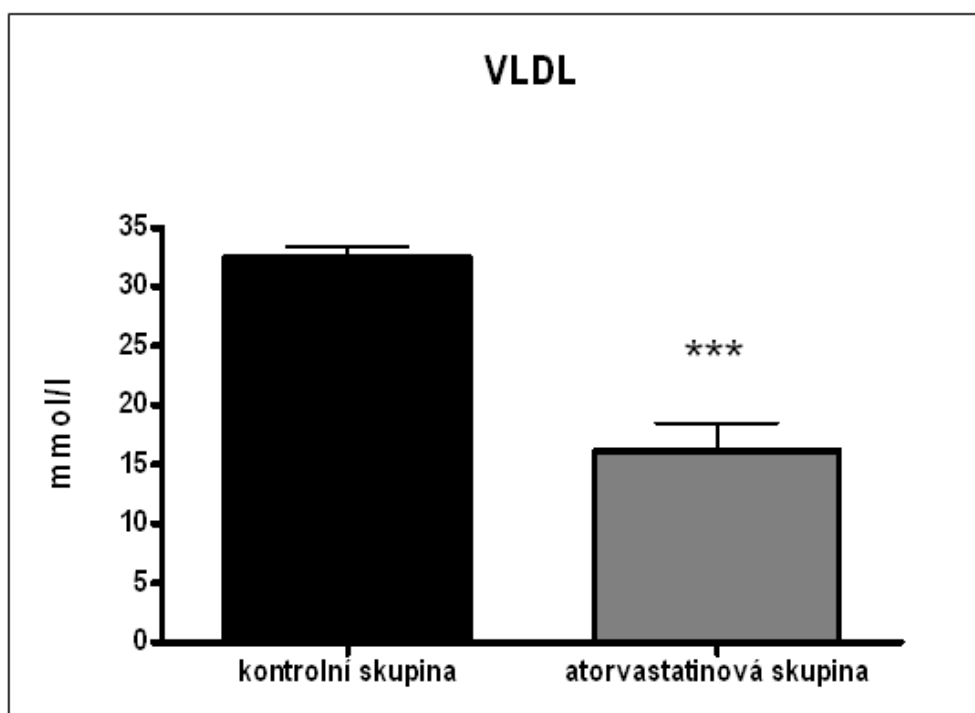
3.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL a TAG (viz. obr.2-4;6). Navíc bylo zjištěno, že atorvastatin také zvýšil hladiny HDL cholesterolu (viz. obr.5).

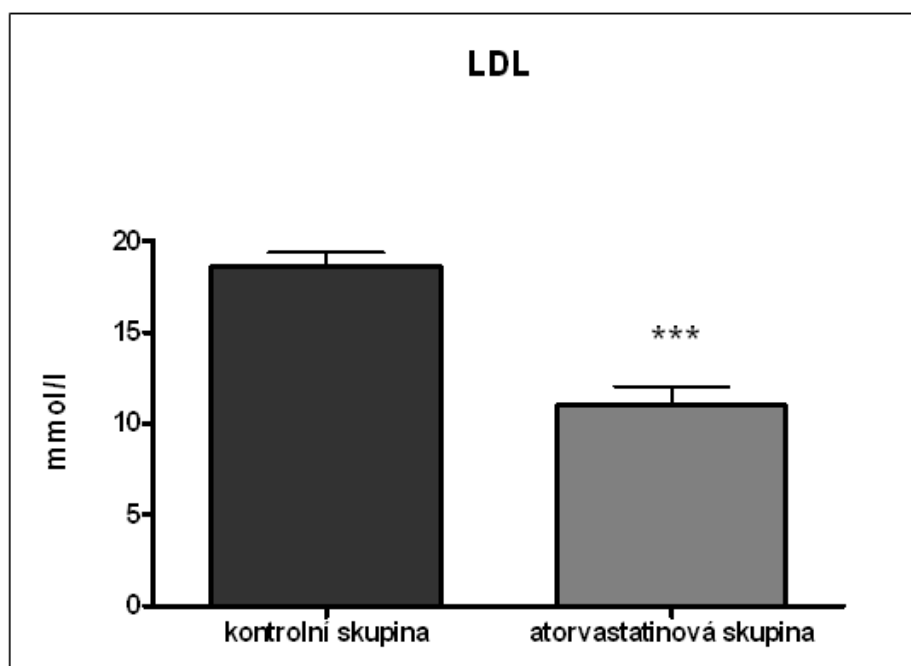
Obr. 2: Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ($^{xxx}P \leq 0,001$).



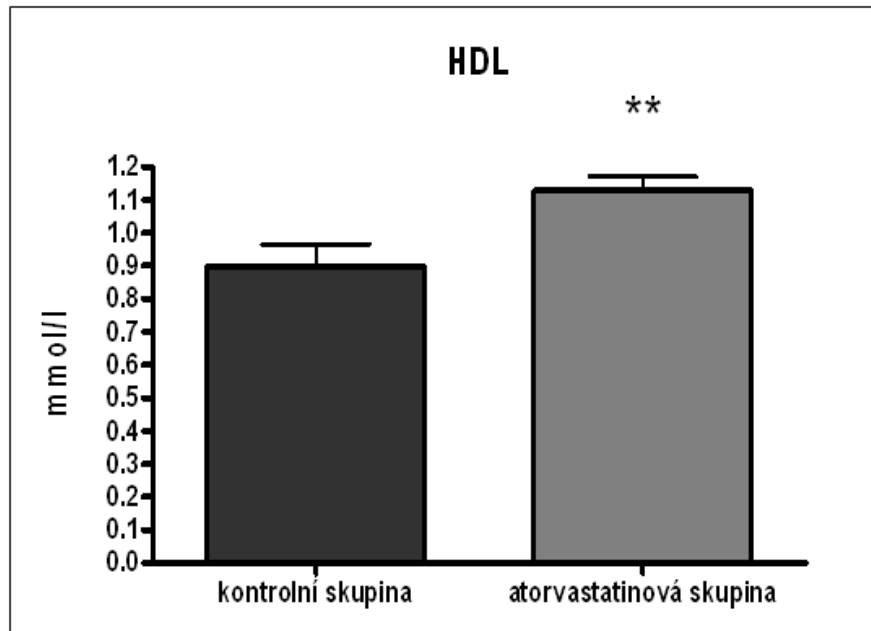
Obr. 3: Hladiny VLDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ($xxxP \leq 0,001$).



