

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

*KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD*



# DIPLOMOVÁ PRÁCE



2006

Dalibor Černý

**Velký dík patří PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za významnou podporu  
a pomoc při zpracovávání této diplomové práce.**

**STUDIUM VLIVU  
HYPOLIPIDEMIK NA  
ATEROGENNÍ PROCES  
VE STĚNĚ CÉV U  
EXPERIMENTÁLNÍHO  
MODELU  
ATEROSKLÉRÓZY III.**

# OBSAH

ÚVOD.....	- 5 -
<b>1 FYZIOLOGICKÁ FUNKCE ENDOTELU.....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>2 DYSFUNKCE ENDOTELU.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>3 ATEROSKLERÓZA.....</b>	<b>- 13 -</b>
3.1 RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY .....	- 13 -
3.1.1 Neovlivnitelné faktory.....	- 13 -
3.1.1.1 Věk .....	- 13 -
3.1.1.2 Pohlaví.....	- 13 -
3.1.1.3 Dědičnost.....	- 14 -
3.1.2 Ovlivnitelné faktory .....	- 14 -
3.1.2.1 Výživové faktory .....	- 14 -
3.1.2.1.1 Cholesterol v krvi .....	- 14 -
3.1.2.1.2 Triacylglyceroly v krvi.....	- 15 -
3.1.2.1.3 Cukry a diabetes mellitus .....	- 15 -
3.1.2.2 Faktory mimo výživu.....	- 16 -
3.1.2.2.1 Nedostatek pohybové aktivity – nadváha a obezita .....	- 16 -
3.1.2.2.2 Hypertenze .....	- 17 -
3.1.2.2.3 Kouření.....	- 17 -
3.2 PATOGENEZE ATEROSKLERÓZY .....	- 18 -
<b>4 ADHEZNÍ MOLEKULY.....</b>	<b>- 23 -</b>
4.1 SELEKTINY .....	- 23 -
4.2 INTEGRINY .....	- 23 -
4.3 IMUNOGLOBULÍNOVÁ SKUPINA .....	- 24 -
4.4 KADHERINY .....	- 25 -
<b>5 ENDOGLIN (CD 105).....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>6 APO-E MYŠ JAKO EXPERIMENTÁLNÍ MODEL.....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>7 STATINY V LÉČBĚ HYPERCHOLESTEROLÉMIE.....</b>	<b>- 31 -</b>
7.1 MECHANISMUS ÚČINKU .....	- 31 -
7.2 TERAPEUTICKÝ VÝZNAM STATINŮ .....	- 32 -
7.3 PLEIOTROPNÍ ÚČINKY STATINŮ.....	- 32 -
<b>8 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>- 36 -</b>
9.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA.....	- 36 -
9.2 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	- 37 -
9.3 IMUNOHISTOCHEMIE.....	- 37 -
9.4 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ .	- 39 -
9.5 STATISTICKÁ ANALÝZA .....	- 40 -
<b>10 VÝSLEDKY.....</b>	<b>- 41 -</b>
10.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	- 41 -
10.2 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU.....	- 42 -
10.3 STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE ENDOGLINU.....	- 44 -
<b>11 DISKUSE .....</b>	<b>- 46 -</b>
<b>12 ZÁVĚR.....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>13 SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ .....</b>	<b>- 50 -</b>

# ÚVOD

Ateroskleróza je podle WHO definována jako variabilní kombinace změn intimy artérií spojená s ukládáním lipidů (cholesterolu), polysacharidů a krevních elementů a v dalším vývoji tvorbou fibrózní tkáně provázenou ukládáním vápenatých sloučenin a dalšími změnami v medii artérií. Postihuje velké a střední artérie tvorbou subintimálního ztlustění (ateromu), které může vést k redukci nebo až obstrukci krevního průtoku. (Kornacewicz-Jach 2003)

Z názvoslovného hlediska se vymezují následující pojmy:

- a. **ATEROSKLERÓZA** – tvorba sklerotických plátů (ateromů) ve velkých elastických, ale i muskulárních artériích
- b. **Arterioskleróza** – tvorba ateromů ve velkých elastických artériích
- c. **arterioloskleróza** – aterosklerotické postižení tepének

Podíváme-li se do historie, na počátku 19. století objevil Lobstein příčinu infarktu a zavedl pojem arteriosclerosis = tvrdnutí tepen, později, na konci 19. století Marchand zobecnil tento výraz a zavedl pojem atherosclerosis. Pojem atheroma = kaše zavedl Virchow, který aterosklerózu řadil k zánětům. (Shih et al 1983) Ateroskleróza a její důsledky v organismu, jako infarkt myokardu, cévní mozkové příhody či ischemická choroba dolních končetin, představují jeden z nejrozsáhlejších problémů ve vyspělých zemích a patří tedy k tzv. civilizačním onemocněním. Na počátku 20. století byla v ČR poměrně vzácným postižením, pak ale začal její výskyt prudce stoupat až do dnešní doby, kdy patříme v úmrtnosti na její komplikace na přední místa ve světě. Z hlediska celkové úmrtnosti tvoří kardiovaskulární onemocnění zapříčiněné aterosklerózou přes 50% (vztaženo na Evropu a USA), proto není divu, že lidská společnost investuje do její léčby a jejího studia nemálo, protože celkové částky vynaložené na léčbu následků aterosklerózy mnohonásobně tyto náklady převyšují.

Toho onemocnění je tedy natolik závažné, že postihuje nejen zdraví konkrétního jedince, ale způsobuje komplexní ekonomicko-zdravotně-sociální problém pro každou vyspělou zemi. Proto i já se v této své práci aspoň částečně podílím na celosvětovém výzkumu, když ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd zkoumáme vliv hypolipidemik na expresi vybraných buněčných adhezních molekul ve stěně cévy u experimentálních myších modelů aterosklerózy.

# 1 FYZIOLOGICKÁ FUNKCE ENDOTELU

O endotelu se dlouho dobu myslelo, že je pouhou inertní vrstvou připomínající semipermeabilní celofán, která kryje povrch cévní stěny a zajišťuje její permeabilitu. Krátce poté, co William Harvey objevil krevní oběh v roce 1628, popsal Malphigi systém cévní sítě v těle jako oddělený systém od ostatních tkání. Později v 19. století von Reckingausen prohlásil, že cévy nejsou jen provrtané skulinky skrz tkáň, ale že to jsou samostatné celky utvořené z vlastních buněk. V roce 1896 přichází Starling s teorií kapilárního systému, kde endotel je selektivně propustná bariéra, která je po celý život konstantní ve své propustnosti, která je později roku 1891 doplněna Heidenhahnem, že na endotelových buňkách dochází též k aktivnímu transportu. Na významu přidaly Paladovy histologické studie cévní stěny s využitím elektronového mikroskopu v roce 1953, jakož i fyziologická pozorování Gowana v roce 1959, která jednoznačně prokázala interakce mezi endotelem a lymfocyty. To doslova vyprovokovalo vlnu nejrůznějších dalších studií, díky nimž je dnes endotel viděn jako složitý, dynamický a heterogenní systém umožňující vylučovací, syntetické, metabolické a imunologické funkce. (Fishman 1982)

## **Endotel a permeabilita**

Jednou ze základních funkcí endotelu je zajištění řízené propustnosti mezi krví a okolními tkáněmi. Endotel kontroluje prostup jak pro buněčné elementy, tak pro nebuněčné krevní komponenty. Nebuněčné komponenty využívají pro svou cestu jak paracelulární, tak transcelulární transportní mechanismy.

## **Interakce mezi krevními elementy a cévní stěnou**

Endoteliální buňky obsahují na svém povrchu makromolekuly, tzv. buněčné adhezní molekuly (zkratka CAM cellular adhesion molecules), které napomáhají fyziologické migraci leukocytů skrz cévní stěnu do konkrétních tkání a orgánů. Tato migrace je pak umocněna a zacílena na popud nejrůznějších markerů zánětu např. interleukinů IL-6 či IL-8. V poslední době se ukázalo, že tyto „cévní průchody“ hrají též určitou roli při adhezi trombocytů a erytrocytů.

Volně plovoucí leukocyty a krevní destičky mohou přilnout ke specifickým oblastem endotelu nebo k odhaleným subendoteliálním součástem anebo k sobě

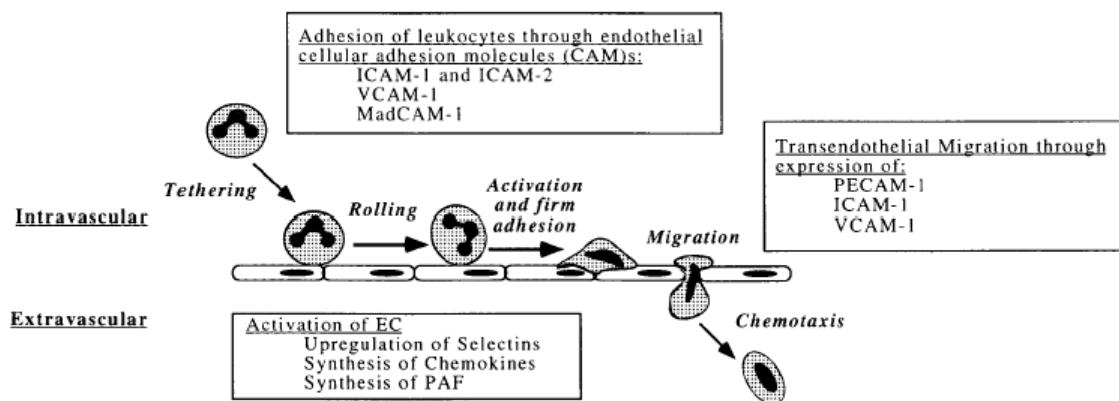
navzájem při imunitním „dozoru“ či zánětlivém procesu. Tyto buněčné interakce jsou nezbytným předstupněm pro spuštění hemostatické kaskády či tzv. fyziologického zánětlivého procesu. Na druhou stranu nekontrolované ulpívání leukocytů a trombocytů na stěně cévní přispívá k rozvoji zánětlivého procesu či trombotizaci.

Průnik se realizuje pomocí buněčných adhezních molekul (viz též kapitolu 5). Proces probíhá převážně v postkapilárních venulách, kde jsou menší unášivé krevní proudy. Oba typy krevních elementů, leukocyty i trombocyty interagují s cévní stěnou resp. buněčnými adhezivními molekulami a pronikají přes ní.

Tento proces zahrnuje několik kroků, které jsou ukázány na obrázku 1.

- (1) aktivace endotelové buňky
- (2) zpomalení pohybu krevních elementů a tzv jejich kutálení
- (3) vytvoření ireverzibilního komplexu adhezní molekula krevní buňka
- (4) transmigrace krevní buňky do intimy cévy

*Obrázek 1. Fyziologická interakce leukocytů s endotelem. Leukocytární adheze a migrace skrz cévní stěnu vyskytující se během zánětu převážně v postkapilárních venulách, kde je nejslabší smykové tření krevního proudu. (Blankenberg et al 2003)*



## Vasoregulace

Endotel neslouží pouze jako prostá bariéra mezi krví a okolní tkání, ale buňky endotelu také samozřejmě produkují mediátory, které mají za fyziologických podmínek vliv na hemodynamiku (viz tabulka č. 1). Buňky endotelu přispívají k regulaci průtoku krve a s ním i ruku v ruce jdoucího krevního tlaku, ať už se jedná o vasodilatační

působky – oxid dusný (NO), PGI<sub>2</sub>, či vasokonstrikční látky – trombocyty aktivující faktor (PAF), endothelin (ET). Tyto chemicky značně odlišné sloučeniny nejsou skladovány v intracelulárních granulích. Jejich biologické účinky jsou zprostředkované díky specifickým receptorům na hladkosvalových buňkách cévy, buď spuštěním rychlé biochemické kaskády, nebo na úrovni genetické transkripce. Oxid dusný je tvořen nepřetržitě, ale jeho produkce je regulována velkým množstvím fyzikálně-chemických podnětů, zatímco ostatní zmíněné mediátory jsou tvořeny primárně v závislosti na změnách vnějšího prostředí. (Mizia-Stec et al 2003)

