

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

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**Farmakologické ovlivnění aterogeneze u experimentálních
zvířecích modelů aterosklerózy**

Disertační práce

Mgr. Jana Rathouská

Školitel disertační práce:

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za to, že se mě ujal a vedl mě v průběhu postgraduálního studia. Díky své péči a entuziasmu mě posunul v poznání zase o krok dál. Děkuji také svým kolegům a přátelům z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kteří mi pomáhali při tvorbě publikací a spolupracovali se mnou na výzkumných projektech.

Děkuji také za finanční podporu grantovým projektům GAUK 129208/C, 137310/C, 300811/C, 300911/C, SVV-2014-260-064, Výzkumnému záměru MŠMT ČR 002162082 a Výzkumnému projektu MZO 00179906.

Mé velké poděkování dále patří PharmDr. Petře Fikrové, Ph.D. za empatii, oporu a vzájemnou motivaci v práci, studiu, ale i osobním životě. Zároveň tímto děkuji i mé rodině a blízkým za podporu a trpělivost v průběhu celého studia.

Tuto práci a poděkování bych pak ráda věnovala Bc. Máje Hopfingerové (*1989 - †2014), která nám pomohla pochopit, co je v životě opravdu důležité.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Jana Rathouská

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Mgr. Jana Rathouská

Školitel: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Název disertační práce: Farmakologické ovlivnění aterogeneze u experimentálních zvířecích modelů aterosklerózy

Ateroskleróza je pozvolný zánětlivý proces v arteriální stěně, jenž je jako součást kardiovaskulárních chorob hlavním zdrojem morbidity a mortality vyspělého světa. Hledání možností léčby aterosklerózy však vyžaduje nejprve detailní poznání patogeneze samotného onemocnění. Jednu z možností studia patogeneze aterosklerózy nabízí využití myších modelů, které umožňují řadu intervencí, jež by v humánní medicíně byly neakceptovatelné. Užitím diety s vysokým obsahem lipidů jsme schopni pružně navodit změny lipidového spektra u myši, přičemž cílenou genetickou manipulací může být navíc dosaženo značně pokročilých plátů v relativně krátkém časovém horizontu. Rovněž lze u myších modelů do procesu aterogeneze s výhodou zasáhnout podáním některých hypolipidemik, například léčiv ze skupiny statinů, které byly v našich studiích reprezentovány atorvastatinem. Sledováním reaktivity cévy na podání atorvastatinu pak získáme další údaj (kromě vlivu na hladiny lipidů), který může poodhalit některé účinky statinu na lipidech nezávislých, tzv. pleiotropních, jež se dostávají do popředí zájmu zejména v posledních letech.

Během procesu aterogeneze dochází v organismu k relativně komplexním změnám na imunologické, morfologické a funkční úrovni a je doprovázen složitou signalizací mezi buňkami, které se daného procesu účastní. Jedna z významných úloh v procesu aterogeneze je pak připisována cytokinu TGF- β a jeho signalizaci, která i přes známky ateroprotekce dosud nebyla plně objasněna, včetně úlohy receptorů TGF- β , které hrají v procesu aterogeneze zřejmě zásadní roli.

Klíčovým tématem publikací v této souhrnné disertační práci byla úloha endoglinu (TGF- β receptoru III, ENG) a jeho signalizace v aortě vybraných myších modelů aterosklerózy, s přihlédnutím k hladinám jeho sérové formy (odštěpené ze tkáně) a

případného vlivu atorvastatinu na tyto procesy. V aterosklerotické aortě apoE/LDLR deficientních myší byl endoglin popsán jako významný TGF- β receptor s potenciálem ateroprotekce, zejména díky vlivu na produkci eNOS a VEGF. Naopak sérová forma tohoto proteinu (sENG) byla označena za potenciálně negativní marker aterosklerotického procesu. Studium účinku atorvastatinu na apoE/LDLR deficientním modelu odhalilo kromě vlivů na sérové lipidy také schopnost extralipidového působení ve smyslu redukce velikosti aterosklerotických plátů, zvýšení exprese potenciálně ateroprotektivních molekul TGF- β signalizace (kaskád ENG/ALK-5/Smad2/eNOS a ENG/ALK-1/Smad1/VEGF) a redukce hladin sérového endoglinu.

Studie dvou myších modelů s rozdílnou predispozicí k ateroskleróze (C57BL/6J vs. C3H/HeJ) prokázala sníženou citlivost aorty C3H/HeJ ateroprotektivního kmene k expresi zánětlivých (adhezních) molekul P-selektin, VCAM-1, ICAM-1 a poukázala na možný podíl endoglinu na zvýšení exprese eNOS v aortě tohoto kmene, oproti C57BL/6J senzitivnímu kmeni.

Histologická studie s apoE deficientním modelem myší zhodnotila extrakardiální úsek aorty za relevantní při studiu aterosklerotického procesu, oproti oblasti aortálního sinu, která změny endoglinu v průběhu aterogeneze neodráží a má pravděpodobně vztah spíše k vývoji srdce a chlopní. Vzhledem k tomu, že jsme nepozorovali koexpresi endoglinu s adhezními molekulami P-selektin a VCAM-1, domníváme se, že endoglin se nepodílí na akumulaci leukocytů v aortální stěně u apoE deficientního modelu v průběhu aterogeneze.

Shrnutím role endoglinu v aterogenezi v přehledovém článku, který zahrnoval také výsledky některých výše uvedených studií, lze usoudit, že role TGF- β receptoru III (ENG) v aterogenezi se spíše jeví jako ateroprotektivní. Naproti tomu úloha sérové formy tohoto proteinu (sENG) se zdá být nadějná z hlediska sledování hladin jakožto markeru závažnosti aterosklerotického procesu. Implementace těchto závěrů do humánní medicíny a jejich využití například v kontextu účinnosti statinové terapie však ještě stále vyžadují hledání hlubších souvislostí.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Mgr. Jana Rathouská

Supervisor: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Pharmacological influence on atherogenesis in experimental animal models of atherosclerosis

Atherosclerosis is a slow inflammatory process in arterial walls which is, as a part of cardiovascular diseases, the main source of morbidity and mortality in developed countries. However, searching for the possibilities of atherosclerosis treatment requires detailed knowledge of pathogenesis of the disease itself. The use of mouse models offers one of the possibilities of studying the pathogenesis of atherosclerosis, which enables a number of interventions that would not be acceptable in human medicine. By using the high content lipid diet, we are able to induce the changes of lipid spectrum in mice. Moreover, if a targeted genetic manipulation is used, one can reach considerably advanced plaques in a relatively short time period. It is also possible to interfere in the process of atherogenesis in mouse models by using some hypolipidemic drugs, for example from the statin group that were represented in our studies by atorvastatin. By observing the vessel's reactivity to atorvastatin dosage, one can obtain another figure (besides the influence on the level of lipids), that may reveal some lipid-independent effects of statin, so-called pleiotropic effects, which are getting into the forefront especially over the last years.

In the process of atherogenesis, there are relatively complex changes on the immunological, morphological and functional levels in the organism, accompanied by complex signaling between cells that are involved in the process. One of the significant roles in the process of atherogenesis is attributed to TGF- β cytokine and its signaling, which despite of the signs of atheroprotection has not still been clarified, including the role of TGF- β receptors that apparently play the key role in the process of atherogenesis.

The role of endoglin (TGF- β receptor III, ENG) and its signaling in aorta in chosen mouse models of atherosclerosis, with the consideration to the levels of its serum form

(cleaved from the tissue), was the key topic of papers in this summary dissertation thesis. The pertinent influence of atorvastatin on these processes was taken into account as well. Endoglin was described as a significant TGF- β receptor with the potential of atheroprotection, especially in terms of the influence on the production of eNOS and VEGF, in the atherosclerotic aorta in apoE/LDLR deficient mice. On the other hand, the serum form of this protein (sENG) was identified as a potentially negative marker of the atherosclerotic process. The study of atorvastatin effect in the apoE/LDLR deficient model revealed, besides the influence on serum lipids, the ability of non-lipid effect in terms of the size reduction of atherosclerotic plaques, the expression increase of potentially atheroprotective molecules of TGF- β signaling (ENG/ALK-5/Smad2/eNOS and ENG/ALK-1/Smad1/VEGF pathways) and the reduction of serum endoglin levels.

The study of two mouse strains with a different predisposition to atherosclerosis (C57BL/6J vs. C3H/HeJ) proved a reduced aortic sensitivity in C3H/HeJ atheroprotective strain to the expression of inflammatory (adhesion) molecules P-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and showed a possible endoglin participation in the increase of eNOS expression in the aorta of this strain, compared to C57BL/6J sensitive strain.

The histological study with apoE-deficient mouse models evaluated the extra-cardiac part of aorta as a relevant one at studying atherosclerotic process, compared to the area of the aortic sinus, that does not reflect the changes of endoglin in the atherogenetic process and thus probably has a relation more likely to the cardiogenesis and heart valves development. We showed that endoglin is not co-localized with cell adhesion molecules (P-selectin and VCAM-1) involved in atherosclerosis, suggesting it might not participate in leukocyte accumulation in aorta of apoE-deficient mice during atherogenesis.

By summarizing the role of endoglin in atherogenesis in the review article, that also included the results of some above-mentioned studies, it is possible to deduce, that the role of TGF- β receptor III (ENG) in atherogenesis more likely appears as atheroprotective. On the other hand, the role of serum form of this protein (sENG) seems to be hopeful in terms of observing the levels as the marker of atherosclerotic process severity. However, the implementation of these conclusions into human medicine and its use e.g. in the context of the efficiency of statin therapy, still requires a search for deeper understanding.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALK	receptor activin-like kinázy
AMK	aminokyselina
apoE	apolipoprotein E
B6	C57BL/6J kmen myší
CD105	endoglin (ENG)
CETP	cholesteryl ester transfer protein
C3H	C3H/HeJ kmen myší
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor, endoteliální hyperpolarizující faktor
eNOS	endoteliální NO syntáza
ET-1	endotelin-1
HDL	high density lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
HMG-CoA	3-hydroxyl-3-methylglutaryl koenzym A
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule, leukocytární adhezní molekula
IL-8	interleukin-8
iNOS	inducibilní NO syntáza
LDL	low density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě
LDLR	LDL receptor
LRP	LDL receptoru podobný lipoprotein
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1, monocytární chemotaktický protein-1
MMP	matrix metalloproteinases, matrix metalloproteinázy
NFκB	nukleární transkripční faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PDGF	platelet-derived growth factor, růstový faktor destiček
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule, destičková endoteliální adhezní molekula
sENG	sérový endoglin
SMAD	intracelulární proteiny participující na transdukcii signálu
TGF-β	transforming growth factor, transformující růstový faktor
TGF-βR	receptor pro transformující růstový faktor

TNF- α (TNF)	tumour necrosis factor- α , tumor nekrotizující faktor- α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule, buněčná adhezní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor, cévní endoteliální růstový faktor
VLDL	very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě

Obsah

1. ÚVOD	12
2. TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1. Ateroskleróza a principy rozvoje.....	14
2.1.1. Morfologická stavba intaktní arterie	14
2.1.2. Aterosklerotický proces – základní děje a hypotézy	15
2.1.3. Patogeneze aterosklerózy v souhrnu	17
2.2. Endotel za fyziologických a patologických podmínek.....	19
2.2.1. Role a funkce endotelu za fyziologických podmínek	19
2.2.2. Role eNOS a NO - důsledky jejich narušení.....	21
2.2.3. Role endotelu při zánětu	22
2.2.4. Endoteliální dysfunkce v souhrnu.....	24
2.3. Myší modely aterosklerózy a endoteliální dysfunkce.....	25
2.3.1. Význam myšího modelu, jeho výhody a nevýhody	25
2.3.2. Normocholesterolemické myší modely	26
2.3.3. Apolipoprotein E deficientní model myši	27
2.3.4. Apolipoprotein E – LDL receptor deficientní model myši	27
2.4. Transformující růstový faktor-β a složky jeho signalizace	29
2.4.1. TGF- β cytokin – charakteristika a funkce	29
2.4.2. TGF- β v aterogenezi.....	30
2.4.3. TGF- β receptory a role Smad proteinů.....	32
2.4.4. Endoglin – přídatný receptor pro TGF- β	37
2.5. Statiny – inhibitory HMG-CoA reductázy	44
2.5.1. Lipidové a nelipidové účinky statinů	44
2.5.2. Statiny a endoglin.....	45
3. CÍLE PRÁCE	46
4. KOMENTÁŘE K PRACÍM.....	47
4.1. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis.....	48
4.2. Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis	49
4.3. Endoglin is not co-expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice.....	50

4.4.	Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice	51
4.5.	Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice	52
4.6.	The role of endoglin in atherosclerosis.....	53
4.7.	Souhrnná diskuse a shrnutí.....	54
5.	ZÁVĚRY	57
6.	PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI	58
7.	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	60
8.	PREZENTACE NA KONFERENCÍCH.....	62
9.	POUŽITÁ LITERATURA	64
10.	SOUBOR PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	78

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavním zdrojem morbidity a mortality vyspělého světa. Základní klinickou manifestací kardiovaskulárních chorob je srdeční infarkt a mozková mrtvice, které reprezentují následky systémového cévního onemocnění známého jako ateroskleróza. Ateroskleróza je pozvolný zánětlivý proces v arteriální stěně, který může po několik let progredovat bez jakýchkoli klinických projevů. Příčinou tohoto jevu je, že většina fází výše zmíněného procesu vyžaduje dlouhodobější vystavení predispozičním faktorům. Jsou to pouze pozdější stádia tohoto onemocnění, která postupují relativně rychle a vedou k její klinické manifestaci.

Vzhledem k tomu, že proces rozvoje plátu se liší od klinických projevů onemocnění, ukazuje se, že terapie, která je účinná při rozvoji aterosklerotických lézí, nemusí být vždy efektivní také při prevenci klinických projevů tohoto onemocnění. Jedním ze základních důvodů je, že k terapii se obvykle přistupuje až po vytvoření těchto lézí (Keaney, 2000).