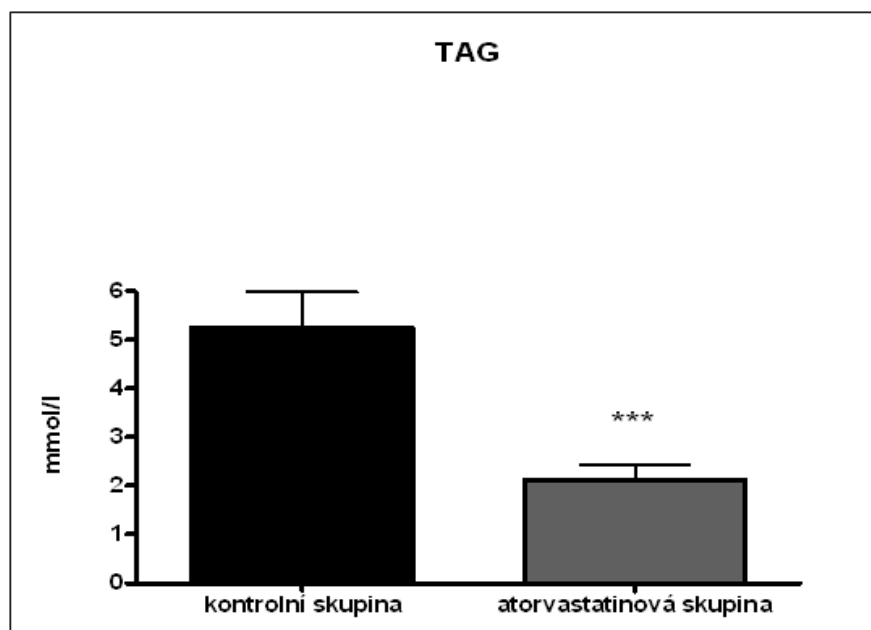
Obr. 4: Hladiny LDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ($xxxP \leq 0,001$).



Obr. 5: Hladiny HDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny HDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ($xxP \leq 0,05$).



Obr.6: Hladiny triacylglycerolů u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou. ($xxxP \leq 0,001$).



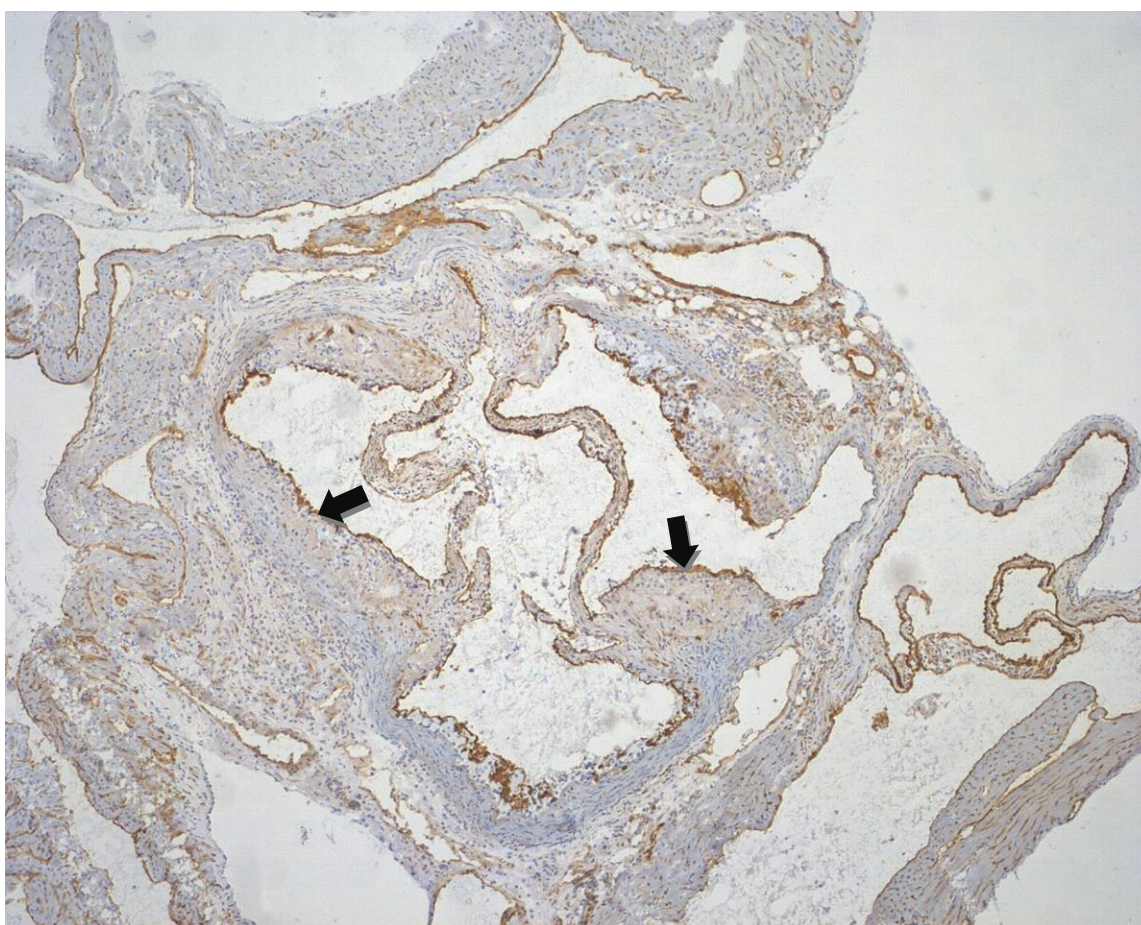
Imunohistochemická analýza

3.1.1 Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu

Expres endoglinu byla pozorována hlavně v cévním endotelu, a to jak v oblasti aorty, tak u menších cév a kapilár v okolním myokardu. U velkých aterosklerotických plátů byla exprese endoglinu na několika místech pozorována i v aterosklerotických plátech. (viz obr. 10 a 11).