**Tabulka 1.**

**VASOREGULAČNÍ PŮSOBKY VYTVÁŘENÉ ENDOTELEM**

<b>Působek</b>	<b>Typ sloučeniny</b>	<b>Její prekursor</b>	<b>Hlavní účinek</b>	<b>Ostatní účinky</b>	<b>Způsob sekrece</b>
NO (oxid dusný)	volný radikál	L-arginin	vasodilatace	udržuje bazální cévní tonus; inhibuje adhezi leukocytů, inhibuje adhezi, aktivaci a agregaci destiček a zároveň podporuje jejich desagregaci; inhibuje proliferaci hladkosvalových buněk cévy	<i>parakrinní</i> , deponován v konstitutivní formě, indukovan trombini, ADP, bradykininem, substancí P, muscarinovými agonisty, mechanickým napínáním, cytokiny
PGI <sub>2</sub> (prostacyklin)	eikosanoid	kyselina arachidonová	vasodilatace	blokuje nános krevních destiček a jejich shlukování	<i>parakrinní</i> , indukovan v místech cévní odchylky
PAF (trombocyty aktivující faktor)	fosfolipid	kyselina arachidonová	vasokonstrikce	napomáhá adhezi leukocytů na povrchu endotelu	<i>juxtakrinní</i> , indukovaný
ET-1 (endothelin-1)	peptid tvořen 21 AK	preproendothelin 1 (203 AK)	vasokonstrikce	podporuje proliferaci hladkosvalových buněk cévy, moduluje účinky ostatních působků	<i>parakrinní</i> , indukovaný hypoxií, mechanickým napínáním a ischemií



## **Angiogeneze**

Endotel může zasahovat i do reparativních procesů a angiogeneze. Reparativní pochody v cévní stěně jsou kontrolovány řadou cytokinů. Mezi růstové faktory a cytokiny endoteliálního původu jsou řazeny například transformující růstový faktor beta, fibroblastový růstový faktor, destičkový růstový faktor, interleukin-1 a endotelin-1. Tyto mitogeny stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendoteliálního prostoru z medie s následnou hyperplazií intimy, a hypertrofii cévní stěny. Naopak velmi významným antimitogenem je NO, který inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny a zabraňuje hypertrofii cévní stěny. (Miller & Cappuccio 2002)

## 2 DYSFUNKCE ENDOTELU

Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími, resp. stimulujícími působky. Kromě selektivního zvýšení permeability se projevuje sklonem k vazospasmu, resp. nedostatečnou vazomotorickou odpovědí na endotel-dependentní podnět (někdy dokonce paradoxní vazokonstrikci), tendencí k trombóze a nedostatečnou inhibicí subendoteliální proliferace. Představuje časnou, morfologicky němou fázi aterosklerózy, ale podílí se i na vývoji morfologicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy. Hraje rovněž důležitou roli v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, renálního selhání, komplikací diabetes mellitus, sepse a dalších chorob. (Busse & Fleming 1996)

Existuje řada příčin endoteliální dysfunkce. Většina z nich jsou známé rizikové faktory aterosklerózy. Mezi hlavní příčiny patří arteriální hypertenze, hyperlipoproteinemie (zejména hypercholesterolemie a především zvýšená hladina LDL, přičemž nejnebezpečnější jsou oxidované či glykované LDL), hyperglykemie, hyperinzulinemie, hypoxie, hyperhomocysteinemie, kouření, ionizující záření, cytostatika, stárnutí, imunokomplexy a různé infekce. Je zřejmé, že například u diabetu působí navzájem několik rizikových faktorů, které vznik endoteliální dysfunkce akcelerují. K těmto systémovým faktorům se mohou přidat lokálně působící faktory, jako jsou turbulence krevního toku (bifurkace cévy, její menší fixace k okolí), vrozené nebo získané cévní anomálie či intravaskulární výkony – angioplastika. (Zoccali 2006)

Endoteliální dysfunkce se podílí na vývoji jak časných, tak i pozdních fází aterosklerózy. Sama její přítomnost i bez morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí je dnes akceptovaná jako iniciální fáze aterosklerotického procesu. Dysfunkční endotel umožňuje vyšší průnik aterogenních lipidů. Zvýšenou expresí adhezních molekul a produkcí některých cytokinů usnadňuje také kumulaci monocytů v cévní stěně, jejich přeměnu v makrofágy a pěnové buňky. Nedostatečná produkce NO vede k uplatnění řady růstových faktorů, stimulujících buňky hladkého svalstva k migraci do subendoteliálních prostor a k produkci extracelulárních

vazivových komponent aterosklerotických lézí. Už v těchto fázích, kdy morfologické změny cévy nejsou přítomné, anebo jsou hemodynamicky nevýznamné, se může klinicky manifestovat sklon k vazospasmům, například formou mikrovaskulární anginy pectoris či tranzitorní mozkové ischemie (*amaurosis fugax*).

I v pozdějších fázích endoteliální dysfunkce akceleruje vývoj aterosklerózy. Podílí se na kumulaci makrofágů a pěnových buněk v aterosklerotickém plátu, a prostřednictvím metaloproteináz, které mohou rozrušovat fibrózní čepičku plátu, zvyšuje jeho vulnerabilitu. Nedostatečná produkce NO, prostacyklinu a dalších působků inhibujících adhezi a agregaci destiček, a naopak zvýšená exprese von Willebrandova a tkáňového faktoru navozují protrombogenní stav. Tak může ruptura i hemodynamicky nevýznamného plátu s nasedající trombózou vést k rychlému uzavření tepny zvláště, když endoteliální dysfunkci provází snížená fibrinolýza. K úplnému uzavěru tepny může také přispět už zmíněný zvýšený sklon k vazospasmům.

Předpokládá se, že detekce endoteliální dysfunkce by mohla přispět k identifikaci zatím asymptomatického jedince se zvýšeným rizikem manifestace aterosklerózy. To by umožnilo jeho časnou dispenzarizaci a eventuální zahájení preventivních opatření s cílem pozastavit nebo dokonce navodit regresi aterosklerotického procesu a oddálit tak jeho klinickou manifestaci. (Corrado et al 2005)

### **Vlastnosti endotelu při ateroskleróze**

Jak již bylo řečeno, ateroskleróza je nejvíce se vyskytující cévní onemocnění ve vyspělých zemích. Před zhruba dvaceti lety bylo zjištěno, že riziko aterosklerózy roste v závislosti na poškození endotelu a zároveň byly objeveny lipidní proužky jako první krok k tomuto poškození s tím, že následná zjevná „obnažení“ cévy, jsou pokročilejší stádium této choroby. (Hasig et al 1996) Brzy poté přišly důkazy o tom, že morfologicky abnormální endotel není funkční a přispívá k dalšímu rozvoji cévní léze. (Munro & Cotran 1988) Tyto objevy neposkytují pouze informace o patogenezi aterosklerózy, ale také dávají konkrétní doporučení k tomu, jak monitorovat progresi lézí a zefektivňovat léčbu.

Shrnuto ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění s řadou predisponujících faktorů jako je kouření, diabetes, hyperlipidémie, hypertenze, mechanický stres a záněty

cév. Jako různorodý a komplexní proces může vést k trvalému endoteliálnímu poškození, popřípadě může vyvolat řadu omezených reparativních mechanismů, které sice vedou k rekonstrukci endotelu, avšak s jeho limitovanou funkčností.

## **3 ATEROSKLERÓZA**

### **3.1 Rizikové faktory aterosklerózy**

#### **3.1.1 Neovlivnitelné faktory**

##### **3.1.1.1 Věk**

**„Člověk je tak mladý jako jeho cévy.“**

*Profesor Gotthard Schettler (†1996), Univerzita Heidelberg, SRN*

Každý člověk stárne, někdo rychleji, někdo pomaleji, ale s ním rovněž stárnou i jeho cévy. Projevuje se zde nejen fyziologické opotřebení, ale i snížená funkce reparativních procesů. Tím, že se lidská populace dnes dožívá poměrně vysokého věku, tím se také setkáváme jako zdravotníci se „staršími“ cévami. Snižují se endoteliální funkce a objevuje se ateroskleróza, což se pak projevuje zvýšeným výskytem ischemickým chorob hlavně u lidí mezi 65. a 85. rokem.

Riziko mozkového apoplexu je u 85letého člověka 1000krát vyšší než u 45letého. (Dandona et al 2003)

##### **3.1.1.2 Pohlaví**

Riziko aterosklerózy se prudce zvyšuje u mužů nad 45 let a u žen nad 55 let. Přitom do 60 roku věku jsou muži postiženi častěji než ženy. Po 60. roku se riziko u obou pohlaví vyrovnává a ženy muže začnou rychle dohánět, až je dokonce předeženou, takže po 75. roce je incidence koronární aterosklerózy vyšší než u stejně starých mužů! Důvodem pro tyto rozdíly specifické pro pohlaví je ženský pohlavní hormon, který ženám poskytuje přirozenou „ochranu“, tzn., že snižuje hladinu LDL a zvyšuje hladinu HDL. Ta je po přechodu stále nižší – s poklesem produkce estrogenu stoupá onemocnění žen dvakrát až třikrát. U žen kuřáček nastává pokles estrogenu přibližně o dva roky dříve a současně se v důsledku rizikového faktoru kouření zvyšuje riziko vzniku aterosklerózy. (Luft 2002)

### **3.1.1.3 Dědičnost**

Lidé, jejichž rodiče trpěli aterosklerózou, hypertenzí, rodinnou hypercholesterolemií nebo jinými kardiovaskulárními chorobami, mají výrazně vyšší riziko výskytu některé z těchto chorob. Potomek je pro nemoc predisponován, může ji, ale nemusí dostat.

Jedna americká studie prokázala, že riziko mozkové mrtvice u mužů, jejichž matka zemřela na mozkovou mrtvici, se trojnásobně zvýšilo. (Hassig et al 1996)

## **3.1.2 Ovlivnitelné faktory**

### **3.1.2.1 Výživové faktory**

#### **3.1.2.1.1 *Cholesterol v krvi***

Určitá hladina cholesterolu je pro tělo zcela nezbytná, protože cholesterol je důležitou součástí membrán, je základní substancí pro hormony nadledvin, pohlavní hormony a je základní substancí pro žlučové kyseliny. Koncentruje se v nadledvinách, v mozku, v kožním tuku a ve slezině, vaječnicích, v krevním séru a červených krvinkách. Ovšem toto potřebné množství si je schopné tělo syntetizovat samo. Člověk přijímá cholesterol také exogenně s potravou (v ČR průměrně 460mg!!!). Tím klesá produkce endogenně syntetizovaného cholesterolu. Tento regulační mechanismus, udržující stabilní hladinu cholesterolu, je vázán jednou podmínkou: vlastní produkce cholesterolu a exogenní přísun musí být v určité rovnováze. Jestliže přísun z venku příliš stoupne (nad 300mg/den), je možné část cholesterolu ještě odbourat v játrech, ale později dojde k poškození jaterních receptorů. Dojde ke zvyšování cholesterolu v krvi a k poruše cholesterolové výměny a nakonec k hypercholesterolemii. Cholesterol je tedy škodlivý, pouze když je ho mnoho.

Celkový cholesterol má hraniční hodnoty koncentrace v krvi 200–239 mg/dL, uvést hodnoty pouze v mmol/lpřičemž hodnota 200 mg/dL je hraniční mezi „normálním“ a „zvýšeným“ cholesterolem. Tato hodnota udává informace o celkovém cholesterolu a triacylglycerolech. Pokud ovšem udáváme hladinu v jiných jednotkách a

to v mmol/l, musíme rozlišovat mezi údaji o cholesterolu a triacylglycerolech. Přepočet je  $200\text{mg/dL}=5,2\text{ mmol/l}$  u cholesterolu a pro triacylglyceroly je to  $200\text{mg/dL}=2,28\text{mmol/l}$ . Hladina LDL by se měla u dospělého člověka pohybovat v rozmezí 130–159 mg/dL. Závisí také na tom, jestli pacient vykazuje ještě některé další rizikové faktory.

Velmi důležité je znát kromě hodnoty celkového cholesterolu také poměr mezi množstvím LDL a HDL. Hodnota HDL by měla být vyšší než 35 mg/dL. Hodnoty HDL se snižují také při kouření cigaret, nadváze, poruchách štítné žlázy a při zvýšených hodnotách triacylglycerolů. (Stehbens 2002)

### **3.1.2.1.2 Triacylglyceroly v krvi**

Triacylglyceroly (Tg) slouží buňkám těla jako zásobník energie, ochrana orgánů a tepelná izolace. Nadbytek Tg se ukládá do tukové tkáně jako deponovaný tuk. Stejně jako cholesterol si může tělo Tg vyrábět samo (v tukové tkáni nebo v játrech, také syntézou ze sacharidů). Mnoho Tg ale přichází společně s potravou. V krvi jsou Tg vázány hlavně na VLDL a vzniká tak jejich transportní forma.