Řada randomizovaných klinických studií prokázala výrazný efekt léčiv ze skupiny inhibitorů HMG-CoA reductázy (statinů) z hlediska primární i sekundární prevence infarktu myokardu a cévní mozkové příhody zejména u pacientů s hypercholesterolemií. Z tohoto důvodu si tato léčiva již řadu let drží jedno z předních míst v preskripci pacientům v těchto rizikových skupinách. Novější data týkající se farmakodynamických parametrů léčiv ze skupiny statinů však hovoří nejen o jejich pozitivním vlivu z hlediska snižování plazmatických lipidů, ale přiklánějí se především k jejich komplexnějším, tzv. extralipidovým účinkům ve smyslu protektivního působení v cévní stěně nezávisle na hladinách lipidů.

Hledání možností léčby aterosklerózy a zdravotních rizik pro pacienta z ní plynoucích vyžaduje detailní poznání patogeneze samotného procesu. Jedním z prostředků studia procesu aterogeneze pak může být využití myších modelů tohoto onemocnění, které umožňuje řadu intervencí a postupů, jež by v humánní medicíně byly minimálně z etického hlediska vyloučené. Předkládaná disertační práce je pak souborem konkrétních výsledků a závěrů několikaletého studia na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty pod vedením doc. PharmDr. Petra Nachtigala, Ph.D., se zaměřením na patofyziologii aterosklerotického procesu v cévní stěně u experimentálních myších modelů aterosklerózy a možného zásahu do těchto procesů podáním atorvastatinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ateroskleróza a principy rozvoje

2.1.1. Morfologická stavba intaktní arterie

Stěna zdravé arterie se skládá ze tří definovaných koncentrických vrstev známých jako tunica intima (vnitřní vrstva), tunica media (střední vrstva) a tunica adventicia (vnější vrstva). Tyto tři vrstvy jsou dále vymezeny koncentrickými vrstvami elastinu, konkrétně vrstvou lamina elastica interna (mezi intimou a medií) a vrstvou lamina elastica externa (mezi medií a adventicií) (Keaney, 2000) (**Obr. 1**).

Povrch lumen arterie je tvořen jednou vrstvou těsně přiléhajících endotelových buněk, která leží na bazální membráně extracelulární matrix a je ohraničena vrstvou lamina elastica interna. Endotelové buňky jsou vzájemně vázány množstvím mezibuněčných spojů s různou funkcí (Dejana et al., 2000; Nishikawa et al., 2001). Vrstva endotelových buněk tvoří dynamickou bariéru mezi lumen cévy a stromatem cévní stěny a podílí se na celé řadě funkcí, včetně regulace cévního tonu, krevního srážení a prostupu leukocytů do stěny cévy (Keaney, 2000).

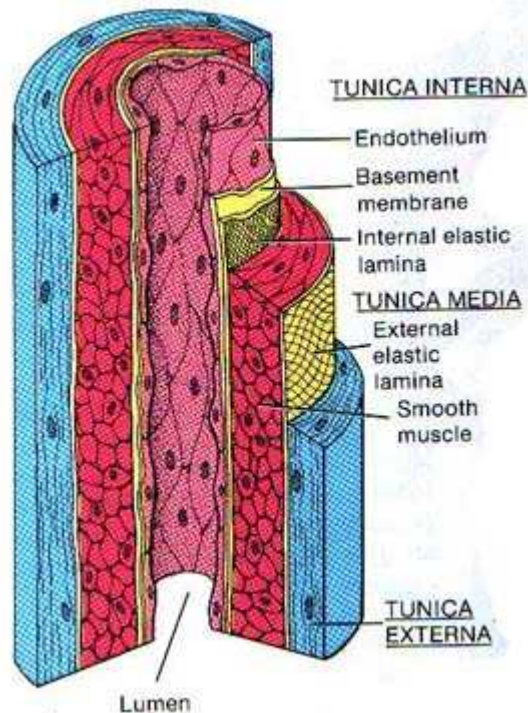
Oblast tunica media je rovněž tvořena jedním typem buněk – hladkých svalových buněk, které dle velikosti arterie tvoří jednu či více vrstev. Kromě buněčných spojů jsou buňky v medii mezi sebou fixovány pomocí extracelulární matrix, jež je tvořena převážně elastickými vlákny a kolagenem. Právě extracelulární matrix je ve stěně cévy produkována zejména hladkými svalovými buňkami. Vrstva medie se může lišit dle lokalizace/funkce dané arterie, aby dle potřeb zajistila pružný ráz cévy během srdeční diastoly (Keaney, 2000).

Adventicie, jakožto nejsvrchnější vrstva arterie, se typicky skládá z volného spojení složek elastinu, hladkých svalových buněk, fibroblastů a kolagenu a prochází jí rovněž složky nervového zakončení inervující cévu. Ač původně považována za pasivní vrstvu cévy, fibroblastům adventicie je v dnešní době připisována schopnost reakce na poškození cévní stěny (Keaney, 2000).

Obrázek 1. Struktura intaktní arterie

(Převzato z <http://www.mananatomy.com/basic-anatomy/arteries>) [vid. 2014-02-10]

basement membrane – bazální membrána, smooth muscle – hladká svalovina



2.1.2. Aterosklerotický proces – základní děje a hypotézy

Aterosklerotický proces se typicky manifestuje ve třech stupních – počáteční léze, rozvíjející se léze a rozvinutá ateroskleróza. Pro počáteční léze je charakteristické lokální ukládání drobných deposit lipidů známých pod morfologickým termínem lipidové proužky. Tyto proužky jsou reprezentovány ložisky makrofágů (naplněných lipidy) a hladkých svalových buněk v intimě cévy (Keaney, 2000).

Rozvíjející se léze, též známé jako tzv. fibro-lipidové léze, reprezentují další fázi aterosklerotického procesu, primárně se vyskytujícího v predispozičních oblastech, jakými jsou koronární arterie, břišní aorta a některé úseky karotid (Goubergrits et al., 2002). V tom případě jde již o fibrózní pláty, které jsou vyklenuté a tuhé, pokryté fibromuskulární vrstvou zvanou „čepička“.

Poslední fází je progresse léze do rozvinuté podoby, pro kterou jsou charakteristické oblasti fibrózní kalcifikace s již patrnými ulceracemi plátu. Takto rozvinuté léze jsou často spojeny se vznikem trombóz, embolizací a poškozením cílového orgánu, na jehož průběhu se nepodílí pouze progresse plátu jako takového, ale také řada funkčních změn ve stěně cévy (Keaney, 2000).

Rozvoj znalostí o ateroskleróze doprovázela řada spekulací a hypotéz, z nich některé jsou, s menšími či většími upřesněními, platné dodnes. Již v roce 1858 vyslovil Rudolf Virchow svou hypotézu o prostupu lipidů do cévní stěny s tvorbou jejich komplexů s mukopolysacharidy, jakožto počáteční děj v ateroskleróze (Virchow, 1989).

O více než sto let později, Ross a Glomset vyslovili svou hypotézu “response-to-injury“, která vycházela z předpokladu, že iniciálním krokem v rozvoji aterosklerózy je obnažení endotelu, jež vede dále k celé řadě kompenzačních dějů narušujících cévní homeostázu (Ross and Glomset, 1973). Jedním z faktorů byla například zvýšená adhezivita endotelu pro leukocyty a trombocyty a přesmyk prostředí cévy z antikoagulačního na prokoagulační. Předpokladem rovněž bylo uvolnění řady cytokinů, vasoaktivních látek a růstových faktorů z takto aktivovaných bílých krvinek a krevních destiček, což ještě dále umocňovalo zánětlivou odpověď. Ta byla dále charakterizována migrací a proliferací hladkých svalových buněk, jež v prozánětlivém prostředí dále podporovaly tvorbu aterosklerotické léze.

Ve snaze odhalit lipidové faktory vedoucí ke vzniku pěnových buněk, Brown a Goldstein v roce 1979 vyzorovali, že nikoli samotné LDL částice, ale modifikované LDL jsou schopné aktivovat makrofágy k tvorbě pěnových buněk (Goldstein et al., 1979). Jejich úsilí vedlo ke vzniku teorie oxidativní modifikace, jež předpokládala oxidativní změnu LDL částice přímo v cévní stěně. Díky tomu jsou následně tyto LDL kumulovány v intimě cévy, což vede k tvorbě pěnových buněk.

Poslední známou hypotézou je tzv. “response-to-retention“ předpokládající vazbu lipoproteinů v asociaci s proteoglykany v arteriální stěně, jakožto iniciální fázi celého procesu, bez podmínek oxidativní modifikace. Déle trávající vazba lipoproteinů pak v chronickém měřítku odráží fázi a závažnost aterogeneze, přičemž se v celém procesu předpokládá také součinnost komponent extracelulární matrix (Williams and Tabas, 1995).

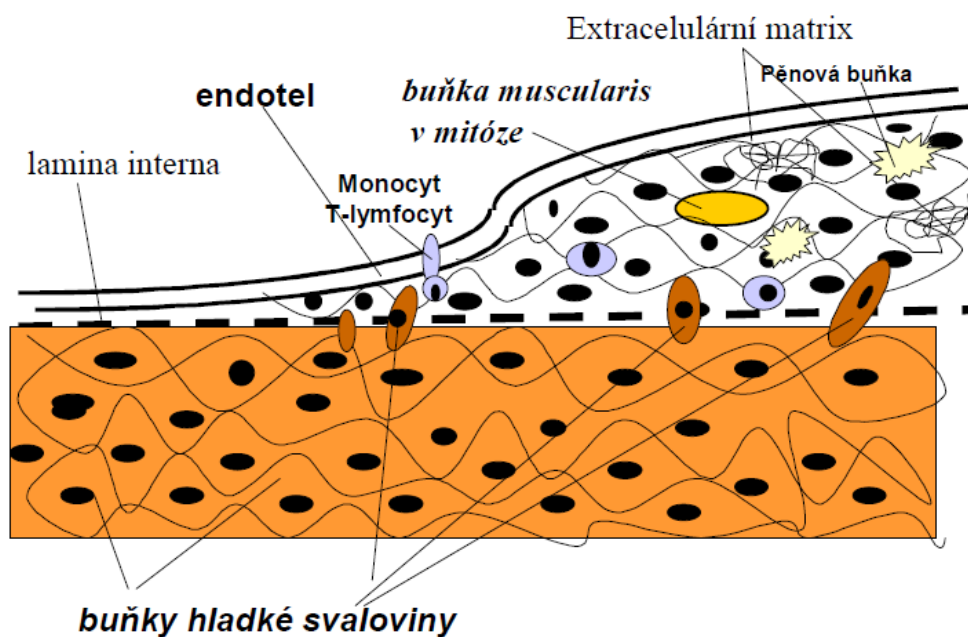
2.1.3. Patogeneze aterosklerózy v souhrnu

Ačkoli se řada současných teorií charakterizujících aterogenezi v některých aspektech liší, všechny mají zpravidla společného jmenovatele v podobě aktivace imunitních buněk a zánětlivé odpovědi cévy. V obecném měřítku proces aterogeneze odráží následující děje (Silbernagl, 2001):

- ❖ DYSFUNKCE ENDOTELU – role hemodynamiky, infekce, hypertenze, diabetes mellitus, LDL částic a jejich modifikace, oxidačního stresu apod.; zvýšená permeabilita endotelu a tvorba adhezních molekul
- ❖ TVORBA ZÁNĚTLIVÝCH PŮSOBKŮ cévním endotelem – aktivace monocytů (makrofágů) a T-lymfocytů v krvi a aktivace hladkých svalových buněk v medii
- ❖ MIGRACE IMUNITNÍCH A HLADKÝCH SVALOVÝCH BUNĚK do subendotelového prostoru a ztlušťování arterie (**Obr. 2**)
- ❖ PRŮNIK LIPOPROTEINOVÝCH ČÁSTIC do subendotelového prostoru a zvýšená lipoperoxidace
- ❖ TVORBA PĚNOVÝCH BUNĚK z fagocytujících makrofágů; další ztluštění cévy
- ❖ PROLIFERACE HLADKÝCH SVALOVÝCH BUNĚK a zvýšená tvorba extracelulární matrix
- ❖ NEKROTICKÁ A KALCIFIKUJÍCÍ DEPOZITA pěnových buněk v plátu
- ❖ ZVÝŠENÁ KOAGULACE v místě poškození cévy
- ❖ RUPTURA, KRVÁCENÍ DO PLÁTU, TROMBÓZA, EMBOLIE

Je třeba poznamenat, že jde o obecnou charakteristiku, přičemž výše zmíněné jevy se v mnoha ohledech prolínají nebo nenavazují striktně jeden na druhý. Konkrétní aspekty jednotlivých výše zmíněných fází, souvisejících s publikacemi v tomto komentovaném souboru, budou detailněji diskutovány dále.

Obrázek 2. Schéma ztlušťování stěny arterie v průběhu aterosklerózy
 (Převzato z <http://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf>) [vid. 2014-02-10]



2.2. Endotel za fyziologických a patologických podmínek

2.2.1. Role a funkce endotelu za fyziologických podmínek

Cévní endotel tvoří makromolekulární bariéru mezi krví a vlastní tkání cévy a hraje klíčovou roli v regulaci funkcí samotné cévy. Uvolňuje řadu biologicky aktivních látek důležitých pro procesy integrity a metabolismu cévní stěny, jakými jsou například regulace cévního tonu, permeability, koagulace a fibrinolýza či odpověď na zánětlivé podněty (Bombeli et al., 1997; Cines et al., 1998; Griendling and Alexander, 1996), tedy děje rovněž úzce související s aterosklerotickým procesem.

Hlavní podíl na integritě (resp. permeabilitě) endotelu mají mezibuněčné spoje, proteiny vázané na povrchu buněk, elektrostatický náboj na membránách endotelu a složení bazální membrány, přičemž za nejvýznamnější jsou považovány mezibuněčné spoje, které tvoří vlastní spojení mezi membránami dvou sousedících buněk (Lampugnani and Dejana, 1997; Lum and Malik, 1996). Mezibuněčné spoje jsou tvořeny transmembránovými proteiny, které jsou vázány s proteiny cytoplazmy a cytoskeletu a umožňují dynamický přístup substancí z krve do tkáně (Lampugnani and Dejana, 1997).