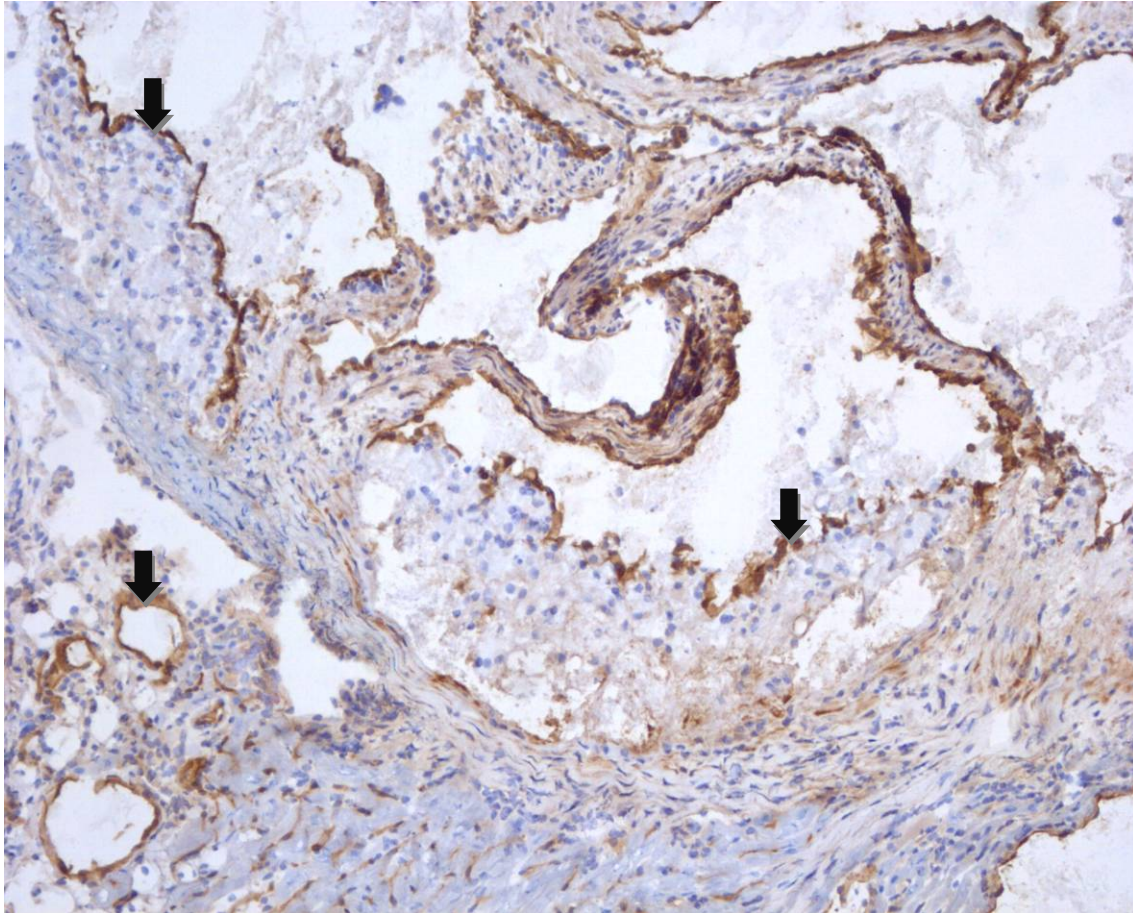
Obrázek: Imunohistochemické barvení endoglinu.

Expres endoglinu je detekována na endotelu aorty a také v menších cévách a kapilárách okolního myokardu. Šipky ukazují na endoteliální expresi v aortálním sinu. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšeno 40x.



Obrázek: Imunohistochemické barvení endoglinu.