Hlavními rizikovými faktory pro příliš vysokou hladinu Tg jsou cukry a alkohol. Dodávají do těla příliš mnoho kalorií (1 gram alkoholu dodá 7,2 kcal). Alkohol je také velmi rychle přeměňován na tuk a zpomaluje odbourávání tuku a cholesterolu v játrech. Krevní hladina Tg je optimální kolem 200 mg/dL. (Lepor 2002)

### **3.1.2.1.3 Cukry a diabetes mellitus**

Trvale vysoké hodnoty krevního cukru (nalačno nad 120mg/dl a po jídle nad 200mg/dl) poškozují v krátké době cévní stěny, usnadňují pronikání cholesterolu do buněk a příznivě ovlivňují proces aterosklerózy s těžkými následky. U diabetiků je také jiné složení lipoproteinů než u zdravých lidí. Vyskytují se u nich ve zvýšené míře malé aterosklerózu podporující částice, takže zvýšení hodnot cholesterolu je u nich ještě

větším rizikovým faktorem než u lidí netrpících cukrovkou. Diabetici umírají na infarkt třikrát častěji než nediabetici.

Pokud není při cukrovce dobře vyregulován krevní cukr, stoupají hodnoty krevních tuků, cholesterolu a triacylglycerolů. Proto je diabetes značným rizikem aterosklerózy. Vysoké hodnoty krevního cukru podporují usazování cholesterolu ve velkých tepnách, které zásobují kyslíkem mozek a srdce. Ještě jednoznačnější je souvislost s onemocněním malých srdečních a mozkových artérií. Zde dochází k houstnutí spojovací tkáně, které nakonec končí uzavřením cévy. (Virmani et al 2006) Mezi osobami dlouhodobě nemocnými cukrovkou se také často vyskytuje hypertenze. U diabetiků typu 1 koreluje výskyt hypertenze s délkou onemocnění, u diabetiků typu 2 nikoliv. Redukce hmotnosti často vede nejen k úpravě diabetu, ale i hypertenze.

Glukóza a produkty neenzymové glykace jsou výkonnými lapači radikálu NO. Glukóza tak může způsobit endoteliální dysfunkci a může se podílet na jejím dalším zhoršování.

### **3.1.2.2 Faktory mimo výživu**

#### **3.1.2.2.1 *Nedostatek pohybové aktivity – nadváha a obezita***

Lidé, kteří jsou pravidelně fyzicky aktivní, mají jen poloviční riziko výskytu cévních onemocnění. Vytrvalostní fyzická aktivita nejen snižuje hladinu LDL, triacylglyceroly a krevní tlak, ale i zvyšuje HDL. Výsledkem je zřetelné snížení rizika aterosklerózy.

Nadváha vzniká, jakmile člověk přijímá více energie, než spotřebuje. Potřeba výživných látek závisí na fyzické aktivitě, věku a pohlaví. Ženy obecně potřebují o něco menší příjem než muži a starší lidé podstatně méně než mladí.

Obezita je spojena s řadou metabolických poruch, jako jsou dyslipidémie, inzulinorezistence, endoteliální dysfunkce a další. Metabolické abnormality, které provázejí obezitu, jsou známými rizikovými faktory závažných organických (aterosklerotických) změn. (Cheng 2005)



### **3.1.2.2 Hypertenze**

Tak zvaná primární neboli esenciální hypertenze (hypertenze z neznámých příčin) tvoří asi 95% všech případů. Trpí jí zhruba každý pátý dospělý občan.

Vyšší hodnota krevního tlaku než je 140/90 mmHg výrazně zatěžuje srdce a poškozuje endotel cévy. Hodnota nad 160/95 mmHg je již hodnocena jako vysoký krevní tlak. (Schroeder et al 2003)

### **3.1.2.3 Kouření**

Asi čtvrtina všech onemocněním cév je způsobena kouřením. Při kouření cigaret se uvolňují volné radikály, které napadají částičky LDL, vzniká tak oxidační stres, který urychluje rozvoj aterosklerózy. Kouření také podporuje proces stárnutí, což platí hlavně u žen, ty také přicházejí o dva roky dříve do přechodu.

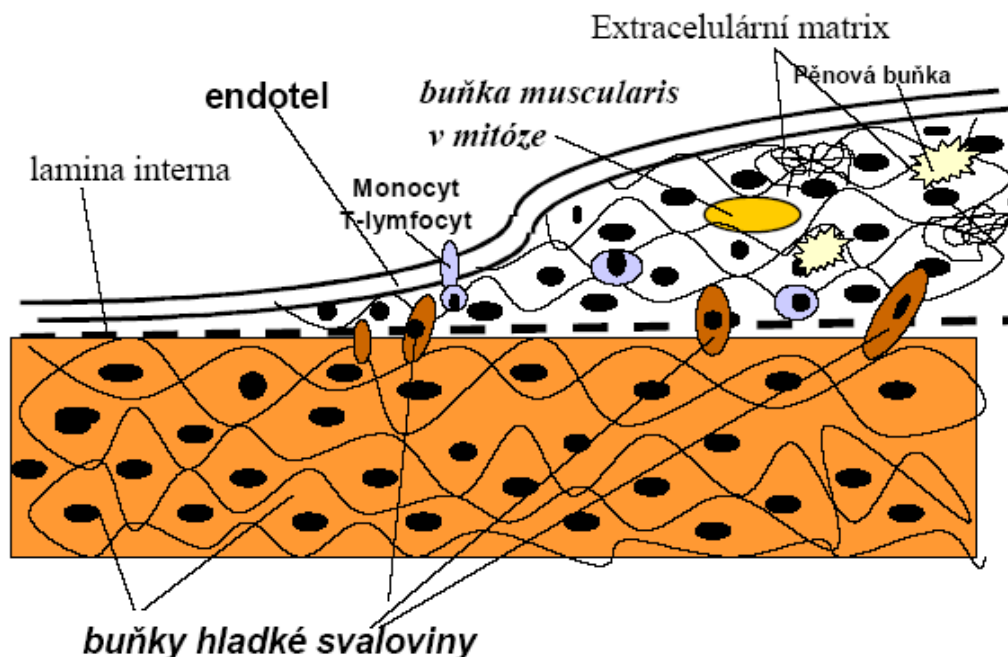
Kouření zužuje malé arterie v mozku, takže tlumí jeho zásobení krví. Kombinace kouření a vysokého krevního tlaku vede v souladu s tím ke značnému zvýšení rizika mozkové mrtvice. Je také prokázáno, že kouření zesiluje sklon krevních destiček ke shlukování a nepříznivě ovlivňuje složení krevních tuků, navíc podporuje vývoj aterosklerotických usazenin na velkých arteriích, které zásobují mozek.

Následkem kouření je také vzestup krevního cholesterolu. Poměr mezi HDL a LDL cholesterolem je nižší než u nekuřáků. (Zieske et al 2005)

### 3.2 Patogeneze aterosklerózy

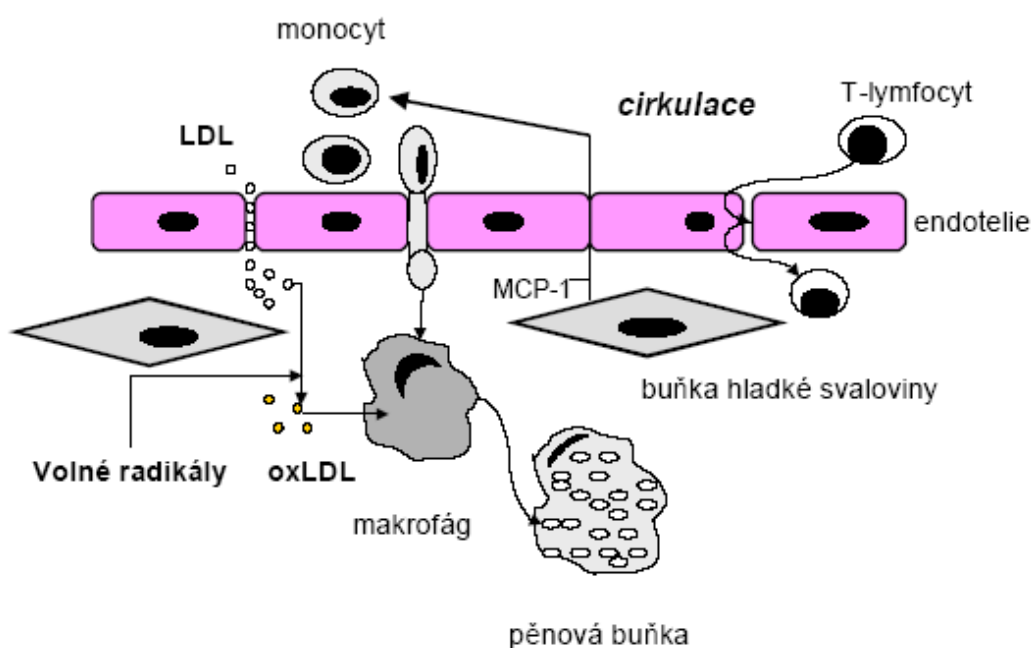
Ateroskleróza, jak již bylo několikrát řečeno, je systémové onemocnění postihující cévy tepenného řečiště (velké a střední); z klinického hlediska mají největší význam léze srdečních věnčitých tepen, extrakraniálních tepen zásobujících mozek, eventuálně dalších orgánů (ledviny). Na patogenezi aterosklerózy se podílí komplex po sobě jdoucích událostí, zahrnujících rozvoj chronického zánětlivého procesu stěny artérií jako odpověď na hemodynamické poškozování cévní stěny v nejvíce namáhaných místech, jejíž příčina nebyla odstraněna a proces nebyl neutralizován. To způsobuje nejprve dysfunkci cévního endotelu s tvorbou cytokinů, adhezních molekul a růstových faktorů. Aktivované endotelové buňky přitahují do místa léze monocyty/makrofágy a T-lymfocyty z krevní cirkulace, buňky vaskulární hladké svaloviny z medie, subendotelový prostor se postupně zvětšuje a současné zvýšení permeability endotelové výstelky umožňuje pronikání lipoproteinových částic do tohoto prostoru. Dochází v nich k lipoperoxidaci působením reaktivních forem kyslíku a dusíku, které nebyly zneškodněny antioxidačním mechanismem. Uvolněný cholesterol je pohlcován makrofágy za vzniku pěnových buněk; stěna cévy se v místě poškození ztlušťuje (migrací a proliferací buněk hladké svaloviny, tvorbou extracelulární matrix, nekrotickými depozity z rozpadlých pěnových buněk), a dostává prokoagulační vlastnosti. Celý proces vyúsťuje do *tvorby aterómu (aterómového plátu)*. Klinické příznaky se projeví, až když pokročilé léze stěny cévní se komplikují rupturou obalu aterómového plátu, krvácením do plátu, vznikem trombózy nebo embolu.

Obrázek 2. Schéma ztlušťování artérie v průběhu aterosogeneze (převzato z internetových stránek: <http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



Příčiny endotelové dysfunkce vedoucí k ateroskleróze zahrnují hemodynamickou zátěž, zvýšení a modifikaci LDL-částic, tvorbu reaktivních forem kyslíku a dusíku, zvýšený arteriální tlak, diabetes mellitus, genové alterace kódující progresi zánětlivé a reparační odpovědi, zvýšenou hladinu homocysteinu a také přítomnost infekčních agens jako jsou herpetické viry, cytomegalovirus, virus Epsteinova a Barrova, *Hemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* nebo *Helicobacter pylori*. Dysfunkce endotelu, způsobená těmito vlivy, vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti cévního endotelu. Zvyšuje se adhezivita endotelových buněk vzhledem k leukocytům nebo krevním destičkám, roste permeabilita cévní stěny, endotelie získávají prokoagulační vlastnosti namísto antikoagulačních a zvyšuje se produkce vazoaktivních molekul, cytokinů, chemokinů i růstových faktorů. (Steinberg 2005)

Obrázek 3. Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu (převzato z internetových stránek: <http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