Endotel je charakterizován třemi základními typy mezibuněčných spojů:

- ❖ *Zonulae occludentes* (tight junctions) – tvořené transmembránovým proteinem occludinem, zajišťujícím velmi těsné spojení přiléhajících buněk a jejich ochranu před hemodynamickými vlivy (shear stress). Zvýšený počet těchto spojů byl detekován v hemodynamicky přetěžovaných oblastech aorty, naopak snížený počet spojů pozitivně koreluje s ukládáním lipidových deposit a rozvojem aterosklerózy (Krams et al., 1997; Lampugnani and Dejana, 1997; Yoshida et al., 1995).
- ❖ *Nexy* (gap junctions) – tvořené transmembránovými hydrofilními kanály (tzv. konexony) zajišťujícími výměnu iontů a molekul mezi sousedícími buňkami. Umožňují komunikaci mezi endotelovými buňkami navzájem a rovněž mezi endotelovými buňkami a hladkými svalovými buňkami či leukocyty (Goodenough et al., 1996). Podílejí se na koordinaci endotelových buněk při migraci a replikaci během procesu angiogeneze či hojení ran (Dejana et al., 1995; Lampugnani and Dejana, 1997).

❖ *Zonulae adhaerentes* (adherens junctions) – tvořené transmembránovými proteiny kadheriny, které se mohou vázat na cytoplazmatické proteiny a aktinová mikrofilamenta a zajišťovat tak vzájemné přiléhání buněk endotelu. Jsou považovány za základní spojení v mezibuněčném kontaktu endotelu a hrají roli též v regulaci buněčné migrace, růstu a diferenciaci (Dejana et al., 1995; Dejana et al., 1997; Lampugnani and Dejana, 1997).

Existuje řada faktorů, které ovlivňují výše uvedené spoje v endotelu a tím jeho permeabilitu. Řada endogenních mediátorů (histamin, trombin, faktory zánětu), ale i exogenních látek, včetně živin či mastných kyselin dodaných v dietě, je schopna propustnost endotelu zvýšit (Lum and Malik, 1994; Lum and Malik, 1996; Toborek et al., 1996; Toborek and Hennig, 1994; Toborek and Hennig, 1998). Rovněž také některé působky vyplavované samotným endotelem jsou schopné zvýšit jeho permeabilitu, jako například zvýšené hladiny NO (Murohara et al., 1998), endotelinu-1 (Helset et al., 1994) či angiotenzinu II (Williams et al., 1995).

Cévní endotel nabývá na významu také v regulaci cévního tonu, přičemž hraje duální roli z hlediska syntézy jak vasorelaxačních, tak i vasokonstričních faktorů. Neméně významnou roli rovněž hraje v dějích, jakými jsou hemostáza a fibrinolýza, či uvolňování proliferačních a antiproliferačních působků. Je třeba podotknout, že za fyziologických podmínek v endotelu převažují vasodilatační faktory nad vasokonstričními a povrch endotelu je netrombogenní s rovnováhou proliferačních dějů. Přehled základních působků a substancí podílejících se na výše uvedených dějích shrnuje následující tabulka.

Tabulka 1. Vybrané autokrinní a parakrinní substance produkované endotelem - převzato z (Verma and Anderson, 2002)

ÚČINEK ENDOTELEM VYPLAVOVANÉ LÁTKY					
vasodilatační	vasokonstriční	antitrombogenní	trombogenní	antiproliferativní	proliferativní
NO	endotelin ET-1	NO	endotelin ET-1	NO	endotelin ET-1
prostacyklin	angiotenzin II	prostacyklin	radikály kyslíku	prostacyklin	angiotenzin II
hyperpolarizující faktor EDHF	tromboxan A ₂	aktivátor plazminogenu	inhibitor aktivátoru plasminogenu PAI-1	transformující růstový faktor TGF-β	radikály kyslíku
bradykinin	prostaglandin H ₂	protein C	tromboxan A ₂	heparin sulfát	destičkový růstový faktor PDGF
adrenomedulin		inhibitor tkáňového faktoru	fibrinogen		fibroblastový růstový faktor
natriuretický peptid typu C			tkáňový faktor		inzulinu podobný růstový faktor
			von Willebrandův faktor		interleukiny

2.2.2. Role eNOS a NO - důsledky jejich narušení

Oxid dusnatý (NO) je hlavním vasorelaxačním faktorem produkovaným endotelovými buňkami (Vanhoutte, 1997). V endotelu je syntetizován z L-argininu za pomoci endoteliální NO syntázy (eNOS), jejíž gen je regulován konstitučně, přičemž samotný protein je vázán na membráně buněk a jeho aktivita je ovlivňována fosforylací a následnou translokací do cytosolu buňky (Cannon, 1998; Kerwin et al., 1995).

Bazální sekrece NO endotelovými buňkami je zodpovědná za aktivní vasodilatační tonus cévy. Takto vzniklý NO má poločas 3-5 sekund (Moncada et al., 1991) a lehce difunduje skrz endotel do hladkých svalových buněk, kde způsobuje inhibici kontraktilních mechanismů, což vede k vasorelaxaci (Boger et al., 1996).

NO je také uvolňován do cirkulace, kde může po čas své biologické aktivity působit na leukocyty a inhibovat jejich adhezi k endotelu (Vanhoutte, 1997). Přestože je za příčinu tohoto jevu považována snížená exprese adhezních molekul, je třeba upozornit, že NO není schopen zabránit expresi například ICAM-1 při stimulaci endotelu za přítomnosti lipopolysacharidů (Biffi et al., 1996; Spiecker et al., 1997). Oxid dusnatý je rovněž schopen inhibovat agregaci a aktivaci destiček a také může přispívat k fibrinolytickým dějům (Gryglewski, 1995). Rovněž se podílí na tlumení migrace a proliferace hladkých svalových buněk (Janssens et al., 1998).

Za nejvýznamnějšího fyziologického aktivátora eNOS je považován shear stress (Cannon, 1998). Exprese tohoto enzymu je rovněž stimulována TGF- β cytokinem či vysokými hladinami glukózy, naopak prozánětlivý cytokin TNF či LDL částice jsou považovány za inhibitory této exprese (Forstermann and Kleinert, 1995; Vidal et al., 1998).

Narušení produkce NO bývá pozorováno u řady kardiovaskulárních onemocnění, včetně aterosklerózy, hypercholesterolemie, diabetes mellitus, či hypertenze (Cannon, 1998; Cardillo and Panza, 1998). Je známo, že u zvířat krměných cholesterolovou dietou a na lidských aterosklerotických cévách je vasorelaxační schopnost arterií výrazně narušena a koreluje se závažností těchto lézí (Kojda et al., 1998; Otsuji et al., 1995). Poškození bazální produkce eNOS, a tedy NO, rovněž vede ke zvýšení permeability cévního endotelu, což dále přispívá k dysfunkci endotelu (Baldwin et al., 1998; He et al., 1997).

2.2.3. Role endotelu při zánětu

Rozvoj zánětlivé reakce je za fyziologického stavu normální odpovědí endotelu například na poškození cévní stěny. Klíčovou úlohu v tomto ději zajišťuje řada adhezních molekul a cytokinů. Fyziologický význam této reakce souvisí s opravou struktury a obnovením funkce cévní stěny v rámci zachování homeostázy. Bylo například prokázáno, že myši s absencí adhezních molekul ze skupiny selektinů trpí opakovanými infekcemi (Frenette et al., 1996). Na druhou stranu, dlouhodobá hyperreaktivita endotelu ve prospěch prozánětlivé reakce spouštějící další kaskády imunitních dějů vede často k poškození tkáně a s ní související patologii cévního systému, jež v mnoha ohledech iniciuje rozvoj aterosklerózy (Hill and Whitten, 1997).

Mezi nejvýznamnější mediátory exprimované endotelem, které při zánětu zpravidla zajišťují komunikaci mezi buňkami endotelu a leukocyty (**Obr. 3**), řadíme:

❖ Selektiny

Počáteční interakce mezi endotelem a leukocyty vyžaduje relativně těsné přilnutí obou typů buněk, což ústí v tzv. „kutálení“ (rolling) leukocytů po endotelu (McIntyre et al., 1997), které je pak následováno adhezí a prostupem leukocytu přes endotel. Toto kutálení je zajišťováno adhezními molekulami ze skupiny selektinů (L-, P- a E-selektin), jež jsou dobře detekovatelné na aktivovaných endotelových buňkách (Jang et al., 1994). Syntéza daného typu selektinu závisí na konkrétním zánětlivém podnětu, přičemž bylo prokázáno, že E- a P-selektin lze detekovat na endotelu pokrývajícím aterosklerotické léze (Wood et al., 1993).

❖ Adhezní molekuly

Do této skupiny řadíme adhezní molekuly ze skupiny imunoglobulinů (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1). Zajišťují pevnou vazbu lymfocytů a monocytů na endotel. Jejich přítomnost však není limitována pouze na buňky endotelové, ale jejich syntézy jsou schopny také například hladké svalové buňky nebo makrofágy (Cybulsky et al., 1999; Dejana et al., 1997). Zvýšení syntézy adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1 podněcuje řada zánětlivých činitelů, jako například TNF či přítomnost oxidovaných LDL částic (Ahmad et al., 1998; Dustin et al., 1986; Libby and Galis, 1995), avšak výrazné změny exprese PECAM-1 v průběhu aterogeneze u lidí i zvířat některé studie nepotvrdily a lze

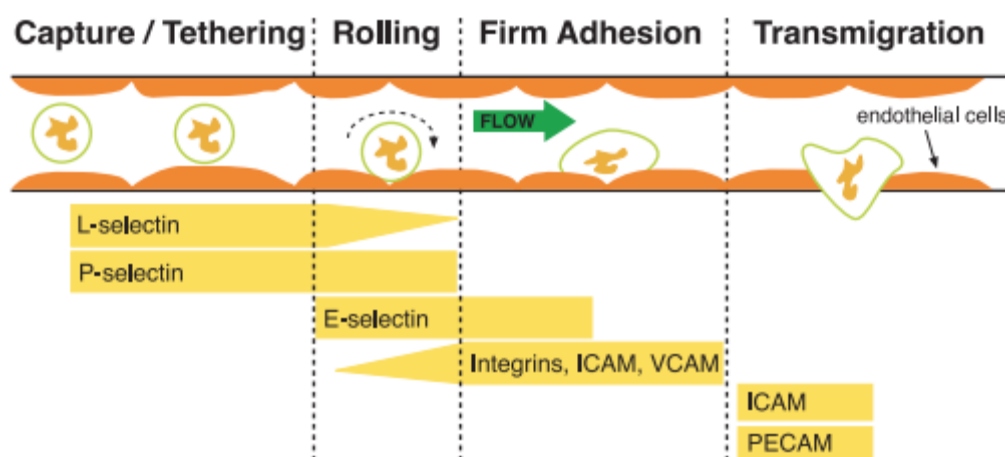
konstatovat, že role PECAM-1 v aterogenezi je zatím nejasná (Davies et al., 1993; Nakashima et al., 1998).

❖ **Zánětlivé cytokiny**

Rozsáhlá skupina mediátorů vyplavovaných v reakci na zánět, která rovněž zánětlivé prostředí podporuje. Nejsou proto vyplavovány pouze endotelovými buňkami, ale také leukocyty, zejména aktivovanými monocyty a makrofágy, což dále prohlubuje prozánětlivý stav v cévě (Tracey and Cerami, 1992). Z hlediska dysfunkce endotelu mezi nejvýznamnější řadíme IL-8 a MCP-1, které aktivně podněcují vstup leukocytů a monocytů do cévní stěny. MCP-1 je navíc dále produkován cévními fibroblasty a hladkými svalovými buňkami, které se na rozvoji aterogeneze také podílejí (Lukacs et al., 1995). Významná role je v tomto procesu rovněž připisována cytokinu TGF- β , jemuž patří samostatná kapitola.

Obrázek 3. Prostup leukocytu endotelem a zapojení zánětlivých mediátorů (Price and Loscalzo, 1999)

capture/tethering – zachycení, rolling – kutálení, firm adhesion – pevné přilnutí, transmigration – prostup endotelem



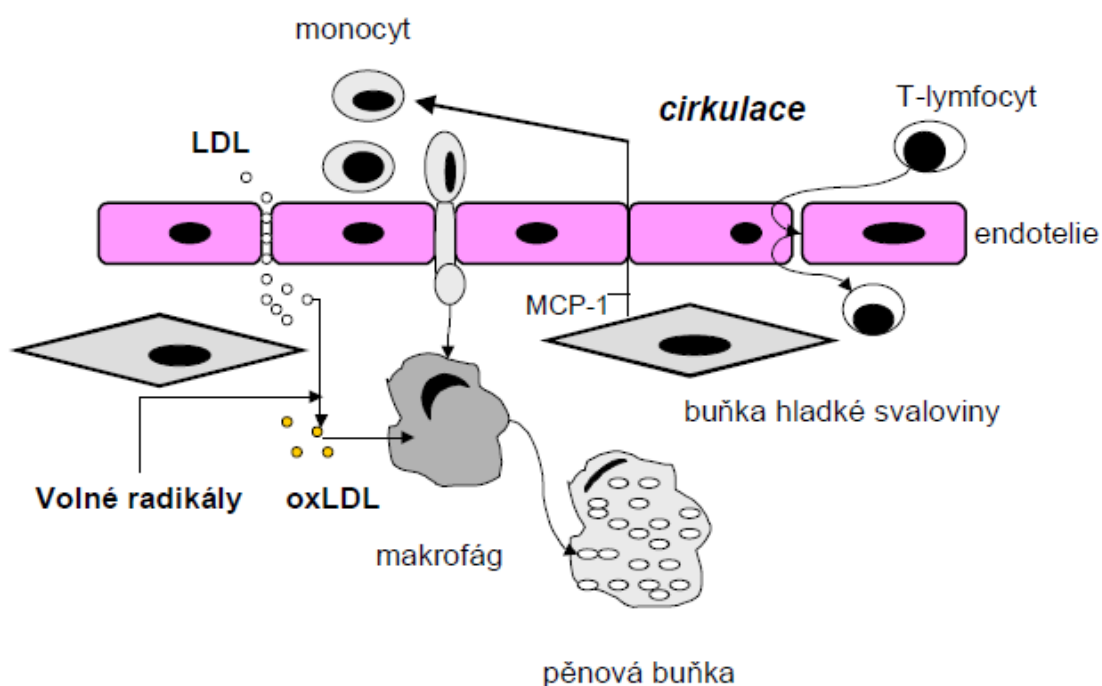
2.2.4. Endoteliální dysfunkce v souhrnu

Z předchozích podkapitol je patrné, že endotel je poměrně komplexní systém flexibilně reagující na celou řadu exogenních i endogenních podnětů, s relativně širokým rozmezím adaptace. Avšak stejně jako i jiné organizované systémy v těle, také endotel je schopen adaptace jen po určitou dobu a intenzitu trvání abnormálního podnětu.