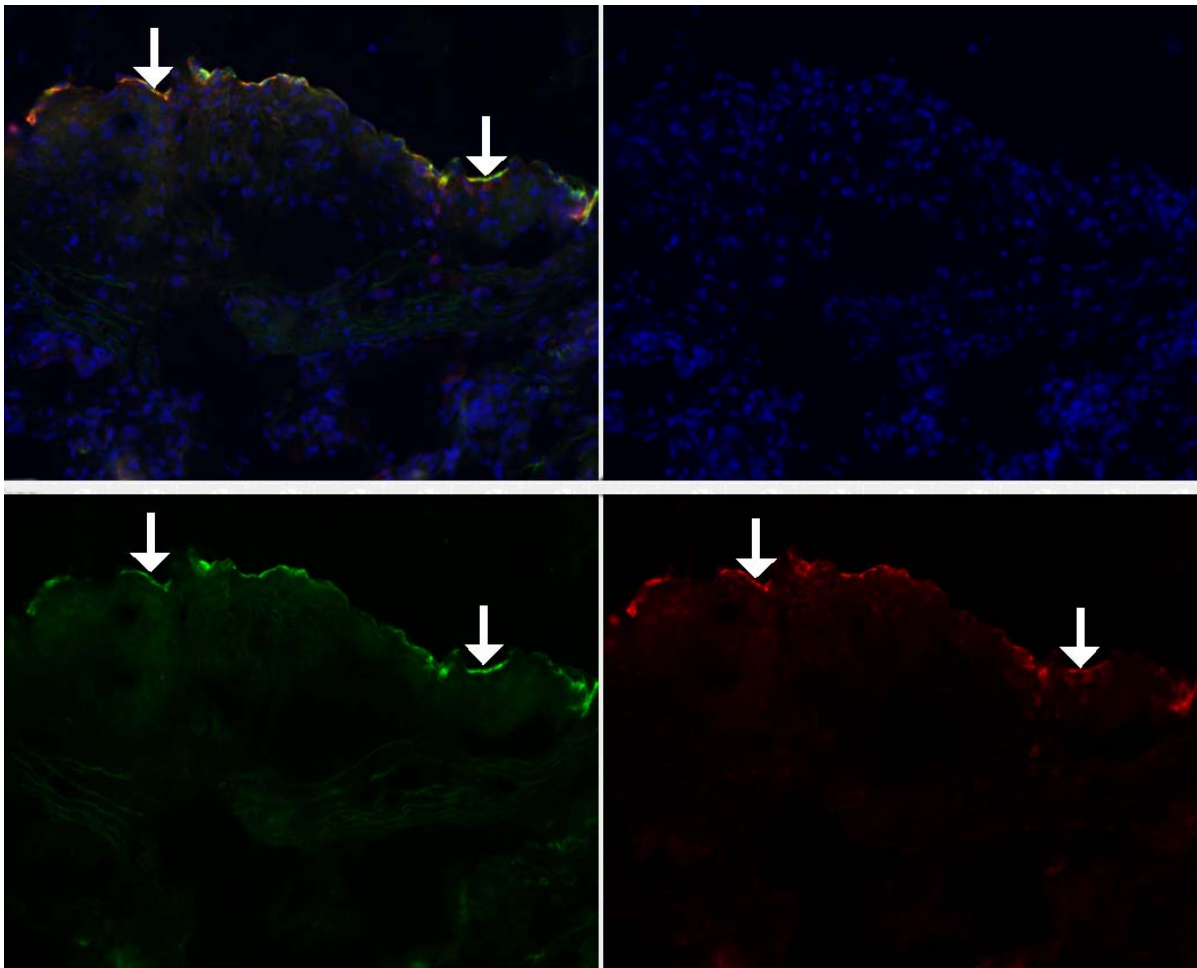
Na detailu cévní stěny můžeme pozorovat endoteliální expresi endoglinu lokalizovanou zejména na povrchu aterosklerotického plátu (šipky). Další expresi vidíme v okolním myokardu. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšení 100x.



3.1.2 Fluorescenční imunohistochemické barvení endoglinu a eNOS v oblasti aortálního sinu

Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme vizualizovali expresi obou markerů, endoglinu a eNOS (viz obr. 10 a 11). Výsledky prokázaly silnou kolokalizaci obou proteinů pouze na cévním endotelu aorty na povrchu aterosklerotického plátu.

Obrázek x. Kolokalizace endoglinu a eNOS v aortálním sinu. Fluorescenční imunohistochemie prokázala kolokalizaci exprese endoglinu (zelená barva) a eNOS (červená barva) pouze na povrchu aterosklerotického plátu v aortě u obou skupin myší. Hoechst (modrá barva) byl použit k detekci buněčných jader. Zvětšení 100x.



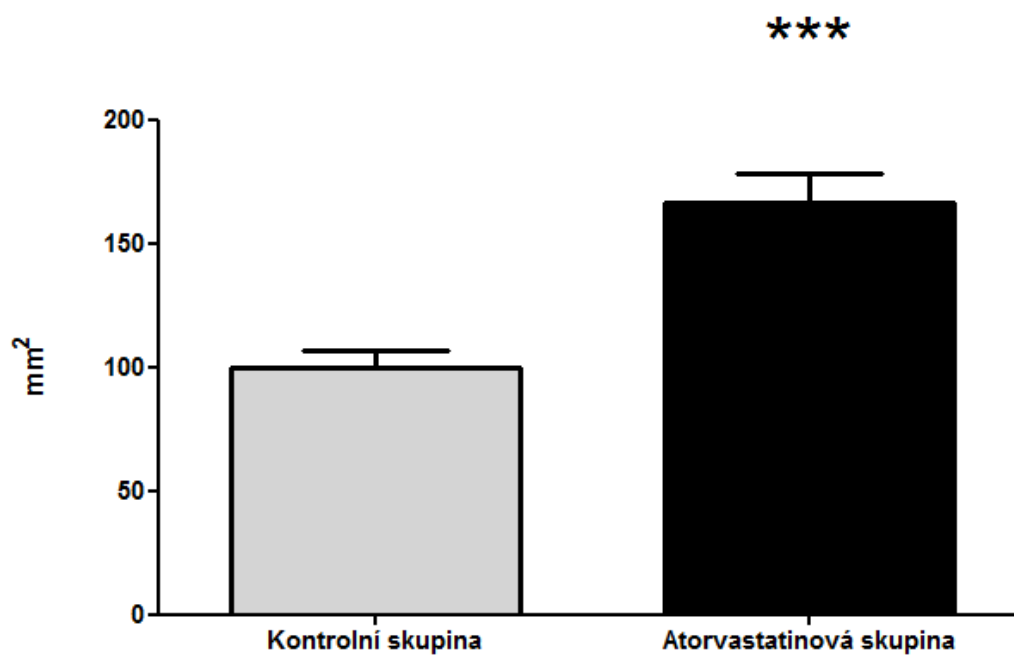
3.2 Stereologická analýza exprese endoglinu a eNOS v aortálním sinu.