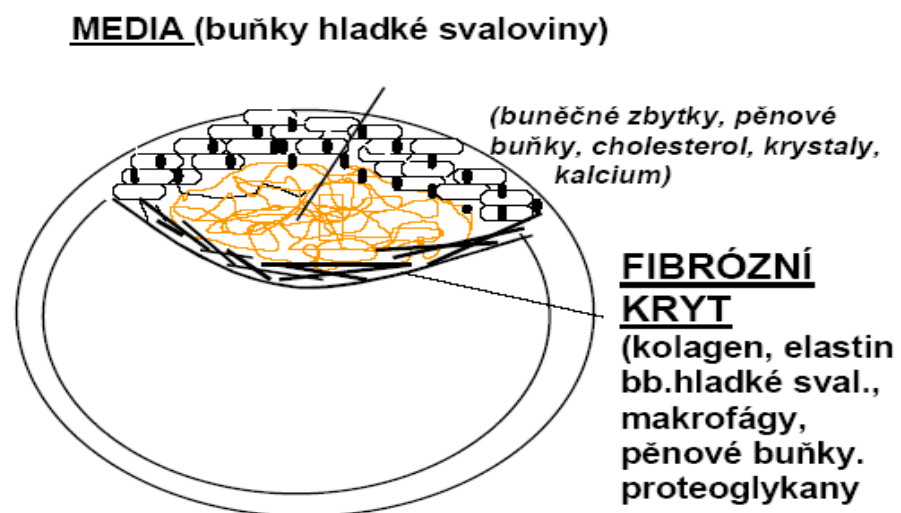
Když tato zánětlivá odpověď nedokáže vyvolávající příčiny odstranit a není-li účinně neutralizována nebo potlačena obrannými mechanismy, postupuje ve svých účincích dále. Migrace a proliferace buněk hladké svaloviny pokračuje; myocyty pronikají do oblastí zánětu, dochází k jejich aktivaci, tvorbě extracelulární matrix. Dochází k nakupení makrofágů a T-lymfocytů v subendotelovém prostoru ve stěně cévy, která se takto ztlušťuje. Toto ztluštění je nejprve kompenzováno dilatací a lumen cévy zůstává zpočátku nezměněno (fenomén remodelace). Pokračující zánět zvyšuje počet makrofágů a lymfocytů, které se sem dostávají z krevního oběhu nebo vznikají na místě léze proliferací. Makrofágy fagocytují oxidované LDL-částice, které pronikly do intimy a vznikají z nich pěnové buňky. Aktivace makrofágů a T-lymfocytů vede k dalšímu uvolňování cytokinů, chemokinů (monocytový chemoatraktant-protein 1 = MCP-1), hydrolytických enzymů a růstových faktorů, které navozují další poškození, eventuálně způsobují ložiskovou nekrózu. A tak postupující akumulace monocytů/makrofágů, migrace a proliferace buněk hladké svaloviny a tvorba fibrózní tkáně vede k dalšímu rozšiřování a restrukturalizaci léze, která se pokrývá vazivovou čepičkou, zakrývající lipidové jádro s nekrotickými hmotami (ateromový plát). To je stádium pokročilé komplikující léze arteriální stěny. Od určité doby arterie nemůže kompenzovat lézi pronikající do lumen cévy dilatací, to se zmenšuje, což vede ke

snížení průtoku cirkulující krve. Na zhrubělém povrchu léze (ateromového plátu) adherují trombocyty. Jejich aktivací se uvolňují granula obsahující cytokiny a růstové faktory, které spolu s trombinem přispívají k další migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny a monocytů. Aktivací destiček také vzniká arachidonová kyselina, která se přeměňuje (působením cyklooxygenázy 1) na prostaglandiny jako je tromboxan A<sub>2</sub>, který je velice potentním vazokonstriktorem a látkou agregující trombocyty; z arachidonové kyseliny také vznikají (působením lipooxygenázy) leukotrieny, amplifikující zánětlivou reakci.

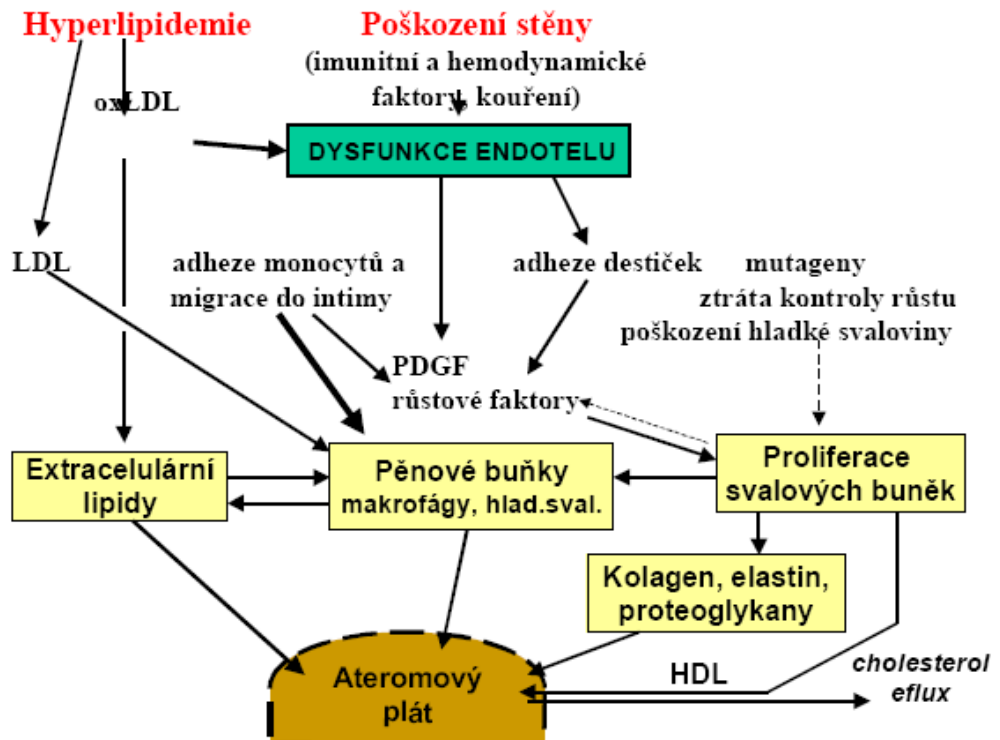
Pokud fibrózní čepička pokrývající ateromový plát zůstává dostatečně tlustá, nehrozí takové nebezpečí z obturace lumen artérie. Jakmile však dojde k jejímu ztenčování působením metaloproteinás (kolagenas, elastas, stromelysinu) uvolňovaných z makrofágů po aktivaci T-lymfocyty, vzniká tak stádium nestabilního plátu, kdy hrozí ruptura plátu, průnik krve do jeho nitra a vznik obturujícího trombu. Uzávěr lumen cévy vede k akutní hypoxii, se všemi jejími důsledky pro zásobenou tkáň. (Boyle 2005)

Obrázek 4. Schéma ateromového plátu (převzato z internetových stránek:

<http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



Obrázek 5. Schéma mechanismu rozvoje aterosklerózy (převzato z internetových stránek: <http://www.zdravcentra.sk/index.php?act=k-10&did=408>)



## 4 ADHEZNÍ MOLEKULY

Adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Nepůsobí pouze jako pasivní lepidlo, ale účastní se také přenosu signálů mezi buňkami a podílí se tak na interakci buněk s okolním prostředím. Adhezní molekuly se účastní řízení řady fyziologických dějů, jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciaci, hojení ran, či obnova tkání. Uplatňují se ale také při patologických procesech, kde se např. podílejí na interakcích mezi složkami imunitního systému. (Joseph-Silverstein & Silverstein 1998)

Podle strukturních vlastností je můžeme rozdělit do čtyř základních skupin. Jsou to **selektiny, integriny, imunoglobulinová skupina a kadheriny**.

### 4.1 *Selektiny*

Jsou známy 3 základní typy L (leukocytární), E (endoteliální), P (destičkové). Strukturou jsou to proteiny obsahující na svém N-konci lektínovou nebo lecitinovou doménu, která se účastní interakce s příslušnými ligandy (nejčastěji sacharidovými). Obecně mají význam při počátečních fázích zachycování leukocytů na endoteliích.

### 4.2 *Integriny*

Jejich strukturu tvoří transmembránové glykoproteiny se dvěma nekovalentně asociovanými podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ , obsahují N-konec, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Dodnes je popsáno nejméně 16  $\alpha$  podjednotek a 8  $\beta$  podjednotek, které mohou vytvořit až 20 heterodimerních kombinací. Jsou exprimovány na leukocytech, trombocytech i endotel. (Albelda 1993)

Jejich funkce spočívá v tom, že váží složky mezibuněčné hmoty, kolagen, fibronektin a laminin. Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou významné.

### **4.3 Imunoglobulinová skupina**

Imunoglobulinová skupina adhezních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců.

Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce). (Mareckova et al 1999) Patří sem celá řada adhezních molekul jako antigenně specifické receptory T a B lymfocytů TCR, BCR, koreceptory T lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) a platelet cell adhesion molecule-1 (PECAM-1).

#### ***Expresa VCAM-1 a ICAM-1***

VCAM-1 i ICAM-1 jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami. (Jang et al 1994) Studie na králících a myších prokázaly, že VCAM-1 je endoteliálními buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů to v oblastech které jsou predispoziční ke vzniku lézí, přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi především shear stresem. ICAM-1 je exprimován ve stejných oblastech jako VCAM-1, ale exprese ICAM-1 je pozorována i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí. (Iiyama et al 1999) U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován především endoteliálními buňkami, přičemž VCAM-1 je exprimován i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován většinou buněk, které se nacházejí v intimě cév. Přesto se ukazuje, že VCAM-1 je exprimován především v oblastech výskytu lézí, zatímco ICAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami i mimo aterosklerotickou lézi.

Expresa těchto adhezních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Hypercholesterolemie a oxidované LDL a



diabetes zvyšují expresi jak ICAM-1, tak VCAM-1 (Vlassara et al 1995) . Také kouření, hyperhomocysteinemie, hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi VCAM-1 a ICAM-1. Expese obou těchto molekul je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- $\alpha$  nebo IL-1.

#### *PECAM*

Exprimován konstitučně na klidovém cévním endotelu, leukocytech, trombocytech, podílí se na angiogenezi a na transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostorů.

#### **4.4 Kadheriny**

Představují hlavní strukturální glykoproteidy, které tvoří adherentní mezibuněčné spoje zvané zonula adhaerens (adherens junctions). Jsou tvořeny 5 extracelulárními doménami, jejichž vazba je stabilizována vápenatými ionty, transmembránovou oblastí a cytoplazmatickou doménou.

Obecně se podílí na diferenciaci, proliferaci a migraci buněk, na angiogenezi a na reparaci poškozené tkáně. Ve vztahu k ateroskleróze mají největší význam epiteliální (E)-kadherin a vaskulární-endoteliální (VE)-kadherin. (Bobryshev et al 1999)

## 5 ENDOGLIN (CD 105)

CD105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu transformačního růstového faktoru-beta (TGF- $\beta$ ). Bylo prokázáno, že endoglin také moduluje signalizaci TGF- $\beta$  prostřednictvím interakce s TGF- $\beta$  receptorem I nebo II. (Jonker & Arthur 2002)

Endoglin je převážně tvořen v cévních endoteliálních buňkách a jeho tvorba se zvyšuje při hypoxii. Dále byla jeho exprese detekována u makrofágů, hladkých svalových buněk a fibroblastů. Endoglin je považován za významný marker angiogeneze a tudíž je jeho exprese významná jak v embryonálním vývoji, tak také při procesu hojení ran, při infarktech a během kancerogeneze. Jeho zvýšená exprese je dávana do souvislosti s horší prognózou nádorového onemocnění. Mutace genu pro endoglin navíc vede k rozvoji hereditární hemorrhagické telangiektázie. (Bourdeau et al 1999)

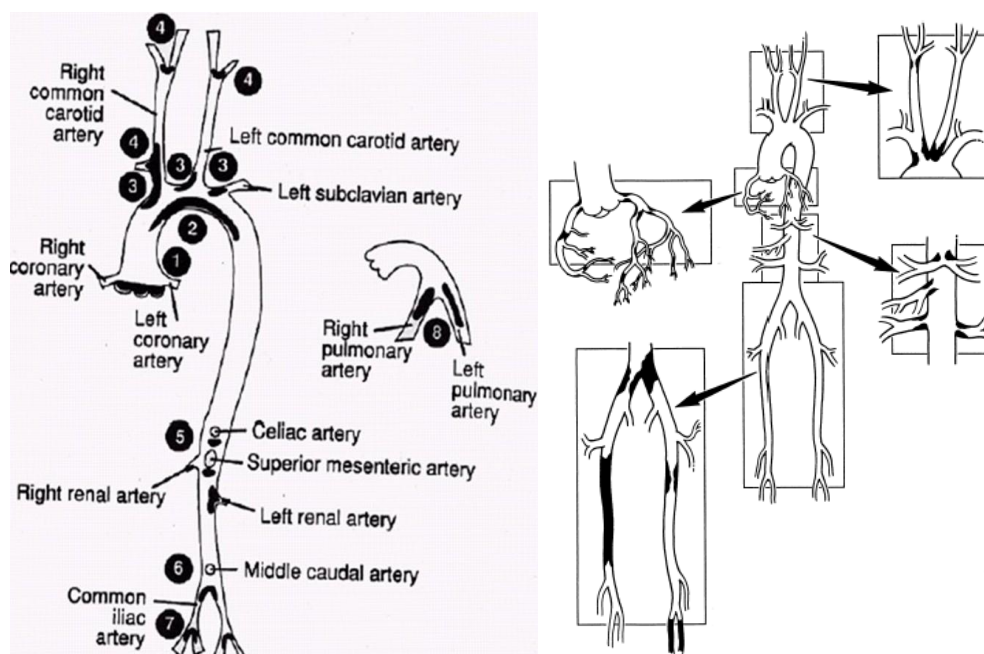
Vzhledem k tomu, že bylo popsáno, že endoglin může modulovat účinky TGF- $\beta$ , který je považován za významný antiaterogenní faktor, myslíme si, že změny jeho exprese mohou hrát roli v procesu aterogeneze.