Endoteliální dysfunkci chápeme jako komplexní narušení funkce endotelu déle trvajícím poškozujícím stimulem, které vede k narušení rovnováhy mezi vasokonstrikčními a vasodilatačními, prokoagulačními a antikoagulačními a růst stimulujícími a inhibujícími faktory. Následkem je pak k proaterogenní účinek se zvýšenými protrombogenními, vasokonstrikčními, hyperproliferačními a prozánětlivými vlastnostmi endotelu (Davignon and Ganz, 2004). Klíčové děje v počátečních fázích endoteliální dysfunkce, které byly diskutovány výše, schematicky zachycuje následující obrázek.

Obrázek 4. Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu

(Převzato z <http://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf>) [vid. 2014-02-10]



2.3. Myší modely aterosklerózy a endoteliální dysfunkce

2.3.1. Význam myšího modelu, jeho výhody a nevýhody

V současné době je myš nejčastěji užívaným zvířecím modelem pro studium aterosklerózy. Je třeba vzít do úvahy, že neexistuje žádný zvířecí model, který by byl schopen plně odrážet průběh aterogeneze ve svém rozsahu a podobě, se stejným lipidovým spektrem, s jakým se setkáváme v humánní ateroskleróze. Důvodem první volby myší jako modelu pro studium aterosklerózy však tkví především v relativně krátkém časovém horizontu pro rozvoj aterosklerotických lézí a také v možnosti relativně jednoduché genové manipulace pro snadné studium biologických dějů a interakcí, které podmiňují tento proces (Getz and Reardon, 2012).

Pro studium prací týkajících se myší aterosklerózy je třeba mít na paměti základní aspekty odlišnosti od aterosklerózy u lidí:

- ❖ Distribuce aterosklerotických lézí u obou druhů není totožná. Oproti obvyklým nejvíce predisponovaným místům u lidí (koronární a karotické tepny) se u myší léze nejvíce vyskytují v oblasti kořene aorty a aortálním oblouku. Mnoho klíčových znaků aterogeneze však zůstává společných (VanderLaan et al., 2004).
- ❖ Užití myších modelů závisí na vytvoření na HDL nezávislé hypercholesterolemie. Toho je dosaženo genetickou manipulací a vypnutím apolipoproteinu E (apoE) nebo také LDL receptoru (LDLR), což modelově simuluje lidské onemocnění familiární hypercholesterolemie, jež má v základu obdobnou charakteristiku lokalizace lézí v oblasti aorty, jako je tomu u myší (Hobbs et al., 1990).
- ❖ Myší modely obecně nevyvíjejí pláty až do fáze nestabilních plátů umocněných trombózou, jak je tomu v akutních kardiovaskulárních epizodách u lidí. Myší léze rovněž netvoří tzv. fibrózní čepičku, jako je tomu v případě chronické aterosklerózy u lidí (Bentzon and Falk, 2010).
- ❖ Tak zvaná “wild type“, tedy geneticky nemodifikovaná varianta myší, je obecně rezistentní vůči ateroskleróze (i přes odlišnosti v citlivosti jednotlivých kmenů), což plyne z faktu, že hlavní frakcí lipidového profilu u myší je HDL (oproti LDL u lidí), přičemž i samotné spektrum HDL částic se oproti člověku liší (Davidson et al., 2009; Miller, 1987).

- ❖ V neposlední řadě, “wild type“ varianty myši postrádají molekulu CETP (cholesterol ester transfer protein), jeden z proteinů plazmy, který v posledních letech budí nemalý zájem v humánní medicíně, jakožto potenciálně protektivní faktor aterosklerózy (Davidson, 2010).

Z hlediska této disertační práce se v následujících kapitolách zaměříme na tři myší modely pro studium endoteliální dysfunkce/aterogeneze, se kterými se v jednotlivých komentovaných publikacích můžeme setkat.

2.3.2. Normocholesterolemické myší modely

Variabilita v citlivosti k ateroskleróze mezi různými inbredními kmeny myší nám poskytuje možnost studia buněčných a molekulových interakcí během aterosogeneze (Paigen et al., 1987b). C57BL/6J (B6) a C3H/HeJ (C3H) jsou dvěma nejčastěji užívanými kmeny, které se liší v citlivosti k ateroskleróze a tvoří do jisté míry protipóly. Oba kmeny se liší nejen po genetické manipulaci a předvedení na apoE deficientní model, ale již ve své “wild type“ podobě, kdy při užití aterogenní diety zůstává C3H kmen resistantní k tvorbě lipidního proužkování a naopak B6 kmen vyvíjí první tuková depozita v oblasti aorty (Paigen et al., 1987b; Shi et al., 2000). Vzhledem k tomu, že aterogenní dieta způsobuje u B6 myši významnou redukci hladin HDL, ale nikoli u kmene C3H, dlouho se předpokládalo, že to jsou právě hladiny HDL, které jsou zodpovědné za různou predispozici těchto kmenů (Paigen et al., 1987a). Postupem času se ovšem ukazuje, že HDL není jediným faktorem v predispozici. Bylo rovněž zjištěno, že aterogenní dieta u B6 myši, na rozdíl od C3H, způsobuje dramatickou indukci exprese prozánětlivých genů v játrech (Liao et al., 1993) a obecně rozdílnou expresi proteinů oxidačního stresu a lipidového metabolismu (Park et al., 2004). Další souběžná pozorování ukázala, že nikoli hladiny cholesterolu, ale zejména endotelové buňky (Shi et al., 2000), makrofágy (Shi et al., 2004) a hladké svalové buňky (Miyoshi et al., 2006) hrají v predispozici mezi oběma kmeny zřejmě klíčovou roli.

2.3.3. Apolipoprotein E deficientní model myši

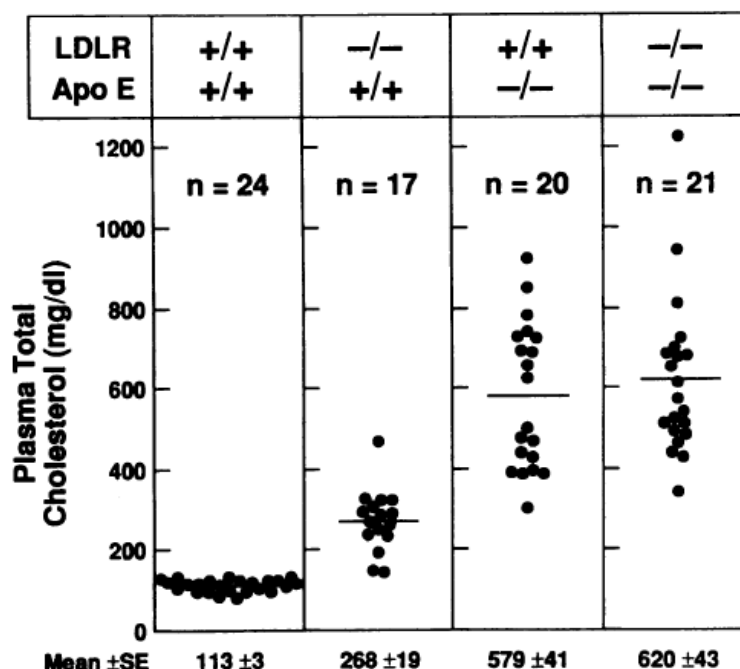
ApoE deficientní model patří k nejčastěji užívaným modelům, u nějž se díky cílenému vypnutí genu pro apolipoprotein E vyvíjí závažná hypercholesterolemie a spontánní ateroskleróza i na standardní dietě (Nakashima et al., 1994; Reddick et al., 1994). Apolipoprotein E je syntetizován v játrech a makrofázích a jako součást plazmatických lipoproteinů slouží k vazbě na buněčné povrchové receptory (LDLR a LRP), kde slouží k vychytávání aterogenních částic z cirkulace (Knowles and Maeda, 2000). Následkem snížené clearance těchto lipoproteinů z cirkulace jsou pro tento model typické vysoké hladiny LDL a zejména VLDL s následným rozvojem plátů od lipidního proužkování po komplexní léze typické pro humánní aterogenezi (Nakashima et al., 1994). Jedním z úskalí užití tohoto modelu jsou však samotné dramaticky vysoké hladiny cholesterolu (dosahující na vysokotukové dietě i hodnot 70mmol/l), který je ještě navíc větší měrou uložen ve VLDL, což je opět odlišnost od humánního spektra (Scalia et al., 2001). Při užití tohoto modelu (a případném farmakoterapeutickém zásahu) je také třeba mít na paměti, že samotný apolipoprotein E má v organismu, kromě funkce lipoproteinové clearance, také funkci antioxidantní, antiproliferativní, protizánětlivou a antiagregační (Ali et al., 2005; Davignon, 2005; Grainger et al., 2004; Raffai et al., 2005), což rovněž charakterizuje děje úzce spjaté s rozvojem aterosklerózy.

2.3.4. Apolipoprotein E – LDL receptor deficientní model myši

Současným vypnutím genů pro apoE a LDL receptor získáme kmen myši s dramatičtější rozvojem hyperlipidemie a aterosklerózy, než je tomu u samotného apoE deficientního modelu. Tento geneticky modifikovaný kmen se vyznačuje tvorbou významných aterosklerotických plátů již na standardní laboratorní (chow) dietě, bez nutnosti podávání diety aterogenní (Witting et al., 1999). Zajímavostí na tomto modelu je, že i přes zřetelnější aterosklerózu oproti apoE deficientním myším, při stejně nastavených podmínkách standardní diety není apoE/LDLR deficientní model schopen signifikantně přesáhnout hladiny hypercholesterolemie pozorované u apoE deficientních myši (Ishibashi et al., 1994) (**Obr. 5**). V souvislosti s prokazatelně zvýšenou remodelací cévní stěny společně s oslabenou schopností endotelu regulovat cévní tonus u apoE/LDLR deficientních myši oproti apoE

deficientnímu modelu (Bonthu et al., 1997) je zřejmé, že hladiny cholesterolu jsou jedním, nikoli však jediným faktorem podílejícím se na rozsahu aterosklerózy pozorovaného u tohoto kmene. Oproti zmiňovaným úskalím u apoE deficientního modelu z hlediska interpretace případného farmakoterapeutického zásahu je apoE/LDLR deficientní model s výhodou využíván ke sledování antiaterogenních účinků některých léčiv (Kampschulte et al., 2014; Nachtigal et al., 2008; Yamamoto et al., 2010).

Obrázek 5. Plazmatické hladiny cholesterolu u myší s různým genotypem na standardní dietě (Ishibashi et al., 1994)



2.4. Transformující růstový faktor- β a složky jeho signalizace

2.4.1. TGF- β cytokin – charakteristika a funkce

Transformující růstový faktor β (TGF- β) je multifunkční cytokin, který je zapojený do procesů proliferace, diferenciace, migrace a přežívání různých typů buněk (Roberts and Sporn, 1993). Je účinným regulátorem vývoje cévního systému a hraje klíčovou roli v procesech aterosklerózy a restenózy, zejména z hlediska regulace endotelové, hladké svalové, makrofágové, T-buněčné a kalcifikační odpovědi (Bobik, 2006). Hraje významnou roli jak v rané fázi embryogeneze, tak také v udržování homeostázy v pozdějším životě organismu (Goumans and Mummery, 2000; Massague, 2000).

TGF- β isoformy jsou exprimovány zejména endotelovými buňkami, hladkými svalovými buňkami, makrofágy a lymfocyty, přičemž právě vzájemná součinnost těchto buněk určuje jeho výsledný efekt (Bobik, 2006). U savců se vyskytují jeho tři isoformy - TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3, které se vyznačují jak překrývajícími se, tak také odlišnými funkcemi. Pro aktivitu tohoto cytokinu je typická vazba na jeho stejnojmenné transmembránové receptory typu I a II (Derynck and Zhang, 2003; ten Dijke and Hill, 2004) a propagace signálu pomocí transkripčních faktorů, tzv. Smad proteinů (Wieser et al., 1995).

Během angiogeneze se TGF- β uplatňuje ve smyslu aktivace mesenchymových buněk a jejich transformace v hladké svalové buňky vytvářející novou cévní stěnu (Hirschi et al., 1998) a podílí se i na jejich následné diferenciaci (Bobik, 2006).

Duální role TGF- β cytokinu je známa z hlediska proliferace endotelových buněk. Obecně nízké dávky tohoto cytokinu stimulují proliferaci a migraci endotelových buněk, zatímco vysoké tyto aktivity tlumí. Další činnosti TGF- β s ohledem na endotelové buňky zahrnují indukci jejich proteazové aktivity či remodelaci extracelulární matrix (Goumans et al., 2002; Lebrin et al., 2005). Byl rovněž prokázán vliv TGF- β na zvýšení exprese mRNA pro eNOS v endotelových buňkách, což může poukazovat na jeho protektivní vliv na endotel (Inoue et al., 1995). Defektní signalizace TGF- β v endotelu, konkrétně mutace v jeho receptoru I (v podtypu ALK-1) vede k onemocnění zvanému hereditární hemoragická teleangiektázie typu II (HHT-2), které se vyznačuje abnormální tvorbou cév a krvácivými stavy (Bobik, 2006).

Ve smyslu narušení cévní homeostázy byla prokázána zvýšená syntéza TGF- β 1 cytokinu v průběhu reparace cév (Shi et al., 1996; Wysocki et al., 1996). Následkem

poškození endotelu cévy dochází k degranulaci přítomných trombocytů a vyplavení vysokého množství tohoto cytokinu (Assoian and Sporn, 1986), který přispívá nejen k opravě cévy, ale může díky podpoře tvorby kolagenu a jeho akumulace vést rovněž k restenóze cévy (Bobik, 2006).