3.2.1 Stereologická analýza exprese endoglinu

Stereologická analýza exprese endoglinu v oblasti aortálního sinu prokázala statisticky významný nárůst exprese endoglinu po podávání atorvastatinu. (Obr. 12)

Graf: Stereologická analýza exprese endoglinu

Stereologická analýza exprese endoglinu v oblasti aortálního sinu u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Výsledky ukazují na statisticky významné zvýšení exprese endoglinu u skupiny, které byl podáván atorvastatin ve srovnání s kontrolní skupinou *** $p < 0.001$.

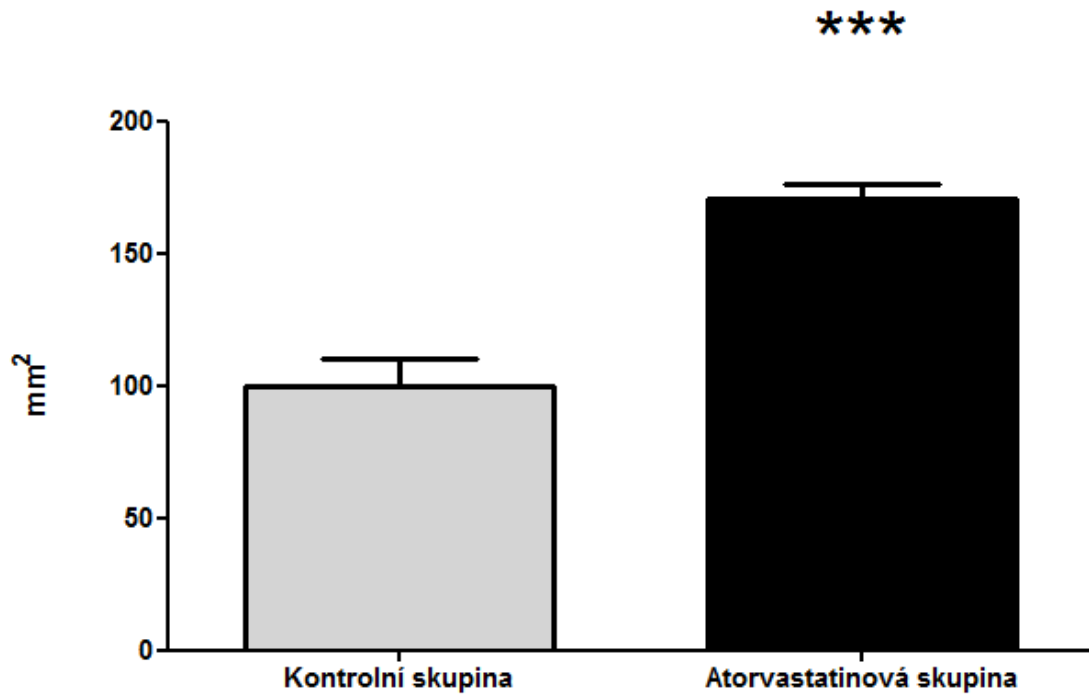


3.2.2 Stereologická analýza exprese eNOS

Stereologická analýza exprese eNOS v oblasti aortálního sinu prokázala statisticky významný nárůst exprese eNOS po podávání atorvastatinu. (Obr. 13)

Graf: Stereologická analýza exprese eNOS

Stereologická analýza exprese eNOS v oblasti aortálního sinu u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Výsledky ukazují na statisticky významné zvýšení exprese eNOS u skupiny, které byl podáván atorvastatin ve srovnání s kontrolní skupinou *** $p < 0.001$.



4 Diskuse

Ateroskleróza je difúzní proces, který začíná v časném dětství, postupně asymptomaticky progreduje a v dospělosti se klinicky manifestuje jako ischemická choroba srdeční, ischemické poškození centrálního nervového systému a periferní cirkulace.

Ateroskleróza je onemocnění velkých tepen, které je charakterizováno akumulací lipidů, přítomností zánětlivých elementů, buněk hladkého svalstva a extracelulární matrix v subendoteliálních vrstvách stěny tepny. Přes řadu pokroků v poznacích o tomto onemocnění zůstávají ateroskleróza a její komplikace vedoucími příčinami morbidity a mortality ve vyspělých zemích.

Centrálním spouštěcím faktorem v rozvoji aterogeneze je dnes považována zánětlivá reakce v cévní stěně, respektive rozvoj endoteliální dysfunkce, která je primárně charakterizována snížením produkce NO s následnou převahou proaterogenních faktorů⁶¹.

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky statiny. Statiny (někde uváděny též pod názvem vastatiny) jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktáza). Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením, tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizací ateromatózních plátů aj⁵¹. Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou velmi rozšířeným modelem ke studiu aterosklerózy. Na rozdíl od lidí, myši nemají cholesterylester transfer protein (CETP) a proto kolem 70% celkového cholesterolu se nachází v částech lipoproteinu o vysoké hustotě (HDL). To může být hlavní přispívající faktor k rezistenci k aterogenezi⁶².

Transgenní myši poskytují vynikající příležitost studovat vzájemné ovlivňování genů během aterogeneze. Jako první úspěšně vymazaný gen u myši byl apolipoprotein E (apo E)⁶³. Postupně vznikla celá řada dalších myších modelů s upravenými geny. Například LDL KO myši, což jsou modely s inaktivovaným ligandem pro LDL receptor⁶⁴. Dále pak hepatic-lipase KO myši exprese lidského apo B100 a CETP. Tyto modely vyvíjejí léze všech fází s morfologickými charakteristikami blízké podobnými člověku na stejných místech cévního

stromu. Aterosklerotické léze mají několik společných charakteristických rysů jako u člověka. Apo E-KO myši jsou nejčastěji používané experimentální modely aterosklerózy⁶⁵.