## 6 APO-E MYŠ JAKO EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

Ačkoliv myši jsou živočišným druhem velice odolným vůči ateroskleróze, podařilo se vypěstovat takový kmen myši, který je k této chorobě náchylnější. Tento kmen se potom používá ve výzkumu tohoto onemocnění. (Jawien et al 2004)

Apo-E myši jsou geneticky modifikované homozygotní myši (kmen C57Bl/6) se záměrně odebraným genem pro apolipoprotein E (apo E KO). To znamená, že tyto myši vyvíjí spontánní hypercholesterolemii s hladinou cholesterolu 4-5krát vyšší než u normálního nemodifikovaného kmene (10 mmol/l). Toho se cíleně využívá, poněvadž vyvíjejí všechny typy aterosklerotických lézí s morfologickými charakteristikami blízkými podobnými člověku na stejných místech cévního stromu (viz obrázek 6.). (Tian et al 2005)

*Obrázek 6. Morfologická lokalizace cévních lézí u apoE myši (Tian et al 2005)*



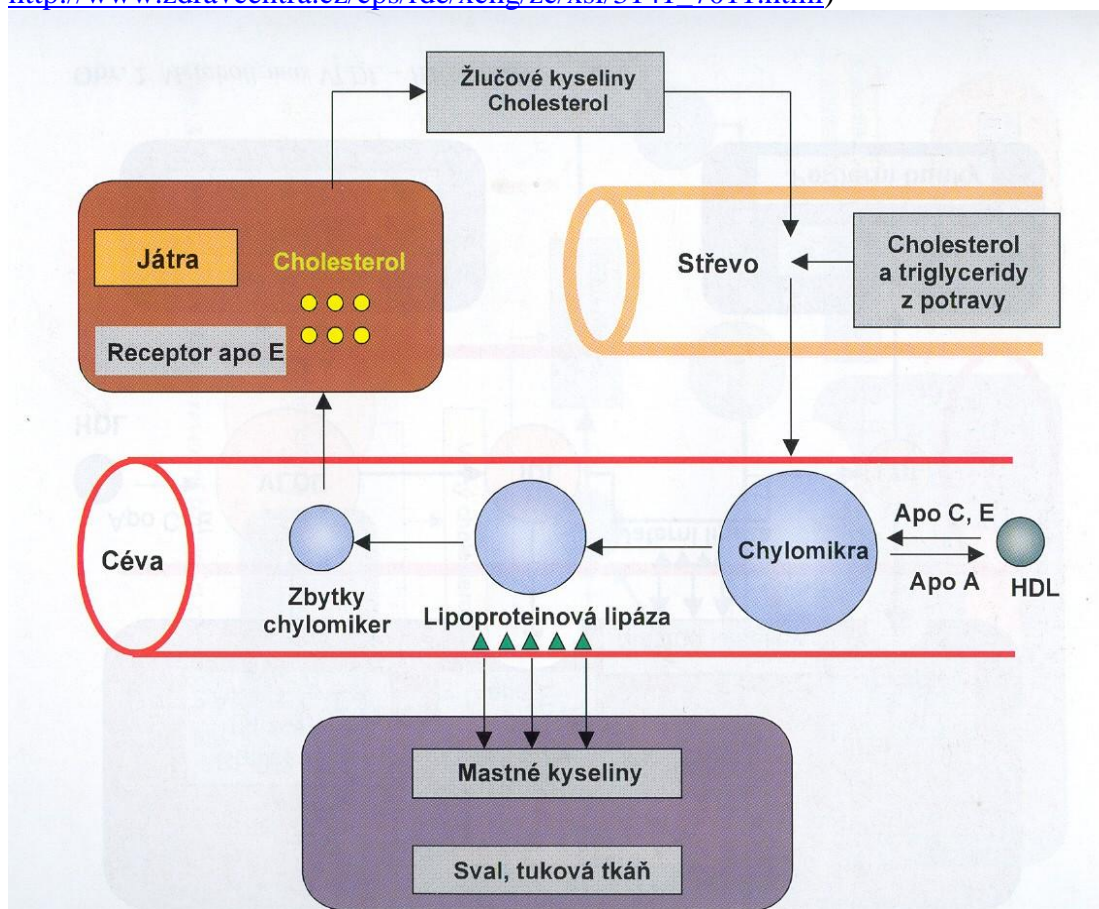
### ***Struktura a funkce apolipoproteinu E v metabolismu lipoproteinů***

Apolipoprotein E (apo E) je geneticky polymorfní glykoprotein, který je složen z 299 aminokyselin. Je významnou součástí triacylglyceroly-bohatých lipoproteinů [chylomikronů, lipoproteinů velmi nízké hustoty (VLDL) a jejich „zbytků“]. Apo E je ligandem apo B, E receptorů, a tím výrazně reguluje homeostázu lipidů a lipoproteinů v krevní plazmě. (Hofker et al 1998)

### ***Vznik a metabolismus chylomiker (viz obr. 7)***

Tyto největší lipoproteiny, syntetizované v enterocytech, jsou velmi bohaté na triglyceridy. Transportují je ze střeva do periferních tkání (především tukové tkáně), cholesterol transportují do jater. Zdrojem cholesterolu pro jejich syntézu je žluč, dále cholesterol exogenní, pokud je obsažen v potravě. Bez cholesterolu by nebyla možná syntéza chylomiker a tím ani transport a zpracování triglyceridů z potravy. Sekrece cholesterolu do žluče je proto základní podmínkou resorpce a zpracování triglyceridů. Na svém povrchu nesou chylomikra apolipoprotein B48 a apolipoproteiny A. Po vstupu do krevního řečiště přebírají chylomikra od HDL další apolipoproteiny, C a E. V krevních kapilárách periferních tkání jsou chylomikra degradována hydrolýzou triglyceridů účinkem lipoproteinové lipázy. Tento enzym je lokalizován na cévním endotelu kapilár tkání, které mají vysokou spotřebu mastných kyselin, především kosterního svalstva, myokardu, tukové tkáně a také prsní žlázy v době laktace. Aktivátorem lipoproteinové lipázy je apolipoprotein C II, který je přítomen na povrchu částice VLDL, inhibítorem je apolipoprotein C III. Za fyziologických okolností je vrchol koncentrace chylomiker asi za 3–6 hodin po jídle, jejich biologický poločas je asi 1/2 hodiny a po 9 hodinách jsou úplně odbourány. (Thorngate et al 2002)

*Obrázek 7. Vznik a metabolismus chylomiker (převzato z internetových stránek: [http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141\\_7011.html](http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_7011.html))*

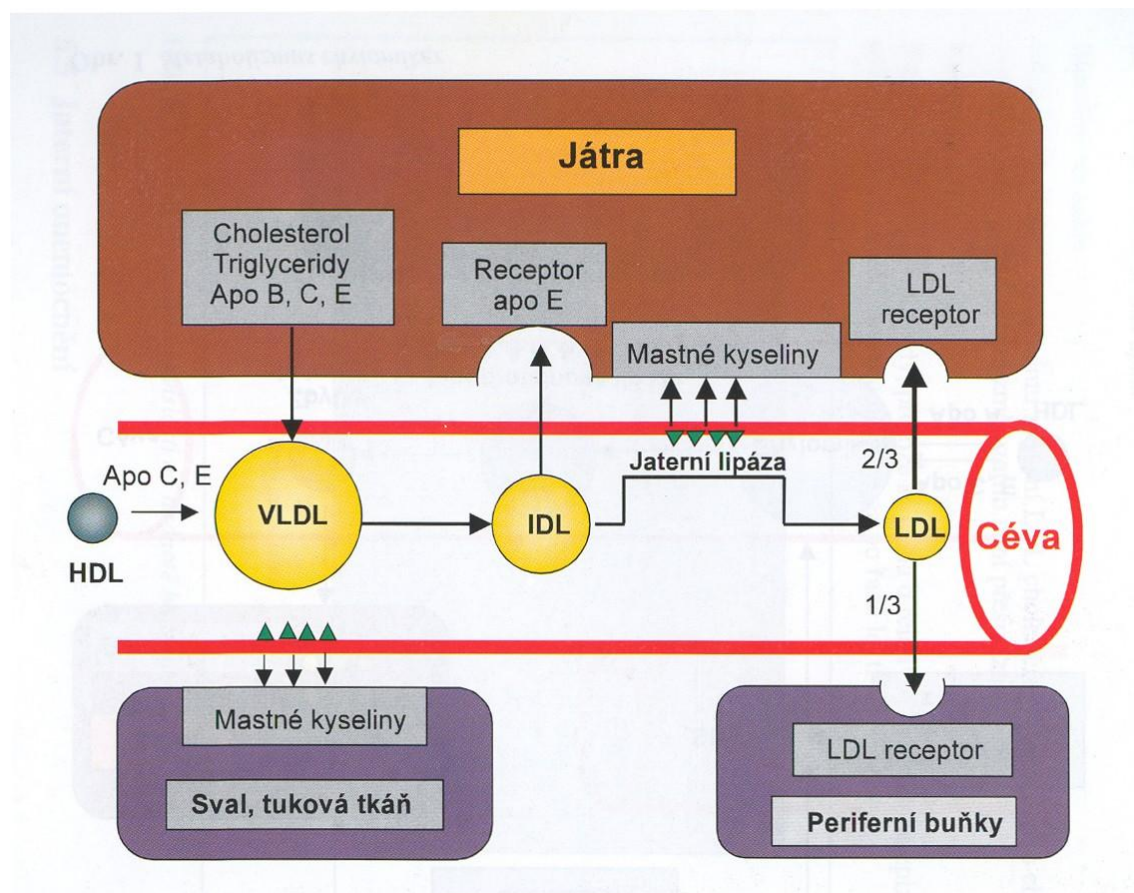


**Syntéza a metabolismus VLDL lipoproteinů (viz obr. 8)**

VLDL jsou syntetizovány v játrech, jsou bohaté především triglyceridy a transportují je z jater do periferních tkání. Cholesterol nutný pro jejich syntézu pochází z remnant chylomiker, IDL, LDL, HDL nebo z endogenní syntézy v hepatocytu. Zdrojem pro syntézu triglyceridů jsou mastné kyseliny. Zvýšený přívod mastných kyselin do jater nebo zvýšená syntéza mastných kyselin v játrech vede ke zvýšené tvorbě VLDL a ke zvýšenému obsahu triglyceridů ve VLDL. Tak je tomu např. při obezitě, zvýšené konzumaci alkoholu, glycidů, nebo při diabetes mellitus. Pro syntézu VLDL a jejich sekreci do krve je nutný apolipoprotein B100, dále je syntetizován i apo C a E. V krvi jsou obohacovány a další apolipoproteiny (C II, C III, E) z částic HDL. V kapilárách periferních tkání, především tkáň tukové (ale také např. svalové a pojivové), jsou z částic VLDL hydrolyzovány triglyceridy. Částice se zmenšuje, stává

se relativně bohatší na cholesterol a vzniká částice intermediální – IDL (remnanta VLDL). Předpokládá se, že malá část VLDL může být katabolizována také specifickými tkáňovými receptory pro VLDL. Biologický poločas VLDL je delší než u chylomiker, je asi 2–4 hodiny.