Z hlediska zánětlivé odpovědi jsou na působení TGF- β 1 vysoce citlivé makrofágy, které ho současně samy syntetizují (Ashcroft, 1999). TGF- β indukuje sekreci řady interleukinů, které mimo jiné podporují chemotaxi monocytů (Ashcroft, 1999) a jejich adhezi na kolagen během procesu zánětu (Wahl et al., 1993). Jeho význam v regulaci diferenciaci T lymfocytů byl prokázán studii, ve kterých narušení TGF- β signalizace vedlo k nekontrolovatelnému dělení T buněk, závažným autoimunitám a vystupňovaným zánětům (Gorelik and Flavell, 2000; Nakao et al., 2000).

Výše uvedené odstavce mimo jiné stručně shrnují účinky TGF- β z pohledu angiogeneze, odpovědi endotelu, zánětu a poškození cév, jež samy o sobě mohou být významnou součástí aterosklerózy. Naznačují také nutnost komplexního pohledu na efekty vyvolané tímto cytokinem, jak z pohledu typu zapojených buněk, tak konkrétních podmínek, za jakých cytokin plní své funkce.

2.4.2. TGF- β v aterogenezi

TGF- β cytokin hraje roli v regulaci řady nemocí a poruch, jakými jsou rakovina, vývojové vady a kardiovaskulární onemocnění (Blobe et al., 2000; Lebrin et al., 2005; Siegel and Massague, 2003; Waite and Eng, 2003), včetně aterosklerózy, kde je detekován v lidských i myších plátech (Mallat et al., 2001). Účinky TGF- β 1 v cévní stěně jsou komplexní a názory na jeho pozitivní či negativní roli v procesu aterogeneze se různí. Jeho zvýšené hladiny byly pozorovány v aterosklerotických lézích (Majesky et al., 1991; Nikol et al., 1992) a testy na zvířecích modelech opakovaně prokázaly, že experimentální zvýšení hladin tohoto cytokinu v arteriích vede k signifikantnímu nárůstu velikosti plátů, zejména z důvodu zvýšené akumulace složek extracelulární matrix (Majesky et al., 1991) doprovázené hyperplazií medie a intimy (Bahadori et al., 1995; Majesky et al., 1991; Nabel et al., 1993; Schulick et al., 1998), a naopak protilátky neutralizující TGF- β 1 jsou tuto hyperplazii schopny utlumit (Wolf et al., 1994). Průkazem schopnosti TGF- β stimulovat syntézu proteoglykanů v lidských hladkých svalových buňkách (Davignon and Ganz, 2004; Chen et

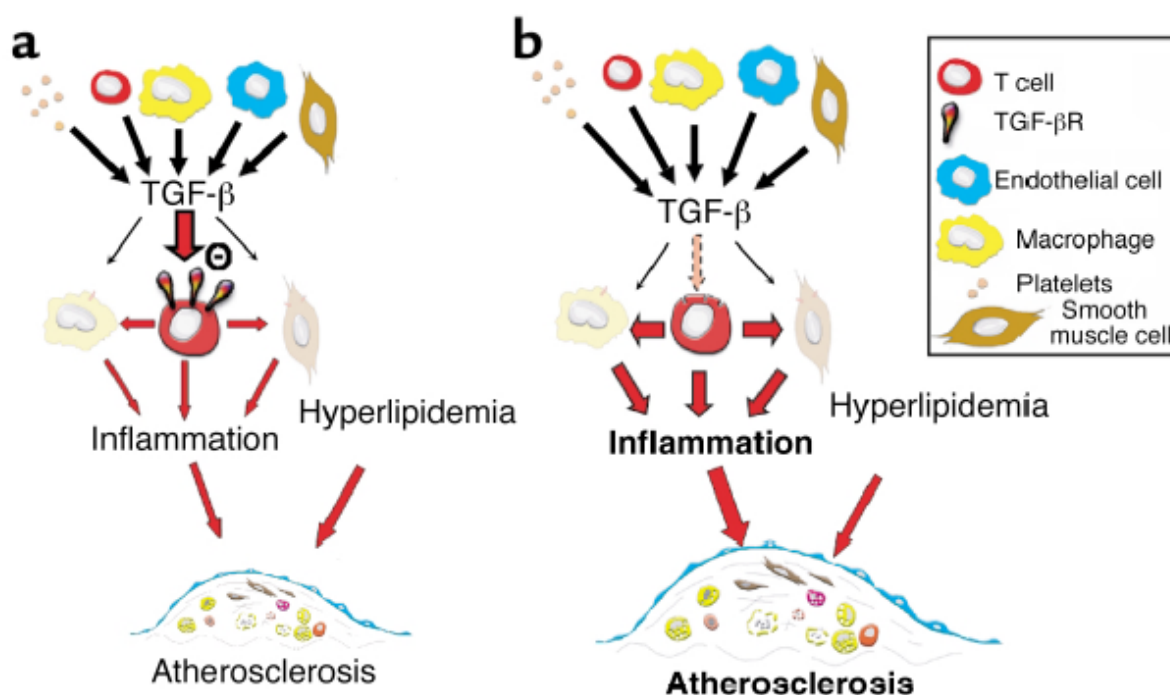
al., 1987) se navíc došlo k závěru, že jeho přítomnost v aterosklerotických plátech významně přispívá k tvorbě proteoglykanů schopných vychytávat lipoproteiny a podporovat jejich akumulaci v cévní stěně s následnou lipoperoxidací (Williams and Tabas, 1995). Tyto konečné produkty peroxidace pak mohou přispívat k indukci tvorby TGF- β v makrofázích (Leonarduzzi et al., 1997), což celý bludný kruh uzavírá.

Účinky TGF- β v procesu aterogeneze se nicméně zdají být mnohem komplikovanější a většina současných studií se přiklání k názoru, že TGF- β je spíše ateroprotektivním cytokinem. Vzhledem k faktu, že TGF- β stimuluje chemotaxi leukocytů (Ashcroft, 1999) a výše zmíněnou produkci proteoglykanů hladkými svalovými buňkami, je možné, že tyto aktivity vedou k migraci makrofágů a akumulaci lipidů v časných fázích aterosklerotického procesu. Na druhou stranu, vzhledem k tomu, že byla prokázána významná role tohoto cytokinu v produkci kolagenu v aterosklerotických lézích (Mallat et al., 2001), je možné, že také určuje rozsah, v jakém jsou pláty stabilizovány kolagenní fibrózní čepičkou. Je totiž rovněž prokázáno, že hladké svalové buňky ve stabilních plátech produkují zvýšené množství TGF- β (Cipollone et al., 2004) a je také potvrzeno, že ve fibrózních plátech dochází pod vlivem TGF- β k významné expresi genu pro tvorbu kolagenu, oproti plátům bohatým na makrofágy (tzv. fibro-lipidové léze), kde je odpověď na TGF- β (tvorba kolagenu) značně narušena (Kalinina et al., 2004).

Výše zmíněný pozitivní vliv TGF- β dále potvrzují zjištění, že narušení TGF- β signalizace zvyšuje zánětlivou reakci v cévě (**Obr. 6**), riziko krvácení do plátu (Lutgens et al., 2002), zvyšuje velikost plátu a rozvoj jeho nestability (Li et al., 2006; Robertson et al., 2003). Navíc TGF- β zmírňuje tvorbu pěnových buněk, zvyšuje efflux cholesterolu (Panousis et al., 2001), inhibuje expresi lipoproteinové lipázy, produkci prozánětlivé inducibilní formy NO syntázy (iNOS) (Werner et al., 2000) a tlumí remodelaci cévní stěny v průběhu aterogeneze (Blaha et al., 2008). Výše zmíněnými efekty tak přispívá spíše k tvorbě stabilní formy léze než k procesu aterogeneze jako takové.

Obrázek 6. Prozánětlivá aktivita T buněk v ateroskleróze a protektivní role TGF- β (Robertson et al., 2003)

a Prozánětlivá aktivita T buněk je tlumena účinkem TGF- β , **b** Při nedostatku funkčních receptorů pro TGF- β na T buňkách je inhibiční vliv cytokinu omezen a ateroskleróza se stupňuje. T cell – T buňka, TGF- β R – receptory TGF- β , endothelial cell – endotelová buňka, macrophage – makrofág, platelets – krevní destičky, smooth muscle cell – hladká svalová buňka, inflammation - zánět



2.4.3. TGF- β receptory a role Smad proteinů

TGF- β ligandy mají vysokou afinitu ke svým receptorům. Signalizace je započata tehdy, když se vytvoří komplex TGF- β cytokinu s jeho transmembránovými receptory I a II (TGF- β RI, TGF- β RII). Ve zjednodušeném schématu probíhá nejprve vazba na TGF- β RII a posléze spojení s TGF- β RI, jež ve finále vytvářejí heteromerní komplex (Wrana et al., 1994). Vzhledem k tomu, že oba receptory jsou po biochemické stránce serin/treonin kinázy, následuje fosforylace receptoru I receptorem typu II, jež vede ke konformační změně molekuly TGF- β RI. Tato změna pak vede k aktivaci tzv. Smad proteinů, které dále předávají signál do jádra buňky (Wieser et al., 1995).

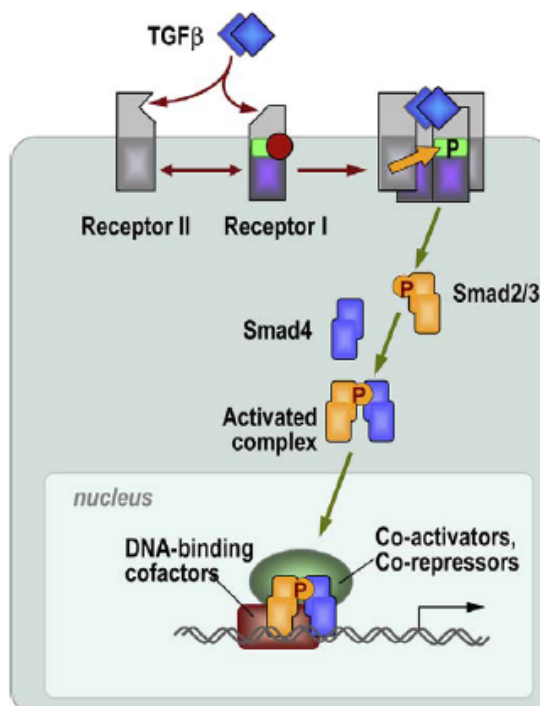
Smad proteiny jsou skupinou transkripčních koaktivátorů a korepresorů, jaderné efekторы TGF- β signalizace (Derynck and Zhang, 2003; ten Dijke and Hill, 2004) podílející se na genové expresi (Lebrin et al., 2005) (**Obr. 7**). V lidském a myším genomu je kódováno osm Smad proteinů, ale jen pět z nich (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 a Smad8) slouží jako substrát pro TGF- β receptory. Ty jsou známy pod souhrnným označením receptory regulované Smad proteiny, nebo také RSmad proteiny (Massague, 1998). Bylo prokázáno, že pláty fibrózní s vyšším obsahem kolagenu obsahují vyšší podíl Smad proteinů než pláty fibrolipidové (Kalinina et al., 2004).

Je však třeba poznamenat, že TGF- β receptory I a II neplní své funkce týkající se buněčné proliferace, diferenciace a přežití výhradně přes Smad proteiny, ale že své účinky uplatňují i mimo Smad signalizaci (Bobik, 2006).

TGF- β receptory se hojně nacházejí na membránách hladkých svalových buněk, makrofágů a T lymfocytů v lidských aterosklerotických plátech (Bobik et al., 1999). Vzhledem k tomu, že vůči TGF- β signalizaci mohou vystupovat nejen jako pozitivní regulátoři ve smyslu efektivní signalizace, ale rovněž jako negativní regulátoři ve smyslu inaktivace TGF- β jako takového (Grainger, 2007), je interpretace jejich účinku často složitá.

Obrázek 7. TGF- β signalizace a role Smad proteinů (Massague and Gomis, 2006)

Smad 4 má funkci pomocného Smad proteinu pro vykonání funkcí fosforylovaného komplexu Smad 2/3 v jádře. P – znak fosforylace



2.4.3.1. TGF- β receptor I a jeho role v aterogenezi

Do současnosti bylo v savčích buňkách rozpoznáno sedm typů TGF- β receptorů I, označovaných jako aktivin receptoru podobné kinázy (“activin receptor-like kinase“, ALK-1 až ALK-7) (de Caestecker, 2004; Miyazono et al., 2000). V endotelových buňkách je TGF- β cytokin vázaný na TGF- β receptor II schopen aktivovat dva různé typy receptoru I, konkrétně endotelově specifický ALK-1 a širěji se vyskytující ALK-5, jež mají opačné účinky na chování endotelových buněk (Lebrin et al., 2005).

U většiny typů buněk se TGF- β 1 váže na ubikvitně exprimovaný ALK-5, což aktivuje jaderné Smad2 a Smad3 proteiny (Massague and Gomis, 2006). U několika dalších buněčných typů, zejména endotelových buněk a mesenchymu (Panchenko et al., 1996; Roelen et al., 1997) tento cytokin aktivuje ALK-1, což vede k fosforylaci (aktivaci) Smad1, Smad5 a Smad8 proteinů (Goumans et al., 2002; Lebrin et al., 2005; Scherner et al., 2007). Některé vybrané efekty plynoucí z těchto aktivací budou diskutovány dále.