ApoE/LDL receptor deficientní myši vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu, již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik⁶⁶. U těchto myší se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a subklaviálních arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech diety. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneuryzmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly⁶⁷.

Endoglin je člen receptorového komplexu pro transformující růstový faktor beta (TGF- β), ovlivňuje buněčnou odpověď na TGF- β a je absolutně nezbytný pro angiogenní pochody. TGF- β hraje centrální úlohu v regulaci řady buněčných funkcí jako je růst, diferenciace, apoptóza, adheze a motilita, což jsou procesy alterované také u maligní transformace a rozvoje nádorových onemocnění³⁷. Exprese endoglinu převládá na endoteliálních buňkách, makrofázích, fibroblastech a hladkých svalových buňkách medie⁶⁸. Kromě toho bylo demonstrováno, že exprese endoglinu je zvýšena během angiogeneze a při vývoji nádorového onemocnění. Mimoto byla exprese endoglinu zvýšena v hladkosvalových buňkách a endoteliálních buňkách v pokročilých aterosklerotických lézích v prasečích karotidách⁶⁹. Exprese endoglinu byla také popsána v cévním endotelu apoE-deficientních myší⁷⁰.

Dále bylo také popsáno, že exprese endoglinu ovlivňuje expresi endoteliální NO syntázy⁴¹. Je známo, že eNOS je velmi důležitý enzym, zabezpečující produkci NO cévním endotelem. Jeho exprese může být snižována řadou faktorů, které jsou považovány za proaterogenní jako např. oxidované LDL, shear stress, hypercholesterolemie atd.⁴³. Bylo prokázáno, že endoglin deficientní myši produkují menší množství NO a dále, že exprese eNOS je regulována endoglinem *in vitro*⁴².

Z tohoto důvodu jsme sledovali expresi endoglinu v aterosklerotických plátech ApoE/LDL receptor deficientních myší. Cílem bylo popsat expresi endoglinu v aterosklerotických cévách a zjistit jeho případnou kolokalizaci s eNOS. Imunohistochemická analýza prokázala expresi endoglinu na cévním endotelu a endotelu chlopní. Pouze velmi slabá exprese byla pozorována v aterosklerotických plátech. Fluorescenční imunohistochemie prokázala také kolokalizaci endoglinu a eNOS pouze na cévním endotelu aorty na povrchu aterosklerotických plátů. Tyto výsledky tedy naznačují, že tyto endoteliální buňky produkují oba proteiny.

Současná literatura se zatím přiklání k názoru, že endoglin by mohl být spíše proaterogenní faktor, protože jeho exprese stoupá v aterosklerotických plátech^{37, 69, 71}.

Nicméně v této rigorózní práci jsme prokázali, že podávání atorvastatinu vedlo kromě výrazně hypolipidemického efektu a zároveň k nárůstu exprese endoglinu ve stěně cévy. Zároveň byla prokázána také zvýšená exprese eNOS. Tyto výsledky u apoE-deficientních myší jsou v souladu s *in vitro* studiemi, které byly nedávno publikovány, a kde takové zvýšení exprese endoglinu vedlo ke zvýšení exprese eNOS)⁴². Z tohoto důvodu lze říci, že exprese endoglinu je sice velmi výrazná v endotelu aterosklerotických plátů nicméně lze předpokládat jeho pozitivní vliv na endotel a tudíž i na proces aterogeneze. Závěrem lze konstatovat že endoglin může být potenciálním cílem účinku atorvastatinu a zároveň proteinem působícím protektivně na cévní endotel a tudíž antiaterogenně díky zvyšování exprese eNOS a tudíž množství NO.

Otázkou stále zůstává, zda zvýšení exprese endoglinu po podávání statinů je důsledkem jejich hypolipidemického efektu nebo je to záležitost související s jejich pleiotropními účinky. Toto bude předmětem dalších studií.

5 Závěr

Výsledky této diplomové práce prokázaly expresi endoglinu v aterosklerotických plátech v cévní stěně u apoE/LDLR deficientního myšího modelu aterosklerózy.

Exprese endoglinu byla lokalizována na cévním endotelu, a to jak v aortě, tak i v menších cévách a kapilárách okolního myokardu.

Imunofluorescenční analýza dále prokázala kolokalizaci endoglinu a eNOS pouze na cévním endotelu aorty na povrchu aterosklerotických lézí.

Podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg/den vedlo k výraznému hypolipidemickému efektu.

Stereologická analýza exprese endoglinu a eNOS prokázala nárůst exprese obou markerů ve stěně cévy.

Tyto výsledky naznačují, že endoglin může být potenciálním cílem účinku atorvastatinu a zároveň proteinem působícím protektivně na cévní endotel a tudíž antiaterogenně díky zvyšování exprese eNOS a tudíž množství NO.

6 Literatura

- 1 Brasen, J. H. and Niendorf, A., [Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance], *Pathologie*, 1997, 18: 218-227.
- 2 Xu, H. and Chen, K. J., [Inspection on advantage and cut-in point of integrative chinese and western medicine from view of cognitive transition on atherosclerosis], *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2007, 27: 5-7.
- 3 Muntner, P., He, J., Astor, B. C., Folsom, A. R. and Coresh, J., Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study, *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 529-538.
- 4 Mehta, J. L., Saldeen, T. G. and Rand, K., Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease, *J Am Coll Cardiol*, 1998, 31: 1217-1225.
- 5 Pedraza, A., [Hyperlipoproteinemia in the production of atherosclerosis. Risk factors: diagnosis and treatment], *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, 1993, 51: 21-33.
- 6 Goff, D. C., Jr., Brass, L., Braun, L. T., Croft, J. B., Flesch, J. D., Fowkes, F. G., Hong, Y., Howard, V., Huston, S., Jencks, S. F., Luepker, R., Manolio, T., O'Donnell, C., Robertson, R. M., Rosamond, W., Rumsfeld, J., Sidney, S. and Zheng, Z. J., Essential features of a surveillance system to support the prevention and management of heart disease and stroke: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Stroke, and Cardiovascular Nursing and the Interdisciplinary Working Groups on Quality of Care and Outcomes Research and Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease, *Circulation*, 2007, 115: 127-155.
- 7 Hallan, S., de Mutsert, R., Carlsen, S., Dekker, F. W., Aasarod, K. and Holmen, J., Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable?, *Am J Kidney Dis*, 2006, 47: 396-405.
- 8 Shantaram, V., Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension, *Clin Exp Hypertens*, 1999, 21: 69-77.
- 9 Tarbell, J. M., Mass transport in arteries and the localization of atherosclerosis, *Annu Rev Biomed Eng*, 2003, 5: 79-118.
- 10 Sary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W., A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the

- Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association, *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 840-856.
- 11 Chepelenko, G. V., [Pathogenesis of atherosclerosis in patients with lipid metabolism disturbances: hypothesis on cholesterol utilization and atheromatous plaque formation], *Angiol Sosud Khir*, 2003, 9: 20-25.
 - 12 Ryan, S. T., Koteliansky, V. E., Gotwals, P. J. and Lindner, V., Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury, *J Vasc Res*, 2003, 40: 37-46.
 - 13 Schneider, W. and Undeutsch, W., [Uncommon blood vessel tumors of the skin. Clinical picture, pathological anatomy and histology as well as classification], *Hautarzt*, 1967, 18: 437-445.
 - 14 Klika, *Histologie*, Praha, 1986.
 - 15 Velican, C., A dissecting view on the role of the fatty streak in the pathogenesis of human atherosclerosis: culprit or bystander?, *Med Interne*, 1981, 19: 321-337.
 - 16 Raines, E. W. and Ross, R., Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis, *Br Heart J*, 1993, 69: S30-37.
 - 17 Wissler, R. W., Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerosis and the mechanisms of clinical effects, *Arch Pathol Lab Med*, 1992, 116: 1281-1291.
 - 18 Vanhoutte, P. M., Endothelium-dependent responses and inhibition of angiotensin-converting enzyme, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996, 23: S23-29.
 - 19 Cannon, R. O., 3rd, Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium, *Clin Chem*, 1998, 44: 1809-1819.
 - 20 Stary, H. C., Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults, *Arteriosclerosis*, 1989, 9: I19-32.
 - 21 Vanhoutte, P. M., [Endothelial dysfunction and atherosclerosis], *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1997, 90 Spec No 6: 9-19.
 - 22 Fuhrman, B., Volkova, N. and Aviram, M., Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase, *Atherosclerosis*, 2002, 161: 307-316.
 - 23 Sessa, W. C., eNOS at a glance, *J Cell Sci*, 2004, 117: 2427-2429.
 - 24 Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., Fradelizi, D. and Tedgui, A., Inhibition of transforming growth factor-beta

- signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice, *Circ Res*, 2001, 89: 930-934.
- 25 Palinski, W. and Napoli, C., Unraveling pleiotropic effects of statins on plaque rupture, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 1745-1750.
 - 26 Karapanayiotides, T. and Devuyst, G., Fibrous cap thickness and stability of carotid atheromata, *Stroke*, 2006, 37: 2451; author reply 2452.
 - 27 Trostorf, F., Buchkremer, M., Harmjanz, A., Kablau, M., Jander, S., Geiger, K., Schmitz-Rixen, T., Steinmetz, H. and Sitzer, M., Fibrous cap thickness and smooth muscle cell apoptosis in high-grade carotid artery stenosis, *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005, 29: 528-535.
 - 28 Yuan, C., Zhang, S. X., Polissar, N. L., Echelard, D., Ortiz, G., Davis, J. W., Ellington, E., Ferguson, M. S. and Hatsukami, T. S., Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke, *Circulation*, 2002, 105: 181-185.
 - 29 Jensen, L. O., Mintz, G. S., Carlier, S. G., Fujii, K., Moussa, I., Dangas, G., Mehran, R., Stone, G. W., Leon, M. B. and Moses, J. W., Intravascular ultrasound assessment of fibrous cap remnants after coronary plaque rupture, *Am Heart J*, 2006, 152: 327-332.
 - 30 Nylaende, M., Kroese, A., Strandén, E., Morken, B., Sandbaek, G., Lindahl, A. K., Arnesen, H. and Seljeflot, I., Markers of vascular inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease, *Vasc Med*, 2006, 11: 21-28.
 - 31 Egorova, M. O., [Increased serum level of the acute inflammation phase parameter CRP and the high level of low density lipoprotein cholesterol--factors of increased risk of development of atherosclerosis and its complications (a literature review)], *Klin Lab Diagn*, 2002: 3-6.
 - 32 Doherty, T. M., Fisher, E. A. and Arditi, M., TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis, *Trends Immunol*, 2006, 27: 222-227.
 - 33 Krejsek, J., Kunes, P., Andrys, C., Holicka, M., Novosad, J., Kudlova, M. and Kolackova, M., [Innate immunity, receptors for exogenous and endogenous danger patterns in immunopathogenesis of atherosclerosis--part II: TLR receptors,

- significance of genetic polymorphism of danger signals receptors], *Cas Lek Cesk*, 2005, 144: 790-794.
- 34 Ma, X., Labinaz, M., Goldstein, J., Miller, H., Keon, W. J., Letarte, M. and O'Brien, E., 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*, 2000, 20: 2546-2552.
- 35 Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., Husain, M. and Letarte, M., A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia, *Circ Res*, 2005, 96: 684-692.
- 36 Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendia, A., Perez-Alvarez, M. J., Langa, C., Lopez, L. A., Fabra, A., Garcia-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M. and Bernabeu, C., Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts, *Eur J Cell Biol*, 1999, 78: 614-623.
- 37 Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, C. and Vary, C. P., Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques, *Atherosclerosis*, 2000, 153: 323-335.
- 38 Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J. and Bernabeu, C., Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia, *J Mol Biol*, 2007, 365: 694-705.
- 39 Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and Ten Dijke, P., TGF-beta receptor function in the endothelium, *Cardiovasc Res*, 2005, 65: 599-608.
- 40 Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L. M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L. and Bernabeu, C., Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan, *J Biol Chem*, 1998, 273: 33011-33019.
- 41 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., Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation, *Faseb J*, 2004, 18: 609-611.
- 42 Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C. P., Lopez-Novoa, J. M., Attisano, L. and Bernabeu, C., Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling, *J Cell Physiol*, 2007, 210: 456-468.