*Obrázek 8. Syntéza a metabolismus VLDL lipoproteinů (převzato z internetových stránek: [http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141\\_7011.html](http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_7011.html))*



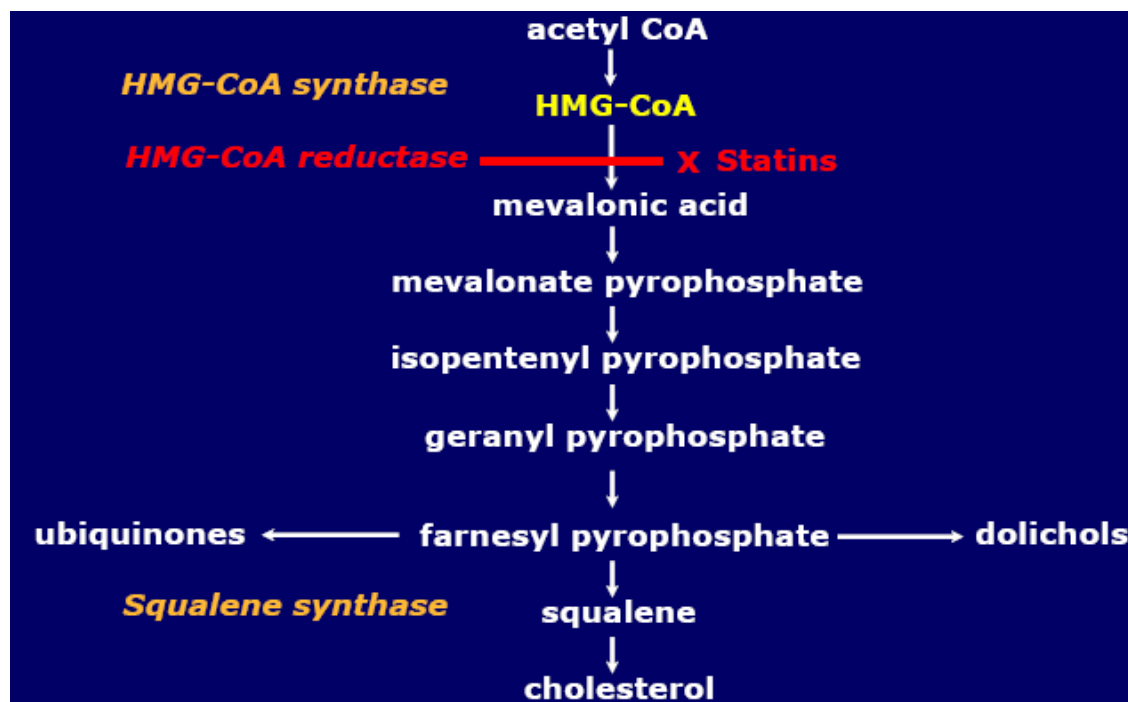
## 7 STATINY V LÉČBĚ HYPERCHOLESTEROLÉMIE

### 7.1 Mechanismus účinku

Statiny tlumí syntézu cholesterolu v buňce (játrech) „de novo“ inhibicí klíčového enzymu „ $\beta$ -hydroxy-3-metyl-glutaryl-koenzym A reductázy, což má za následek up-regulaci LDL receptotů a tím i zvýšené vychytávání LDL cholesterolu z oběhové krve (viz obr. 9). (Stancu & Sima 2001)

Obrázek 9. Biochemické znázornění mechanismu účinku statinů (převzato z internetových stránek:

[http://www.svl.cz/files/public/svl/prednasky/Lecbe\\_dyslipidemii\\_konference\\_PL.pdf](http://www.svl.cz/files/public/svl/prednasky/Lecbe_dyslipidemii_konference_PL.pdf))



## 7.2 *Terapeutický význam statinů*

Statiny inhibují 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reduktázu (HMG-CoA reduktázu), čímž výrazně snižují syntézu cholesterolu na počátku metabolického řetězce. Deficit cholesterolu v játrech pak vede k vzestupu počtu receptorů pro LDL na povrchu buněk s následným zvýšeným nitrobuňčným průnikem LDL-cholesterolu. Statiny výrazně snižují hladinu cholesterolu vázaného v LDL, příznivě zvyšují hladinu cholesterolu v HDL a v menší míře snižují i hladinu triacylglycerolů. Dokumentován je **příznivý efekt statinů** na regresi aterosklerózy (či spíše na stabilizaci aterosklerotického plátu), na výskyt překonaných i smrtících kardiovaskulárních příhod a na pokles celkové mortality nejen u nemocných se středně závažnou hypercholesterolémií, ale i u nemocných s jen mírnou hypercholesterolémií (*simvastatin*, *lovastatin*, *pravastatin*, *fluvastatin*, *atorvastatin*). Dokumentován byl rovněž významný pokles morbidity a mortality (*simvastatin*, *pravastatin*, *lovastatin*), a to jak v sekundární, tak i v primární prevenci.

Vzácným, ale závažným **nežádoucím účinkem** statinů je výskyt myopatie (výjimečně až rabdomyolýzy). Proto je nutné v průběhu terapie sledovat výskyt myalgií a případně ověřit výskyt myozitid hladinou kreatinfosfokinázy (více než desetinasobný vzestup). V průběhu léčby je nutná také pravidelná kontrola hodnot jaterních transamináz. Pro zvýšený výskyt myopatie a rabdomyolýzy byl výrobcem v srpnu 2001 stažen z trhu cerivastatin. (Andrejak et al 2003)

## 7.3 *Pleiotropní účinky statinů*

Pleiotropní účinky statinů jsou účinky statinů nezávislé na koncentraci cholesterolu. Četné studie prokázaly příznivé vlastnosti statinů jak v primární, tak v sekundární prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Metaanalýza těchto studií zjistila zlepšení klinického stavu pacientů již v době, kdy koncentrace cholesterolu v plazmě nebyly změněny, nebo u pacientů s normální průměrnou koncentrací cholesterolu. (viz tabulka 2.)

Podle současných znalostí mají statiny kromě účinků na krevní lipidy i další příznivé efekty, které se mohou podílet na zlepšení prognózy nemocných s dědičnou



hyperlipoproteinémií a s aterosklerózou. Tlumí zánětlivou a imunitní reakci v aterosklerotickém ložisku a ovlivňují v něm proliferaci hladkých svalových buněk a extracelulární matrix. To přispívá ke stabilizaci aterosklerotického plátu, i když pro stabilizaci plátu je nepochybně zásadní snížení LDL cholesterolu v krvi a v aterosklerotickém ložisku. Některé statiny omezují i riziko trombogeneze – tlumí syntézu PAI-1, trombomodulinu a tromboxanu B2. Zlepšují funkci cévního endotelu, zvyšují syntézu oxidu dusnatého (NO) a zlepšují vazodilataci závislou na oxidu dusnatém. Na těchto efektech se do jisté míry může podílet také samotný pokles LDL cholesterolu, nicméně v experimentech byl prokázán i přímý vliv statinů bez zprostředkování snížením LDL cholesterolu. V poslední době byl prokázán příznivý vliv statinů na kostní denzitu a snížení rizika fraktur, u transplantací oddalují rejekci a zlepšují přežívání graftu a diskutován je i jejich antineoplastický efekt. (Calabro & Yeh 2005)

**Tabulka 2. Pleiotropní účinky statinů** (Calabro & Yeh 2005)

Účinek	Prospěch
zvýšení exprese a aktivity eNOS - zvýšení syntézy NO inhibice oxidace LDL cholesterolu	zlepšení endoteliální dysfunkce
snížení hladiny CRP snížení sérových hladin TNF $\alpha$ a IL-1 snížení exprese ICAM-1 blokáda LFA-1 - snížení počtu a aktivity buněk zánětu	snížení zánětlivé odpovědi
inhibice migrace a proliferace arteriálních myocytů inhibice růstu makrofágů snížení produkce metaloproteináz	stabilizace aterosklerotického plátu
snížení produkce zánětlivých cytokinů z adipocytů zlepšení transportu glukózy a inzulínu úpravou endoteliální dysfunkce	zlepšení inzulínové rezistence
zvýšení aktivity $\alpha$ -sekretázy - snížení tvorby amyloidních plaků	zpomalení rozvoje demence
zvýšení exprese genu pro BMP-2 - zvýšení tvorby kostní tkáně - zvýšení koncentrace sérového osteokalcinu	zmírnění osteoporózy

Vysvětlivky k tabulce 2:

NO	oxid dusnatý
eNOS	endoteliální NO syntáza
CRP	C-reaktivní protein
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
IL-1	interleukin 1
LFA-1	leukocytární funkční antigen 1
BMP-2	kostní morfogenetický protein-2 (bone morfogenetic protein – 2)

## **8 CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce bylo detekovat a kvantifikovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu ve stěně cévy u apoE deficientních myší, kterým byla podávána standardní laboratorní dieta. Dále byl sledován vliv krátkodobě podávaného hypolipidemika atorvastatinu na změnu v expresi těchto endoteliálních markerů. Pro zobrazení exprese VCAM-1 a endoglinu byly využity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci jejich exprese stereologické metody.

## 9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samci kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E ( $\text{apoE}^{-/-}$ ), vážící 15-20 gramů, byli laskavě poskytnuti Prof. Polednem (IKEM, Praha, Česká Republika), byli ustájeni v SEMEDu (Praha, Česká Republika).

### 9.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Všechny myši byly v 5 týdnech života ostaveny od matky, náhodně rozděleny do 2 skupin.

ApoE deficientní myši ( $n=8$ ) byly krmeny po odstavení standardní laboratorní stravou 4 týdny ( $\text{apoE}^{-/-}$  neléčená 9 týdenní skupina). V atorvastatinové skupině byly myši krmeny standardní laboratorní stravou, do níž byl přidáván atorvastatin v dávce 10mg/kg/den další 4 týdny po odstavení ( $\text{apoE}^{-/-}$  atorvastatinová 9 týdenní skupina).

Každá z myši v atorvastatinové skupině 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 vylučněna a byla provedena euthanasie 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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **9.2 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA**

Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol v 510 nm, triglyceridy, v 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

## **9.3 IMUNOHISTOCHEMIE**

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce (7  $\mu\text{m}$ ) na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, které byly předem upravené v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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. Poté se řezy po 15 minutovém usušení vložily na 10 minut do destilované vody, následně se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). V další fázi byly na sklíčka napipetovány roztoky anti avidinu a anti biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do roztoku 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) – goat anti-hamster IgG a goat anti-rat IgG (Vector Laboratories), které byly značeny biotinem a opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5

minut). Dále byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboriem). K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu ( po 2 minutách) a sklíčka zamontována do eukittu.

Byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) zředění 1/50.

Všechny protilátky byly zakoupeny ve firmě BD Pharmingen (California, USA)

### **Pracovní postup**

1. nechat uschnout řezy	60 minut
2. fixace aceton (uschovaný v – 20 stupních)	15 minut
3. usušit	15 minut
4. PBS	10 minut
5. 10% zvířecí serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	30 minut
6. inkubace s avidin D	15 minut
7. oplach v PBS	5 minut
8. inkubace s biotinem	15 minut
9. PBS	oplach
10. primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
11. PBS 1	2x5 minut
12. 10% serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	15 minut
13. sekundární protilátka (+ mouse serum v PBS)	30 minut
14. PBS 3	5 minut
15. 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 70 ml H <sub>2</sub> O)	15 minut
16. PBS 4	2x5 minut
17. ABC komplex elite	30 minut
18. PBS 5	5 minut
19. DAB (podle návodu)	nutno určit čas
20. destilovaná voda	oplach
21. aceton	oplach
22. aceton-xylen (10:1)	3 minuty
23. aceton-xylen (1:10)	3 minuty
24. 3x xylen	2 minuty
25. Eukitt – montování krycího sklíčka	

## 9.4 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ

Plochy endoteliální exprese endoglinu, VCAM-1 a PECAM-1 byly kvantifikovány pomocí stereologických metod (Nachtigal et al 2004). Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 $\mu$ m (0,385mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez byl pro každé imunohistochemické barvení vybrán náhodně, a pak se vybral každý jedenáctý řez, takže bylo pro každé barvení použito pět řezů 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 (Gundersen et al 1988). Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P$$

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

Protílátka PECAM-1 byla použita jako marker přítomnosti endotelu. Takže plocha exprese endoglinu a VCAM-1 v endotelu byla vztažena k expresi PECAM-1 a vypočítána jako:

$$estP = \frac{area(x)}{area(PECAM)} * 100\%$$

kde  $x$  je plocha endoglinu, nebo VCAM-1 v endotelu a plocha  $PECAM$  je plocha PECAM-1 v endotelu.

Fotodokumentace a digitalizace z mikroskopu byla provedena mikroskopem Nikon Eclipse E2000, digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. USA) a za pomoci softwaru LUCIA verze 4.82 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika).

Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

## **9.5 STATISTICKÁ ANALÝZA**

Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (One Way Anova). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$  kde  $\alpha=0.05$ . Pokud se mezi skupinami vyskytl statisticky významný rozdíl, byl použit Tukey test pro mnohočetná porovnání.