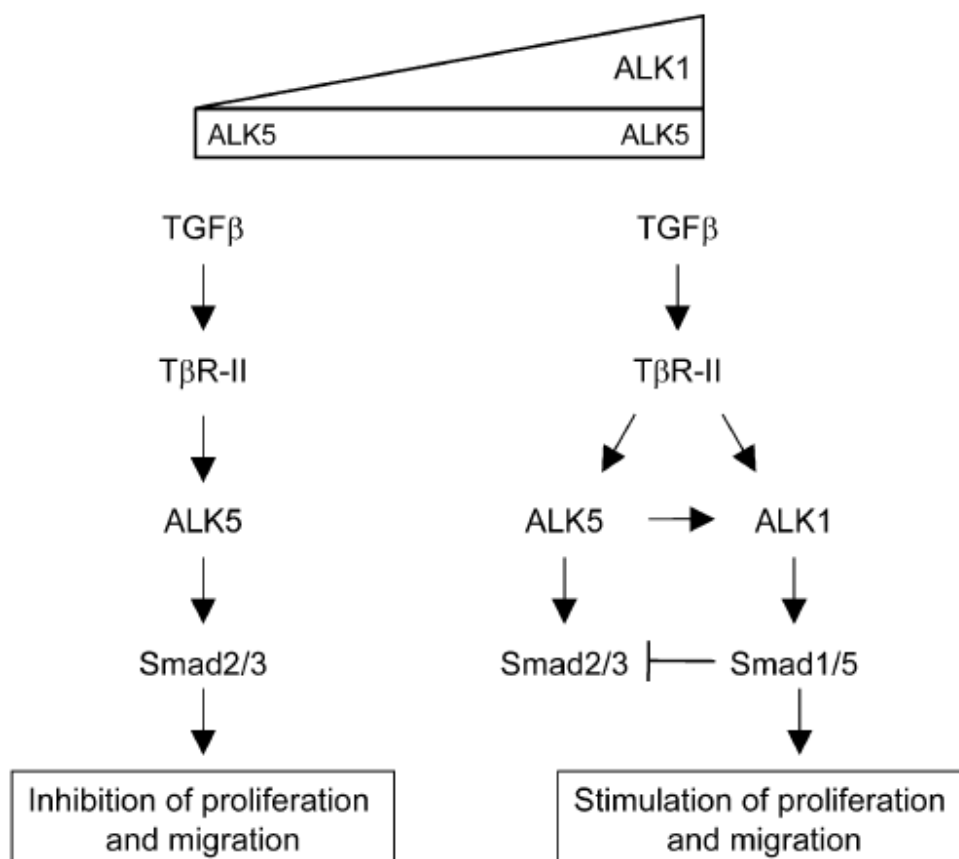
V obecném pohledu se aktivace TGF- β /ALK-1 signalizace podílí na stimulaci proliferace a migrace endotelových buněk (Valdimarsdottir et al., 2002), zatímco TGF- β /ALK-5 tyto procesy tlumí (Watabe et al., 2003) (**Obr. 8**). Z toho plyne, že každý z aktivovaných receptorů I podněcuje jinou formu genové exprese (Lebrin et al., 2005; Ota et al., 2002).

Na druhou stranu, studie signalizačních mechanismů mezi oběma receptory naznačují, že mezi ALK-1 a ALK-5 existuje určitá forma interakce a vzájemného přepínání (Bobik, 2006). Bylo zjištěno, že ALK-5 deficientní endotelové buňky nemají defektní pouze TGF- β /ALK-5, ale také TGF- β /ALK-1 signalizaci. Dále bylo prokázáno, že ALK-5 je důležitým faktorem pro vazbu ALK-1 na TGF- β receptorový komplex a dokonce, že kinázová aktivita ALK-5 je nezbytná pro aktivaci ALK-1. Dalším průkazem vzájemného působení je také fakt, že ALK-1 nejenže vyvolává efekty opačné k ALK-5 signalizaci, ale že tyto efekty přímo antagonizuje, a to na úrovni Smad proteinů, tj. na úrovni transkripce (Goumans et al., 2003).

O změnách exprese TGF- β receptoru I během aterogeneze je známo velice málo, přestože bylo prokázáno, že typ ALK-5 je syntetizován jak ve stěně zdravé cévy, tak v intimě fibro-lipidových plátů (Bobik et al., 1999). Hladké svalové buňky z plátů pak dominantně tvoří receptory typu I, přičemž tytéž buňky ve zdravé cévě exprimují spíše receptor II (McCaffrey et al., 1995). Buňky exprimující dominantně receptor typu I pak reagují na TGF- β signál intenzivní syntézou složek extracelulární matrix, což může přispívat ke stabilizaci plátu (Kalinina et al., 2004).

Přestože hladké svalové buňky syntetizují celou řadu typů receptorů I (Agrotis et al., 1996), většina impulzů TGF- β ve smyslu proliferace a diferenciace těchto buněk se zdá být regulována komplexem ALK-5/TGF- β RII (Bobik, 2006). Vliv endotelové ALK-1 signalizace se pak zdá být významný v období iniciace tvorby aterosklerotické léze, ve kterém toto působení ALK-5 na hladké svalové buňky částečně reguluje (Yao et al., 2007). V případě inhibice ALK-5 je pak TGF- β cytokin schopen v endotelu iniciovat proliferaci endotelových buněk, ovlivnit permeabilitu endotelu a také inhibovat expresi adhezních molekul (Bobik, 2006).

Obrázek 8. Schéma účinků TGF- β receptorů I na endotelové buňky (Goumans et al., 2003)
Poměr mezi expresí ALK-1 a ALK-5 udává výsledný efekt cytokinu na endotelové buňky.



2.4.3.2. TGF- β receptor II a jeho role v aterogenezi

Prozatím bylo identifikováno pět TGF- β receptorů II schopných fosforylace (aktivace) cytoplazmatické domény receptoru I (de Caestecker, 2004; Miyazono et al., 2000). Bylo prokázáno, že hladké svalové buňky získané z lidských plátů mají získanou mutaci v TGF- β receptoru II, což u nich způsobuje rezistenci k antiproliferativním a antiapoptotickým účinkům TGF- β (McCaffrey et al., 1995; McCaffrey et al., 1997). V souladu s tímto pozorováním bylo dále zjištěno, že mutace TGF- β RII u lidí skutečně narušuje TGF- β signalizaci, což vede k rezistenci k apoptóze a je spojováno s progresí aterosklerózy (McCaffrey, 2000; McCaffrey et al., 1997). McCaffrey a kol. rovněž zjistili, že oproti situaci ve zdravých cévách jsou hladké svalové buňky z aterosklerotických cév postiženy sníženou expresí TGF- β receptoru II bez výrazné změny v expresi receptoru I. Rovněž bylo popsáno, že oproti relativně konstantní syntéze receptoru I v plátech lidských cév je přítomnost receptoru II mnohem variabilnější a často zcela chybí v lézích koronárních a karotických arterií. Transfekce TGF- β receptoru II do takto postižených buněk pak částečně obnovuje jejich odpověď na TGF- β cytokin, což naznačuje, že signalizace jinak zůstává nenarušena (McCaffrey, 2000).

Jako protipól těmto pozorováním se však objevily studie, které tvrdí, že nejen TGF- β , ale i exprese jeho receptorů, jsou u poškozených arterií naopak významně zvýšeny, oproti zdravým cévám, u nichž je přítomnost cytokinu jen minimální a jeho receptory sotva detekovatelné (Ward et al., 1997). Obdobně Bobik a kol. detekovali významné zvýšení TGF- β receptoru II v potkaních karotických arteriích a potvrdili jeho signalizaci zejména v lipidových prouzcích a fibro-lipidových plátech (Bobik et al., 1999). Na buněčné úrovni byl v lidských plátech receptor II detekován zejména v buňkách endotelu, hladkých svalových buňkách a makrofázích (Piao and Tokunaga, 2006), což poukazuje na podíl v tomto procesu. Jeho přesná úloha je však doposud objasňována.

2.4.4. Endoglin – přídatný receptor pro TGF- β

2.4.4.1. Struktura endoglinu a jeho isoformy

Endoglin (CD105, TGF- β RIII, ENG) je homodimerním transmembránovým glykoproteinem tvořeným dvěma 95kDa podjednotkami spojenými disulfidickou vazbou (Cheifetz et al., 1992; Zhang et al., 1996). Skládá se z extracelulární domény tvořené 561 aminokyselinami (AMK), jednou transmembránovou doménou z 25 AMK a krátkou 47 AMK intracelulární doménou, která již není součástí signalizační domény (Gougos and Letarte, 1990).

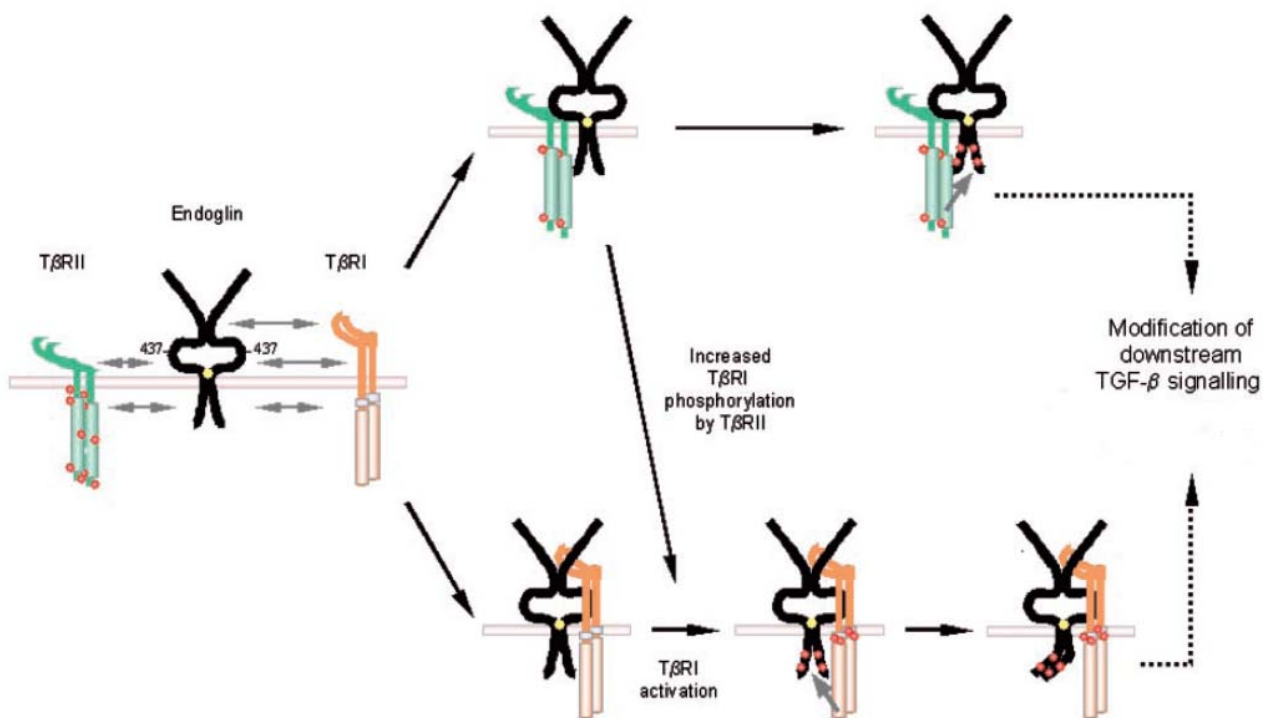
ENG v asociaci s TGF- β receptory váže TGF- β 1 a TGF- β 3 cytokin a je jakýmsi doplňkovým receptorem (Cheifetz et al., 1992; Zhang et al., 1996), avšak pro TGF- β signalizaci zřejmě nezbytným (Barrick et al., 2000). Během transdukce signálu se ENG pojí s TGF- β receptorem II (TGF- β RII) (Barbara et al., 1999) a reguluje nejen jeho aktivitu, ale také aktivitu obou receptorů I, tedy ALK-1 a ALK-5 (Guerrero-Esteo et al., 2002; Lebrin et al., 2004) (**Obr. 9**). Studie prokázaly, že ENG slouží jako substrát pro fosforylaci, kterou katalyzují TGF- β RII a ALK-5 (Guerrero-Esteo et al., 2002), zatímco schopnost ENG sloužit jako substrát ALK-1 dosud nebyla potvrzena (Koleva et al., 2006). ENG je fosforylován na molekulách AMK serinu a threoninu (Lastres et al., 1994; Schmidt-Weber et al., 2005), přičemž dle hypotézy je serinová fosforylace klíčová a fosforylace threoninu následuje až aktivaci ALK-1. Fosforylace serinu na ENG je tedy považována za rozhodující proces v regulaci aktivit receptorů TGF- β signalizační kaskády (Koleva et al., 2006).

Byly rozpoznány dvě isoformy endoglinu, které se liší v AMK sekvenci svých cytosolických domén. U L-isoformy endoglinu (predominantní forma) je tato doména tvořena výše zmíněnými 47 AMK, kdežto S-isoforma (minoritní forma) má v doméně pouze 14 AMK (Bellon et al., 1993). Obě isoformy ENG jsou schopny vázat svůj ligand, ale liší se na úrovni fosforylace (aktivace) (Kreisberg et al., 1996) a ve schopnosti regulace TGF- β signalizace (Lastres et al., 1996). Jejich detailní účinky dosud nebyly plně objasněny. Exprese L-endoglinu byla například pozorována na lidských aortálních hladkých svalových buňkách (Conley et al., 2000). Přestože tato isoforma je považována za dominantní také v myších buňkách a tkáních, významné hladiny mRNA S-endoglinu byly pozorovány současně s mRNA L-endoglinu v řadě tkání, jako jsou játra a plíce, či v kulturách endotelových buněk (Bellon et al., 1993; Perez-Gomez et al., 2005). Efekty těchto dvou isoform endoglinu se dle

dostupných dat liší a naznačují jejich opačné působení například v oblasti angiogeneze ve smyslu proangiogenního účinku L-endoglinu a antiangiogenního účinku S-endoglinu (Perez-Gomez et al., 2005). Rovněž bylo prokázáno, že vyšší hladiny minoritní S-isoformy se vyskytují ve stárnoucích endotelových buňkách, což může poukazovat na roli této isoformy v kardiovaskulárních onemocněních souvisejících s věkem a stárnutím, včetně aterosklerózy (Blanco et al., 2008).

Obrázek 9. Schematický model asociace endoglinu s TGF- β receptory (Guerrero-Esteo, Sanchez-Elsner et al. 2002)

Asociace vede k fosforylaci receptorů (červené tečky) a modifikaci TGF- β signalizace, disulfidickou vazbu monomerů ve struktuře endoglinu značí žluté tečky, T β RI – TGF- β receptor I, T β RII - TGF- β receptor II, heteromerní asociace T β RI- T β RII-endoglin vypuštěna z důvodu zjednodušení.