- 43 Mungrue, I. N., Bredt, D. S., Stewart, D. J. and Husain, M., From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?, *Acta Physiol Scand*, 2003, 179: 123-135.
- 44 Albrecht, E. W., Stegeman, C. A., Heeringa, P., Henning, R. H. and van Goor, H., Protective role of endothelial nitric oxide synthase, *J Pathol*, 2003, 199: 8-17.
- 45 Aikawa, M., Sugiyama, S., Hill, C. C., Voglic, S. J., Rabkin, E., Fukumoto, Y., Schoen, F. J., Witztum, J. L. and Libby, P., Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma, *Circulation*, 2002, 106: 1390-1396.
- 46 Ziegler, T., Silacci, P., Harrison, V. J. and Hayoz, D., Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces, *Hypertension*, 1998, 32: 351-355.
- 47 Kapur, N. K. and Musunuru, K., Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk, *Vasc Health Risk Manag*, 2008, 4: 341-353.
- 48 Calabro, P. and Yeh, E. T., The pleiotropic effects of statins, *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20: 541-546.
- 49 Auer, J., Berent, R., Weber, T. and Eber, B., Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond, *Curr Med Chem*, 2002, 9: 1831-1850.
- 50 McFarlane, S. I., Muniyappa, R., Francisco, R. and Sowers, J. R., Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond, *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 1451-1458.
- 51 Arnaud, C. and Mach, F., Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation, *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005, 98: 661-666.
- 52 Farmer, J. A., Pleiotropic effects of statins, *Curr Atheroscler Rep*, 2000, 2: 208-217.
- 53 Comparato, C., Altana, C., Bellosa, S., Baetta, R., Paoletti, R. and Corsini, A., Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction?, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2001, 11: 328-343.
- 54 LaRosa, J. C., Pleiotropic effects of statins and their clinical significance, *Am J Cardiol*, 2001, 88: 291-293.
- 55 Borges, J. L., [Drug combinations: statins and niacin], *Arq Bras Cardiol*, 2005, 85 Suppl 5: 36-41.
- 56 Hitman, G. A., Colhoun, H., Newman, C., Szarek, M., Betteridge, D. J., Durrington, P. N., Fuller, J., Livingstone, S. and Neil, H. A., Stroke prediction and stroke prevention with atorvastatin in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS), *Diabet Med*, 2007, 24: 1313-1321.

- 57 Ozkiris, A., Erkilic, K., Koc, A. and Mistik, S., Effect of atorvastatin on ocular blood flow velocities in patients with diabetic retinopathy, *Br J Ophthalmol*, 2007, 91: 69-73.
- 58 Pascual Izuel, J. M., Rodilla Sala, E. and Sanchez Juan, C., [Clinical efficacy of ezetimibe and combined use with statins], *Rev Clin Esp*, 2005, 205: 496-498.
- 59 Nachtigal, P., Semecky, V., Kopecky, M., Gojova, A., Solichova, D., Zdansky, P. and Zadak, Z., Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis, *Pathol Res Pract*, 2004, 200: 219-229.
- 60 Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B. and et al., The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis, *Apmis*, 1988, 96: 857-881.
- 61 Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med*, 1999, 340: 115-126.
- 62 Paigen, B., Holmes, P. A., Mitchell, D. and Albee, D., Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H, *Atherosclerosis*, 1987, 64: 215-221.
- 63 Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. and Ross, R., ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree, *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994, 14: 133-140.
- 64 Breslow, J. L., Mouse models of atherosclerosis, *Science*, 1996, 272: 685-688.
- 65 Jawien, J., Nastalek, P. and Korbut, R., Mouse models of experimental atherosclerosis, *J Physiol Pharmacol*, 2004, 55: 503-517.
- 66 Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J. L. and Brown, M. S., 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*, 1994, 91: 4431-4435.
- 67 Hofker, M. H. and Breuer, M., Generation of transgenic mice, *Methods Mol Biol*, 1998, 110: 63-78.
- 68 Obreo, J., Diez-Marques, L., Lamas, S., Duwell, A., Eleno, N., Bernabeu, C., Pandiella, A., Lopez-Novoa, J. M. and Rodriguez-Barbero, A., Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts, *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14: 301-310.

- 69 Behr-Roussel, D., Rupin, A., Simonet, S., Bonhomme, E., Coumailleau, S., Cordi, A., Serkiz, B., Fabiani, J. N. and Verbeuren, T. J., Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits, *Circulation*, 2000, 102: 1033-1038.
- 70 Nachtigal, P., Pospisilova, N., Jamborova, G., Pospechova, K., Solichova, D., Andrys, C., Zdansky, P. and Semecky, V., Endothelial expression of endoglin in normocholesterolemic and hypercholesterolemic C57BL/6J mice before and after atorvastatin treatment, *Can J Physiol Pharmacol*, 2007, 85: 767-773.
- 71 Piao, M. and Tokunaga, O., Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study, *J Atheroscler Thromb*, 2006, 13: 82-89.