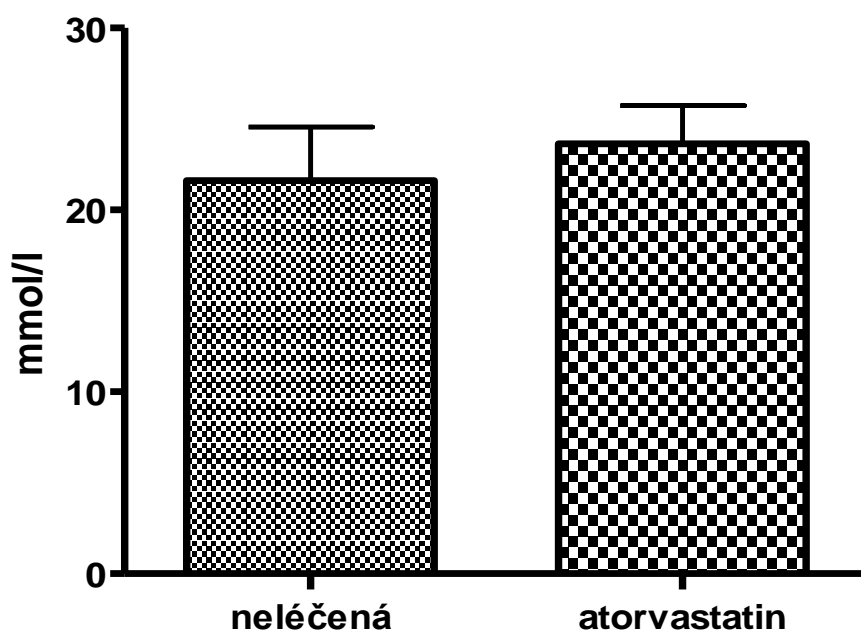


## 10 VÝSLEDKY

### 10.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu. Čtyřtýdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladinu celkového cholesterolu u devítitýdenní skupiny ve srovnání s neléčenými zvířaty ( $21,62 \pm 2,94$  vs.  $23,65 \pm 2,09$  mmol/l,  $P = 0,558$ ) (viz obr. 10).

*Obrázek 10. Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Čtyřtýdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ( $P=0,587$ )*



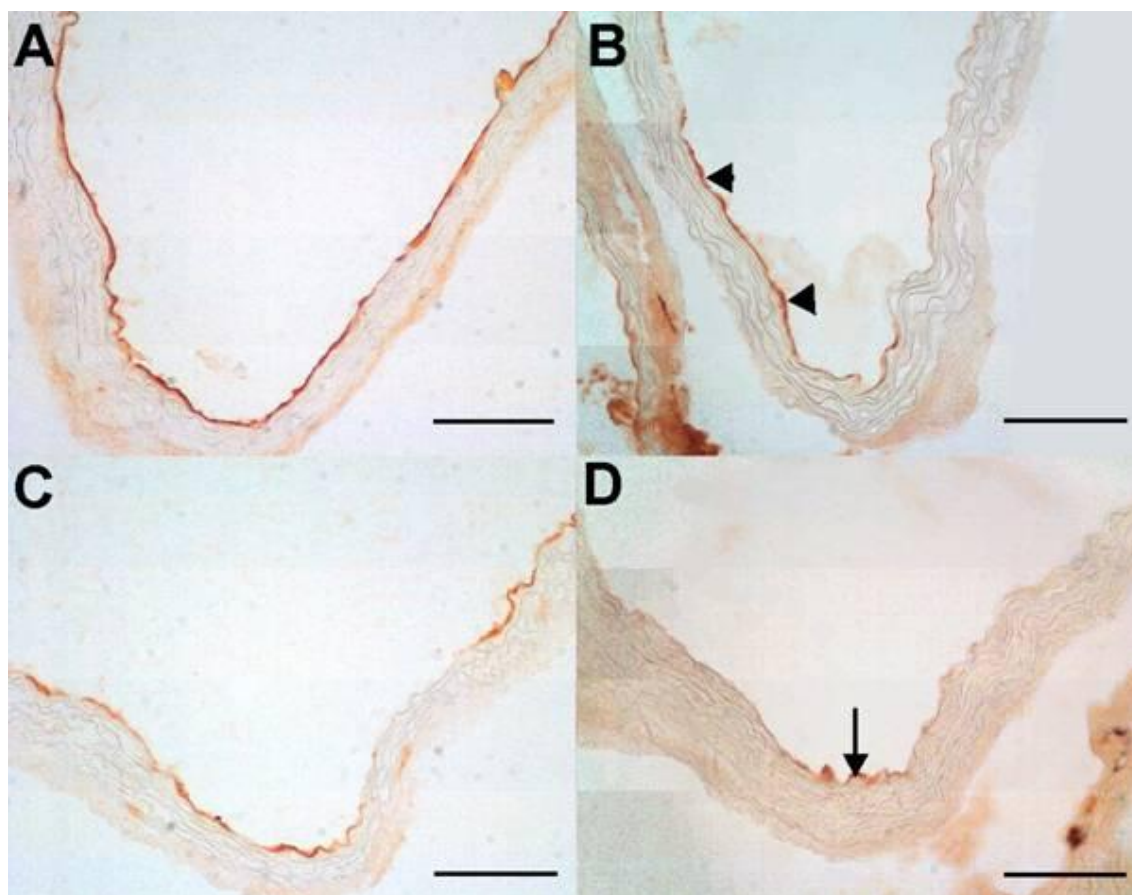
## ***10.2 Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu***

V oblasti aortálního sinu a oblouku nebyly u žádné z myší přítomny aterosklerotické léze nebo jiné morfologické abnormality. Exprese PECAM-1 byla zjištěna v endotelových buňkách ve všech skupinách myší. Tato protilátka byla použita jako standard pro detekci intaktního endotelu, protože její exprese by neměla být změněna při změnách hladin cholesterolu.

Exprese VCAM-1 byla pozorována převážně v endotelu aorty u obou skupin zvířat. (viz obr. 11) Pouze velmi slabá exprese byla nalezena v kapilárách okolního myokardu. Podávání atorvastatinu vedlo k výrazné změně intenzity barvení VCAM-1. Byla zachována částečná exprese na endotelu, nicméně intenzita barvení byla u zvířat, kterým byl podáván atorvastatin, snížena (viz obr. 11).

Exprese endoglinu v experimentu byla detekována v endotelu aorty u všech zvířat. Dále byla pozorována v myokardu a to v kapilárách a v endotelu menších cév. Exprese endoglinu byla podobná z hlediska lokalizace u všech myší v experimentu. Podávání atorvastatinu zřetelně snížilo expresi endoglinu v endotelu aorty. (viz obr. 11).

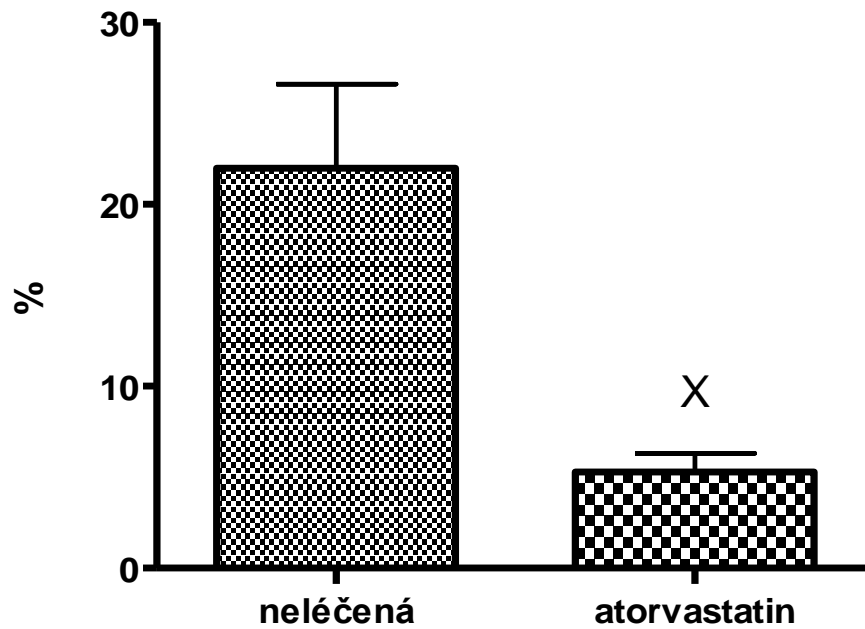
*Obrázek 11. Expresi VCAM-1 v endotelu aortálního sinu cholesterolové skupiny zvířat (A) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B). Expresi je pozorována pouze v endoteliálních buňkách (viz. šipky). Z obrázku je patrné, že podávání atorvastatinu snížilo endoteliální expresi VCAM-1 (B). Expresi endoglinu v endotelu aortálního sinu cholesterolové skupiny zvířat (C) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (D). Endoteliální exprese endoglinu byla po podávání atorvastatinu výrazně snížena (D). Zvětšení 100x.*



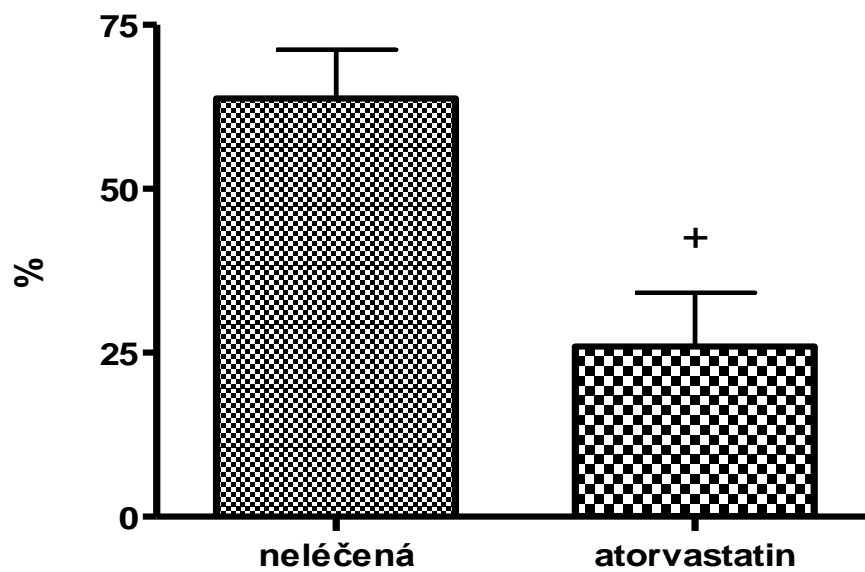
### ***10.3 STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE ENDOGLINU U APO E DEFICIENTNÍCH MYŠÍ***

Stereologická analýza imunohistochemického barvení endoglinu prokázala signifikantní snížení jeho exprese po čtyřech týdnech podávání atorvastatinu ve srovnání s devítitýdenní neléčenou skupinou. ( $22,0 \pm 4,5$  vs.  $5,3 \pm 1,2$  %,  $P^+ = 0,013$ ) (Obr. 12). Také stereologická analýza exprese VCAM-1 ukázala signifikantní snížení endoteliální exprese VCAM-1 ( $14,82 \pm 1,83$  vs.  $2,11 \pm 0,98$  %,  $P < 0,001$ ) po podávání atorvastatinu v porovnání s neléčenými myšmi. (Obr. 13).

*Obrázek 12. Procento aktivovaných endoteliálních buněk pro endoglin v aortálním sinu a oblouku. Exprese endoglinu se významně snížila po čtyřech týdnech podávání atorvastatinu (<sup>X</sup>P=0,013).*



*Obrázek 13. Procento aktivovaných endoteliálních buněk pro VCAM-1 v aortálním sinu a oblouku. Exprese VCAM-1 se významně snížila po čtyřech týdnech podávání atorvastatinu (<sup>+</sup>P=0,005).*



## 11 DISKUSE

Tato diplomová práce byla zaměřena studium exprese endoglinu a VCAM-1 v cévním endotelu u apoE-deficientního kmene myši po podávání atorvastatinu. Cílem bylo zjistit, jestli různě dlouhé podávání atorvastatinu ovlivňuje endoteliální expresi endoglinu a VCAM-1, a případně zda je toto ovlivnění spjato s hladinami celkového cholesterolu.

CD 105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu TGF- $\beta$ . (Raab et al 1999) Exprese endoglinu převládá na endoteliálních buňkách, makrofázích, fibroblastech a hladkých svalových buňkách medie. (Obreo et al 2004)

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 karotidách. (Behr-Roussel et al 2000)

Vzhledem k tomu, že bylo popsáno, že endoglin může modulovat účinky TGF- $\beta$ , který je považován za významný antiaterogenní faktor, je pravděpodobné, že by mohl takto ovlivňovat i proces aterogeneze.