2.4.4.2. *Expres a funkce endoglinu*

Hlavním zdrojem molekul endoglinu je cévní endotel, zejména ve své aktivované formě (Li et al., 2000). Endoglin je vysoce exprimován v endotelových buňkách tkání, ve kterých probíhá angiogeneze, jako jsou hojící se rány, infarkty či nádorová bujení (Duff et al., 2003). Dále byla jeho exprese pozorována v hladkých svalových buňkách (Adam et al., 1998), buňkách trofoblastu (Conley et al., 2000), ve fibroblastech (St-Jacques et al., 1994), kožních buňkách (van de Kerkhof et al., 1998), makrofázích (Lastres et al., 1992), T buňkách (Bobik, 2006), leukemických buňkách (Kay et al., 2002) či erytroidních prekurzorech (Buhring et al., 1991). Oproti lidským aterosklerotickým plátům, kde byla exprese pozorována také v hladkých svalových buňkách (Conley et al., 2000), byla pozitivita endoglinu v myši aortě prokázána pouze na endotelu aorty (Pospisilova et al., 2006).

ENG hraje významnou úlohu v cévní homeostáze. Mutací genu kódujícím endoglin vzniká onemocnění zvané hereditární hemoragická teleangiektázie typu I (HHT-1), autosomálně dominantní onemocnění charakterizované (jako u dříve zmíněné HHT-2) dilatací postkapilárních cév a arterio-venózními malformacemi (Fernandez-Ruiz et al., 1993).

Endoglin v cévách zajišťuje správný rozvoj hladkých svalových buněk (Bourdeau et al., 1999; Li et al., 1999), inhibuje jejich migraci (Barrick et al., 2000) a nekontrolovatelný růst (Braverman et al., 1990). V hladkých svalových buňkách zdravých arterií je jeho exprese nicméně nízká. Zvýšení jeho hladin pak nastává v případě poškození cévy, kde se podílí na opravě a zachování cévní integrity (Conley et al., 2000), včetně tvorby prekursorů hladké svaloviny, která chrání endotel kapilár (Li et al., 1999). Kromě vlivu na hladké svalové buňky je endoglin rovněž tvořen v T buňkách, kde napomáhá společně s TGF- β jejich supresi (Bobik, 2006).

Jak již bylo řečeno, ENG je vysoce exprimován aktivovaným endotelem. Tato tvorba je kromě samotného TGF- β cytokinu iniciována například hypoxií (Sanchez-Elsner et al., 2002) a naopak tlumena zánětlivým cytokinem TNF- α (Li et al., 2003a). V endotelových buňkách funguje především jako stimulant proliferace, z této pozice je však také považován za marker nádorové angiogeneze (Burrows et al., 1995). V endotelu je endoglin schopen dále ovlivňovat NO stimulovanou vasodilataci, stejně jako expresi a aktivitu samotného enzymu eNOS. Bylo prokázáno, že hladiny tohoto enzymu jsou přímo závislé na množství endoglinu, a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Jerkic et al., 2004; Toporsian et al., 2005). Ve vztahu k TGF- β signalizaci bylo zjištěno, že indukce eNOS je zprostředkována přes ALK-5/Smad2 signální cestu (Santibanez et al., 2007).

Budeme-li se dále věnovat spolupráci endoglinu se zbylými TGF- β receptory, lze říci, že endoglin funguje jako modulátor rovnováhy mezi ALK-1 a ALK-5. ENG je v obecném měřítku pozitivním regulátorem TGF- β /ALK-1 signalizace a negativním regulátorem (či nepřímým inhibítorem) TGF- β /ALK-5 signalizace. Tento fakt byl prokázán například na endotelových buňkách, kde vyřazením endoglinu z funkce došlo k narušení ALK-1 signalizace a tím k zastavení růstu a migrace těchto buněk, což bylo zároveň znakem inhibičního působení TGF- β /ALK-5 signalizace (Goumans et al., 2002; Li et al., 2000; She et al., 2004). Obdobné závěry byly učiněny z hlediska vztahu endoglinu k regulaci Smad proteinů, jakožto transkripčních faktorů celé signalizace. Bylo zjištěno, že endoglin ovlivňuje transdukcii TGF- β signálu ve smyslu potenciace ALK-1/Smad1 a suprese ALK-5/Smad3 signální dráhy (Blanco et al., 2005; Lebrin et al., 2004). Tak byl potvrzen například efekt ALK-1/Smad1/5 kaskády podporující migraci a proliferaci endotelových buněk a ALK-5/Smad2/3 kaskády, která tyto procesy inhibuje (Lebrin et al., 2005).

V závěru je třeba poznamenat, že bylo rovněž popsáno uplatnění účinků endoglinu nezávisle na TGF- β signalizaci, tj. bez vazby s TGF- β cytokinem. Takto byly popsány například některé antiapoptotické účinky endoglinu na endotelové buňky během hypoxie (Li et al., 2003b), či ovlivnění angiogeneze (She et al., 2004).

2.4.4.3. Role endoglinu v aterogenezi

Endoglin hraje významnou roli v kardiovaskulárním systému, ve kterém se účastní již dříve zmíněné angiogeneze a zachování cévní homeostázy a podílí se rovněž na vývoji srdce a srdečních chlopní (Qu et al., 1998), tedy obecně na vývoji kardiovaskulárního systému jako takového (Santibanez et al., 2007). Na druhou stranu je však jeho činnost dávána do souvislosti s řadou metabolických a kardiovaskulárních onemocnění, jakými jsou preeklampsie (De Vivo et al., 2008), hypertenze (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010), diabetes mellitus (Blazquez-Medela et al., 2010) a rovněž ateroskleróza (Adam et al., 1998; Conley et al., 2000).

Až na několik výjimek se většina publikací přiklání k antiaterogennímu účinku TGF- β 1 cytokinové kaskády (Mallat and Tedgui, 2002). Přestože je endoglin považován za regulátora TGF- β signalizace, a tedy může zasahovat do antiaterogenních účinků tohoto cytokinu, jeho úloha v procesu aterogeneze ještě stále není definitivně objasněna (Nachtigal et al., 2012).

Existuje několik studií poukazujících na přítomnost endoglinu v počátečních fázích aterosklerózy. Bylo zjištěno, že hladké svalové buňky plátů exprimují velká množství endoglinu, oproti zdravým cévám (Barrick et al., 2000; Conley et al., 2000; Tashiro et al., 2002), u nichž byla exprese omezena pouze na endotelové buňky drobných cév adventicie (Conley et al., 2000). Tento jev byl následně dáván do souvislosti s vlivem endoglinu na migraci hladkých svalových buněk zprostředkovanou TGF- β (Barrick et al., 2000), nebo s úlohou endoglinu během poškození cévy a její reparační, jako jisté formy zmírnění tvorby plátu (Conley et al., 2000).

ENG/TGF- β 1/TGF- β RII komplex byl dále prokázán v endotelových buňkách, makrofázích a hladkých svalových buňkách plátu, a to zejména u pokročilých plátů (Piao and Tokunaga, 2006), kde byl samotný endoglin detekován i v souvislosti s jejich kalcifikací (Jeziorska, 2001). Řada autorů tak shledala, že vysoké hladiny endoglinu v rozvinutých plátech mají za následek snížení inhibičních účinků TGF- β na růst a migraci cévních hladkých svalových buněk, což vede k jejich nadměrné proliferaci a rozvoji plátu. Negativní vnímání endoglinu pak bylo podpořeno také zjištěním, že endoglin není spojen pouze se zánětlivou odpovědí v cévě, ale rovněž s novotvorbou cév v samotném plátu a rozvojem aterosklerózy (Krupinski et al., 2008). Exprese endoglinu v těchto oblastech neovaskularizace byla rovněž dána do souvislosti s nestabilitou plátu a vznikem trombotických komplikací (Li et al., 2012).

Nedávná studie také prokázala, že endoglin má schopnost přispívat k adhezi a transmigraci leukocytů v cévách a tím vyvolávat účinky podobné adhezním molekulám (Rossi et al., 2013). Je však třeba upozornit, že tyto vlivy endoglinu byly prokázány na cévách typu venul, tedy na cévách, které se z hlediska své dimenze, struktury a také hemodynamiky od arterií dramaticky liší.

Na roli endoglinu v aterogenezi lze nicméně pohlížet i z hlediska vlivu tohoto receptoru na produkci a aktivitu endoteliální NO syntázy. Jak již bylo naznačeno v kapitole 2.4.4.2., výrazný vliv endoglinu z hlediska upregulace eNOS byl prokázán jak na úrovni *in vitro* (Santibanez et al., 2007), tak *in vivo* (Nachtigal et al., 2009). Vyjdeme-li z předpokladu, že narušení funkce eNOS a s ním související dostupnosti NO v endotelu je považováno za klíčový krok v rozvoji endoteliální dysfunkce, aterogeneze a kardiovaskulárních onemocnění (Boger, 2003), pak lze úlohu endoglinu v procesu aterogeneze považovat spíše za protektivní.

Kromě vlivu na produkci NO byla dále zjištěna korelace mezi expresí endoglinu a produkcí kolagenu v plátech, což významně redukuje riziko trombózy uvnitř plátu a

podporuje jeho stabilitu, tedy opět děje poukazující spíše na jeho protektivní účinky (Bot et al., 2009).

2.4.4.4. Role sérového endoglinu v aterogenezi

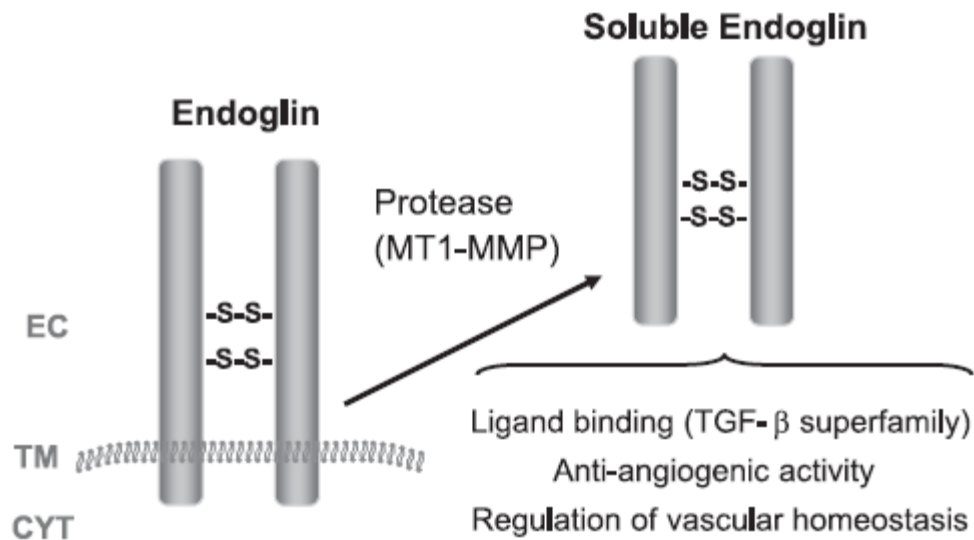
Až doposud byla úloha endoglinu v aterogenezi chápána jako úloha tkáňové transmembránové formy tohoto glykoproteinu. Je však třeba zmínit také další, netkáňovou, tzv. sérovou formu endoglinu (sENG). Z hlediska struktury sENG jde o extracelulární doménu tkáňové formy ENG, která byla do cirkulace uvolněna za pomoci membránově vázané metaloproteinázy (MMP-14) (Hawinkels et al., 2010) (**Obr. 10**). Hlavním onemocněním, které je charakterizováno zvýšenými hladinami sENG, je preeklampsie, závažný stav vznikající v těhotenství, doprovázený mimo jiné hypertenzí a endoteliální dysfunkcí (Venkatesha et al., 2006).

Hladiny sENG byly rovněž dány do souvislosti s řadou dalších onemocnění, přičemž je často poukazováno na opačné účinky oproti jeho tkáňové formě (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Tak byly například demonstrovány antiangiogenní účinky sENG ve vztahu k nádorovému bujení (Hawinkels et al., 2010), souvislost sENG s endoteliální dysfunkcí a poškozením kardiovaskulárního systému u pacientů s vysokým tlakem a cukrovkou (Blazquez-Medela et al., 2010), či souvislost se srdečním selháním (Yanavitski and Givertz, 2011). Zvýšené hladiny sENG byly rovněž zjištěny u pacientů s aterosklerózou, přičemž úzce korelovaly s hladinami celkového cholesterolu (Blann et al., 1996). Podíl sérového endoglinu na dysfunkci endotelu a vliv snížení jeho hladin na regresi aterogeneze u pacientů s familiární hypercholesterolemií byl rovněž prokázán týmem českých vědců (Blaha et al., 2008).

Přestože je sérový endoglin řadou autorů považován za jistou formu markeru, například aterosklerotického procesu (Blaha et al., 2008) nebo kardiovaskulárních příhod (Ikemoto et al., 2012), je třeba upozornit, že hladiny volného sENG se v průběhu řady onemocnění mohou měnit z různých příčin, ať už jde o jeho vazbu na cirkulující TGF- β cytokin a tvorbu komplexů (Li et al., 2000), či regulaci samotného odštěpování endoglinu z jeho tkáňové formy (Hawinkels et al., 2010).

Obrázek 10. Odštěpení sérového endoglinu z jeho tkáňové formy (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010)

Tkáňový endoglin: EC – extracelulární část, TM – transmembránová část, CYT – cytoplazmatická část řetězce. Aktivity sérového endoglinu: vazba TGF- β , inhibice angiogeneze, regulace cévní homeostázy.



2.5. Statiny – inhibitory HMG-CoA reductázy

2.5.1. Lipidové a nelipidové účinky statinů

Statiny jsou hojně předepisovanými léčivy na snížení hladin cholesterolu u lidí. Mechanismem jejich účinku je inhibice klíčového enzymu v syntéze cholesterolu 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) reductázy. Jejich schopnost snižovat cholesterol byla prokázána v řadě studií na lidech i na zvířecích modelech (Rezaie-Majd et al., 2003; Shiomi and Ito, 1999; Subang et al., 1992; Wierzbicki, 2003). Efekt snížení hladin cholesterolu v plazmě však spočívá především ve zvýšeném vychytávání LDL částic v játrech díky upregulaci LDL receptorů a samotná redukce endogenní syntézy cholesterolu se v účinku uplatňuje v menší míře (Liao and Laufs, 2005; Miida et al., 2004).