Adhezní molekula VCAM-1 je považována za marker endoteliální dysfunkce a to jak v časných a tak i pokročilejších stádiích aterogeneze. Její exprese se zvyšuje při hypercholesterolemii a je zásadní pro prostup makrofágů a lymfocytů do cévní intimy, čímž se výrazně podílí na progresi aterosklerotických změn. (Liuba et al 2003)

Statiny kompetitivně inhibují HMG-CoA reduktázu, enzym, který katalyzuje biosyntézu cholesterolu. Kromě toho současné experimentální a klinické důkazy naznačují, že další účinky nezávislé na cholesterolu (pleiotropní), zahrnují zlepšení a

obnovu endoteliálních funkcí, zvýšení stability aterosklerotického plátu, snížení oxidativního stresu a zánětu, útlum trombogenních reakcí ve stěně cév. (LaRosa 2001)

ApoE deficitní myš je v současnosti velmi používaný zvířecí model pro studium aterosklerózy, přičemž tento model vykazuje určité podobnosti s hyperlipoproteinemií typu III. u člověka. Mimoto bylo prokázáno, že podávání statinů a tohoto modelu nevede k očekávanému hypolipidemickému účinku a tudíž je možné tento model považovat za vhodný ke studiu pleiotropních účinků statinů. (Sparrow et al 2001) V souladu s těmito autory bylo v této diplomové práci prokázáno, že čtyřtýdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny cholesterolu u apoE deficientních myší. Navzdory tomuto faktu však výsledky stereologické analýzy imunohistochemického barvení endoglinu a VCAM-1 ukázaly signifikantní snížení exprese těchto proteinů ve skupině myší, kterým byl podáván atorvastatin.

Snížení exprese VCAM-1 bez ovlivnění hladiny cholesterolu potvrdilo již známé protizánětlivé účinky tohoto statinu. To bylo prokázáno již dříve u opic a apoE – Leiden myší.

Někteří autoři potvrdili, že pleiotropní účinky atorvastatinu jsou zprostředkované inhibicí transkripčního faktoru NF-kappaB, který se významně podílí na regulaci exprese genů pro VCAM-1, P-selektin nebo MCP-1, které hrají důležitou roli v patogenezi aterosklerózy. (Corsini et al 1995) Navíc Rius et. al. dokázali, že NF-kappa-B by mohl regulovat i transkripci endoglinu. (Letamendia et al 1998) Dá se tedy předpokládat, že snížení endoteliální exprese jak endoglinu tak VCAM-1 u myší léčených čtyři týdny atorvastatinem, je zprostředkováno právě inhibicí NF-kappaB.

Jak již bylo naznačeno dříve, endoglin je schopen modulovat účinky významného cytokinu TGF- $\beta$ . Bylo například prokázáno, že endoglin antagonizuje inhibiční účinky TGF- $\beta$  na endotelové buňky, což pak má za následek rozvoj

angiogeneze. (Li et al 2000) Vzhledem k tomu, že TGF- $\beta$  působí protizánětlivě, inhibuje činnost makrofágů a T lymfocytů a snižuje expresi adhezních molekul (Mallat et al 2001) lze předpokládat, že zvýšená exprese endoglinu by mohla tyto účinky inhibovat a přispívat tak k rozvoji aterogenních změn. Tudíž snížení exprese endoglinu po podávání statinů by mohlo představovat další z možných mechanismů, jak statiny mohou ovlivňovat aterogenní proces. Tuto hypotézu bude však nutno ještě ověřit v dalších experimentech.



## 12 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium exprese vybraných markerů endoteliální dysfunkce VCAM-1 a endoglinu v cévní stěně u apoE-deficientního kmene myši po podávání standardní diety. Exprese těchto markerů byla sledována v oblasti aortálního sinu a aortálního oblouku. Pomocí imunohistochemických a stereologických metod byly hodnoceny změny exprese VCAM-1 a endoglinu po čtyřtýdenním podávání atorvastatinu.

Tato diplomová práce prokázala, že atorvastatin nesnižuje hladinu cholesterolu u apoE-deficientního myšního modelu aterosklerózy.

Expresa endoglinu VCAM-1 byla detekována u všech skupin zvířat v endotelu aortálního sinu a aortálního oblouku a v kapilárách a malých cévách myokardu.

Čtyřtýdenní podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu snížení endoteliální exprese jak endoglinu tak i VCAM-1 ve srovnání s kontrolní skupinou.

Výsledky práce tedy potvrdily protizánětlivé účinky atorvastatinu na cévní endotel a zároveň naznačily jeho další účinky na signalizaci TGF-beta, přičemž tyto účinky budou ještě dále sledovány.

## 13 SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ

- ALBELDA, S. M. (1993) The role of cell adhesion molecules in asthma--an overview. *Agents Actions Suppl* 43: 141-50
- ANDREJAK, M., GRAS, V., MASSY, Z. A., CARON, J. (2003) [Adverse effects of statins]. *Therapie* 58: 77-83
- BEHR-ROUSSEL, D., RUPIN, A., SIMONET, S., BONHOMME, E., COUMAILLEAU, S., CORDI, A., SERKIZ, B., FABIANI, J. N., VERBEUREN, T. J. (2000) 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* 102: 1033-8
- BLANKENBERG, S., BARBAUX, S., TIRET, L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170: 191-203
- BOBRYSHV, Y. V., CHERIAN, S. M., INDER, S. J., LORD, R. S. (1999) Neovascular expression of VE-cadherin in human atherosclerotic arteries and its relation to intimal inflammation. *Cardiovasc Res* 43: 1003-17
- BOURDEAU, A., DUMONT, D. J., LETARTE, M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104: 1343-51
- BOYLE, J. J. (2005) Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 63-8
- BUSSE, R., FLEMING, I. (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33: 181-94
- CALABRO, P., YEH, E. T. (2005) The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol* 20: 541-6
- CORRADO, E., MURATORI, I., TANTILLO, R., CONTORNO, F., COPPOLA, G., STRANO, A., NOVO, S. (2005) Relationship between endothelial dysfunction, intima media thickness and cardiovascular risk factors in asymptomatic subjects. *Int Angiol* 24: 52-8
- CORSINI, A., RAITERI, M., SOMA, M. R., BERNINI, F., FUMAGALLI, R., PAOLETTI, R. (1995) Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Am J Cardiol* 76: 21A-28A
- DANDONA, P., ALJADA, A., CHAUDHURI, A., BANDYOPADHYAY, A. (2003) The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2422-9
- FISHMAN, A. P. (1982) Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci* 401: 1-8
- GUNDERSEN, H. J., BENDTSEN, T. F., KORBO, L., MARCUSSEN, N., MOLLER, A., NIELSEN, K., NYENGAARD, J. R., PAKKENBERG, B., SORENSEN, F. B., VESTERBY, A., ET AL. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 96: 379-94
- HASSIG, A., WEN-XI, L., STAMPFLI, K. (1996) The pathogenesis and prevention of atherosclerosis. *Med Hypotheses* 47: 409-12
- HOFKER, M. H., VAN VLIJMEN, B. J., HAVEKES, L. M. (1998) Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 137: 1-11
- CHENG, T. O. (2005) Obesity, like atherosclerosis, starts early in life. *Bmj* 331: 1145
- IYAMA, K., HAJRA, L., IYAMA, M., LI, H., DI CHIARA, M., MEDOFF, B. D., CYBULSKY, M. I. (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular

- adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 85: 199-207
- JANG, Y., LINCOFF, A. M., PLOW, E. F., TOPOL, E. J. (1994) Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24: 1591-601
- JAWIEN, J., NASTALEK, P., KORBUT, R. (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-17
- JONKER, L., ARTHUR, H. M. (2002) Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev* 110: 193-6
- JOSEPH-SILVERSTEIN, J., SILVERSTEIN, R. L. (1998) Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest* 16: 176-82
- KORNACEWICZ-JACH, Z. (2003) [Early diagnosis of atherosclerosis in clinical practice. Who, when and how should be examined]. *Kardiol Pol* 58: 227-31
- LAROSA, J. C. (2001) Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. *Am J Cardiol* 88: 291-3
- LEPOR, N. E. (2002) Triglycerides and coronary atherosclerosis: implications for treatment of mixed dyslipidemias. *Rev Cardiovasc Med* 3: 63-6
- LETAMENDIA, A., LASTRES, P., BOTELLA, L. M., RAAB, U., LANGA, C., VELASCO, B., ATTISANO, L., BERNABEU, C. (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 273: 33011-9
- LI, C., HAMPSON, I. N., HAMPSON, L., KUMAR, P., BERNABEU, C., KUMAR, S. (2000) CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J* 14: 55-64
- LIUBA, P., PESONEN, E., PAAKKARI, I., BATRA, S., ANDERSEN, L., FORSLID, A., YLA-HERTTUALA, S., PERSSON, K., WADSTROM, T., WANG, X., LAURINI, R. (2003) Co-infection with *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* results in vascular endothelial dysfunction and enhanced VCAM-1 expression in apoE-knockout mice. *J Vasc Res* 40: 115-22
- LUFT, F. C. (2002) Estrogen and atherosclerosis. *J Mol Med* 80: 133-4
- MALLAT, Z., GOJOVA, A., MARCHIOL-FOURNIGAULT, C., ESPOSITO, B., KAMATE, C., MERVAL, R., FRADELIZI, D., TEDGUI, A. (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89: 930-4
- MARECKOVA, Z., HELLER, S., HORKY, K. (1999) [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 45: 46-50
- MILLER, M. A., CAPPUCIO, F. P. (2002) Reducing cholesterol and atherosclerosis: the importance of cellular adhesion molecules? *Qjm* 95: 707-8
- MIZIA-STEC, K., ZAHORSKA-MARKIEWICZ, B., GOLISZEK, L. (2003) [Adhesion molecules: atherosclerosis and coronary artery disease]. *Przegl Lek* 60: 147-50
- MUNRO, J. M., COTRAN, R. S. (1988) The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 58: 249-61
- NACHTIGAL, P., SEMECKY, V., KOPECKY, M., GOJOVA, A., SOLICHOVA, D., ZDANSKY, P., ZADAK, Z. (2004) Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 200: 219-29
- OBREO, J., DIEZ-MARQUES, L., LAMAS, S., DUWELL, A., ELENO, N., BERNABEU, C., PANDIELLA, A., LOPEZ-NOVOA, J. M., RODRIGUEZ-BARBERO, A. (2004) Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* 14: 301-10

- RAAB, U., LASTRES, P., AREVALO, M. A., LOPEZ-NOVOA, J. M., CABANAS, C., DE LA ROSA, E. J., BERNABEU, C. (1999) Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Lett* 459: 249-54
- SHIH, J. C., PULLMAN, E. P., KAO, K. J. (1983) Genetic selection, general characterization, and histology of atherosclerosis-susceptible and -resistant Japanese quail. *Atherosclerosis* 49: 41-53
- SCHROEDER, E. B., LIAO, D., CHAMBLESS, L. E., PRINEAS, R. J., EVANS, G. W., HEISS, G. (2003) Hypertension, blood pressure, and heart rate variability: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Hypertension* 42: 1106-11
- SPARROW, C. P., BURTON, C. A., HERNANDEZ, M., MUNDT, S., HASSING, H., PATEL, S., ROSA, R., HERMANOWSKI-VOSATKA, A., WANG, P. R., ZHANG, D., PETERSON, L., DETMERS, P. A., CHAO, Y. S., WRIGHT, S. D. (2001) Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 115-21
- STANCU, C., SIMA, A. (2001) Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 5: 378-87
- STEBBENS, W. E. (2002) Relevance of hypercholesterolemia to fetal and pediatric atherosclerosis. *Pediatr Pathol Mol Med* 21: 259-78
- STEINBERG, D. (2005) Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part II: the early evidence linking hypercholesterolemia to coronary disease in humans. *J Lipid Res* 46: 179-90
- THORNGATE, F. E., STROCKBINE, P. A., ERICKSON, S. K., WILLIAMS, D. L. (2002) Altered adrenal gland cholesterol metabolism in the apoE-deficient mouse. *J Lipid Res* 43: 1920-6
- TIAN, J., PEI, H., JAMES, J. C., LI, Y., MATSUMOTO, A. H., HELM, G. A., SHI, W. (2005) Circulating adhesion molecules in apoE-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 1102-7
- VIRMANI, R., BURKE, A. P., KOLODZIE, F. (2006) Morphological characteristics of coronary atherosclerosis in diabetes mellitus. *Can J Cardiol* 22 Suppl B: 81B-4B
- VLISSARA, H., FUH, H., DONNELLY, T., CYBULSKY, M. (1995) Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* 1: 447-56
- ZIESKE, A. W., MCMAHAN, C. A., MCGILL, H. C., JR., HOMMA, S., TAKEI, H., MALCOM, G. T., TRACY, R. E., STRONG, J. P. (2005) Smoking is associated with advanced coronary atherosclerosis in youth. *Atherosclerosis* 180: 87-92
- ZOCCALI, C. (2006) Endothelial dysfunction and the kidney: emerging risk factors for renal insufficiency and cardiovascular outcomes in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 17: S61-3