Inhibitory HMG-CoA reductázy jsou schopny významnou měrou snížit kardiovaskulární morbiditu a mortalitu (Ford et al., 2007) a jejich pozitivní vliv byl pozorován také u celé řady dalších patologií. Bylo poukázáno na schopnost snižovat inzulinovou rezistenci (Naples et al., 2008), redukovat riziko odvržení tkáně po transplantaci srdce (Kobashigawa et al., 1995) a ledvin (Katznelson et al., 1996), a tím zvýšit přežití pacientů, ale také zlepšovat stav pacientů s revmatoidní artritidou (McCarey et al., 2004) či roztroušenou sklerózou (Vollmer et al., 2004), což značí jejich protizánětlivé účinky.

Protizánětlivé působení statinů řadíme do nelipidových (tzv. pleiotropních) účinků, tedy účinků nezávislých na snížení hladin cholesterolu. Tyto pak mohou významně zasahovat i do procesu aterogeneze. Typickým příkladem dalšího pleiotropního účinku je přímý protektivní efekt na cévní stěnu – zlepšení endoteliální dysfunkce při terapii statiny díky stimulaci tvorby eNOS (NO) (Harris et al., 2004), či snížení exprese adhezních molekul (Sukhova et al., 2002). Rovněž byl prokázán stimulační vliv statinů na ateroprotektivní TGF- β signalizaci (Chen et al., 2008; Porreca et al., 2002; Youssef et al., 2002), nebo naopak inhibici tvorby NF κ B (NF κ B), jaderného transkripčního faktoru, který se podílí na regulaci řady genů spojených s aterosklerózou (Hernandez-Presa et al., 2003; Wierzbicki et al., 2003).

Užití myších modelů zajišťuje detailní pohled na účinky statinů a poskytuje, například u nových potenciálních substancí, určitý předpoklad pro odpověď lidského organismu. Je však také prokázáno, že u různých modelů nemusí být odpověď z hlediska změn hladin cholesterolu stejná, jakou lze očekávat v humánní medicíně (Zadelaar et al., 2007).

2.5.2. Statiny a endoglin

Již zmíněný vliv statinů na TGF- β signalizaci může zároveň výrazně ovlivňovat i její receptor endoglin. Inhibiční vliv atorvastatinu na expresi endoglinu a TGF- β 1 cytokinu byl prokázán na modelu srdečního selhání, kdy statin významně snižoval podíl těchto mediátorů na tvorbě kolagenu a srdeční remodelaci (Shyu et al., 2010). Díky výše zmíněnému vlivu statinů na jaderný faktor NF κ B by pak pleiotropní účinek těchto léčiv na expresi endoglinu mohl spočívat právě v ovlivnění transkripčního faktoru NF κ B, jenž je jeho významnou regulační součástí (Rius et al., 1998). Z hlediska protekce myokardu se uplatňují zejména antihypertrofické, antioxidantní a antifibrotické účinky statinů (Dechend et al., 2001; Hayashidani et al., 2002; Laufs et al., 1998; Oi et al., 1999).

Je však třeba poznamenat, že oproti možnému negativnímu vlivu endoglinu z hlediska srdeční remodelace může mít tvorba kolagenu v cévách relativně pozitivní, pláty stabilizující účinek. Potom tedy i schopnost statinů modulovat jeho expresi v různých fázích aterosklerotického procesu (Pospisilova et al., 2006) může spolupůsobit z hlediska ateroprotekce. Tak byla prokázána například schopnost statinů stimulovat zároveň produkci endoglinu a eNOS na endotelu aterosklerotické aorty (Nachtigal et al., 2009). Výsledky dalších studií zabývajících se protektivním účinkem statinů v součinnosti s endoglinem v průběhu aterogeneze jsou dále konkrétně diskutovány v jednotlivých kapitolách tohoto komentovaného souboru.

3. CÍLE PRÁCE

- ❖ Analýza současné literatury zabývající se problematikou signalizace TGF- β cytokinu ve vztahu k ateroskleróze a úlohou endoglinu (TGF- β receptoru III) v patogenezi tohoto onemocnění.

- ❖ Sledování změn exprese endoglinu v aortě u různých myších modelů aterosklerózy po podání lipidové diety. Sledování možné koexprese s dalšími markery endotelu (především s molekulou eNOS a adhezními molekulami).

- ❖ Studium účinků atorvastatinu v aortě apoE/LDLR deficientního modelu myši s přihlédnutím ke změnám exprese endoglinu a dalších členů TGF- β signalizace (TGF- β receptor I a II, Smad proteiny).

- ❖ Hledání možných vztahů tkáňového a sérového endoglinu (sENG), úloha atorvastatinu v těchto změnách, potenciální využití molekuly sENG jako markeru v klinické praxi.

4. KOMENTÁŘE K PRACÍM

Tato disertační práce je koncipována jako komentovaný soubor prací. Pět publikací je otištěno v odborných časopisech s impaktním faktorem a jedna publikace je v současnosti v recenzním řízení. Jedna z těchto prací je zpracována jako přehledový článek shrnující současné poznatky (review) a zbylých pět článků shrnuje práci původní (experimentální).

- 4.1.** Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis
- 4.2.** Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis
- 4.3.** Endoglin is not co-expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice
- 4.4.** Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice
- 4.5.** Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice
- 4.6.** The role of endoglin in atherosclerosis

4.1. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis

Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Brcakova E., Mullerova Z., Andrys C., Micuda S., Nachtigal P. (2011); *Pharmacological Research* 64(1): 53-59 (IF:4.346).

Cévní endoteliální růstový faktor (VEGF) je substancí významně ovlivňující funkci endotelu ve smyslu endotelové stability a zachování klidového (neaktivovaného) stavu (Walshe et al., 2009), čímž může zmírňovat projevy endoteliální dysfunkce. Bylo prokázáno, že aktivace ALK-1/Smad1 signalizační kaskády může výrazně přispívat ke zvýšení hladin VEGF v endotelových buňkách (Yao et al., 2008).

Cílem této studie bylo zjistit, zda podávání atorvastatinu (v dávce 50mg/kg/den) ovlivňuje expresi proteinů endoglin/ALK-1/p-Smad1/VEGF v aortě apoE/LDLR deficientního modelu myši krmených 1% cholesterolovou dietou. Ve studii bylo provedeno hodnocení exprese formou imunohistochemie a Western blot analýzy, doplněné o zhodnocení velikosti aterosklerotických plátů (barvení olejovou červení) a určení hladin sérového endoglinu (sENG) pomocí ELISA analýzy.

Podání atorvastatinu s cholesterolovou dietou vedlo u myši k signifikantnímu snížení celkového, VLDL i LDL cholesterolu, redukcii hladin sérového endoglinu i výraznému zmenšení velikosti plátů. Současně vedlo podávání atorvastatinu k nárůstu exprese endoglinu, ALK-1, p-Smad1 (aktivní fosforylovaná forma Smad1) i VEGF oproti kontrole bez statinů, což bylo potvrzeno imunohistochemicky i Western blot analýzou.

Výsledky studie potvrzují schopnost atorvastatinu snižovat hladiny cholesterolu a velikosti plátů u apoE/LDLR deficientního myšního modelu. Rovněž poukazují na schopnost atorvastatinu zvyšovat expresi endoglinu v aortě společně s dalšími endotel protektivními markery, což může naznačovat potenciální antiaterogenní působení endoglinu. Snížení sérového endoglinu po podání atorvastatinu navíc může vypovídat o potenciálu užití sENG jako biomarkeru progresu aterosklerózy, či naopak účinnosti podávání statinů.

4.2. Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predisposition to atherosclerosis

Rathouska J., Nemeckova I., Zemankova L., Strasky Z., Jezkova K., Varejckova M., Nachtigal P. (2014); *Heart and Vessels (manuscript přijat do tisku) (IF: 2.126)*.

Tato experimentální studie hodnotí dva myší kmeny, které jsou známé svou rozdílnou citlivostí k ateroskleróze, z hlediska konkrétních mechanismů, které by v rozdílné predispozici mohly hrát roli. Vzhledem k tomu, že *in vitro* studie naznačily, že na zvýšené citlivosti C57BL/6J (B6) kmene oproti méně citlivému C3H/HeJ (C3H) kmeni se může podílet mj. odlišná reaktivita endotelových a hladkých svalových buněk (Miyoshi et al., 2006; Shi et al., 2000), spíše než samotný metabolismus cholesterolu, byla tato *in vivo* studie směřována na hodnocení některých adhezních molekul, či naopak potenciálně ateroprotektivních markerů v myší aortě.

B6 a C3H myší kmeny byly krmeny standardní, nebo cholesterolovou dietou, což mělo vést k odhalení odlišností v expresi vybraných markerů endotelové dysfunkce mezi oběma kmeny. Změny cholesterolového spektra v séru byly následně hodnoceny biochemicky. Pomocí Western blot analýzy pak byly sledovány změny exprese adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1, P-selektin) a potenciálně protektivních markerů z hlediska fungování cévního endotelu (eNOS/peNOS, endoglin a TGF- β receptor II) v aortě.

Výsledky prokázaly nižší expresi všech adhezních molekul u C3H protektivního kmene (na standardní i na cholesterolové dietě), oproti B6 senzitivnímu kmeni, a to i přes vyšší hladiny celkového cholesterolu u C3H kmene. Zároveň došlo u C3H kmene po cholesterolové dietě ke zvýšení všech sledovaných potenciálně ateroprotektivních markerů TGF- β signalizace.

Na rozdílné predispozici k ateroskleróze mezi oběma kmeny se tedy zřejmě podílí nižší citlivost cévy C3H myší k expresi prozánětlivých molekul a markerů endoteliální dysfunkce, a to bez ohledu na lipidový profil, ještě před morfologickou detekcí aterosklerotického procesu. Zároveň byl naznačen podíl endoglinu na zvýšení exprese eNOS pouze u protektivního C3H kmene, což je opět mechanismus poukazující na možnou pozitivní roli endoglinu z hlediska endotelu, případně aterosklerózy.

4.3. Endoglin is not co-expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice

Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Zemankova L., Varejckova M., Nachtigal P.; *Histology and Histopathology (manuscript v recenzním řízení)*.

V našich předcházejících studiích byla exprese endoglinu prokázána exkluzivně v endotelových buňkách kořene aorty u apoE/LDLR deficientních myší (Rathouska et al., 2011; Strasky et al., 2011; Vecerova et al., 2012). Pozitivní vliv této molekuly z hlediska produkce eNOS/NO (Jerkic et al., 2004) či stabilizace aterosklerotických plátů (Bot et al., 2009) byly rovněž potvrzeny. Nedávná studie však prokázala, že se endoglin podílí na adhezi leukocytů a jejich transmigraci přes endotel ve venulách, a tedy plní podobnou úlohu při zánětu jako adhezní molekuly (Rossi et al., 2013).

Ve snaze objasnit změny exprese endoglinu během aterogeneze a zjistit rozdíly této exprese ve dvou odlišných lokalitách aorty (kořen aorty a ascendentní aorta), a také odhalit možnou koexpresi endoglinu s adhezními molekulami, byla provedena tato histologická studie. Ve studii byly použity tři skupiny apoE deficientních myší, které se lišily dietou (standardní dieta a dieta s obsahem 21% tuku, tzv. “Western type diet“), jejíž cílem bylo dosažení tří různých etap aterosklerotického procesu. Pomocí systematického náhodného výběru řezů myších aort a imunohistochemického barvení byla zhodnocena pozitivita exprese endoglinu, P-selektinu a VCAM-1.

Histologická studie prokázala pozitivitu endoglinu v endotelových buňkách kořene aorty i ascendentní aorty u apoE deficientních myší. Dále poukázala na variabilitu exprese endoglinu v průběhu aterogeneze výhradně v oblasti ascendentní aorty (nikoli v kořenu aorty), z čehož byl učiněn závěr, že extrakardiální úsek aorty je relevantnější z hlediska studia exprese endoglinu a aterogeneze. Expresse endoglinu byla dále detekována výhradně na endotelu pokrývajícím aterosklerotický plát, a to bez ohledu na jeho velikost. Zároveň nebyla prokázána žádná koexprese (kolokalizace) endoglinu s P-selektinem ani VCAM-1, což naznačuje, že endoglin pravděpodobně nepřispívá k akumulaci leukocytů v aortě apoE deficientních myší v průběhu aterogeneze.

4.4. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice

Strasky Z., Vecerova L., Rathouska J., Slanarova M., Breckova E., Kudlackova Z., Andrys C., Micuda S., Nachtigal P. (2011); *Circulation Journal* 75(7): 1747-1755 (IF:3.578).

Cílem studie bylo zhodnotit vliv standardní a 1% cholesterolové diety na lipidový profil, velikost plátů, hladiny sérového endoglinu (sENG) a parametry exprese proteinů dvou kaskád souvisejících s aktivitou endoglinu v aortě apoE/LDLR deficientních myší – ENG/ALK-5/Smad2/eNOS a ENG/ALK-1/Smad1/VEGF. K tomuto hodnocení bylo použito biochemické analýzy (lipidový profil), ELISA analýzy (hladiny sENG), stereologické analýzy velikosti plátů (barvení olejovou červení), imunohistochemické a Western blot analýzy (stanovení proteinů).

Biochemická analýza prokázala signifikantně vyšší hladiny celkového, VLDL a LDL cholesterolu po podání cholesterolové diety u tohoto myšího modelu oproti standardní dietě. Stereologická analýza aterosklerotických plátů v aortě také potvrdila významně větší plochu těchto lézí v lumen cévy oproti kontrolní skupině. Zároveň bylo potvrzeno, že podání cholesterolové diety vede k signifikantně vyšším hladinám sérového endoglinu a zároveň k redukci exprese tohoto proteinu v aortě, souběžně s redukcí proteinů ALK-1, p-Smad2 a VEGF.

Výsledky studie naznačují, že hypercholesterolemie vede k výraznému zvýšení hladin sérového endoglinu a zároveň ke snížení jeho exprese v aortě, přičemž je touto hypercholesterolemií redukováno i působení dalších protektivních markerů, které souvisejí s endoglinem, jakými jsou p-Smad2 a VEGF. Celý proces pak může prohlubovat stav endoteliální dysfunkce a aterosklerózy jako takové. Úloha sérového endoglinu jako potenciálního biomarkeru progresu aterosklerózy však musí být dále potvrzena studii v oblasti humánní medicíny.

4.5. Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice

Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Micuda S., Nachtigal P. (2012); *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 19(2): 115-126 (IF:2.933).

Vliv atorvastatinu (ATV) na upregulaci endoglin/ALK-5/Smad2/eNOS a endoglin/ALK-1/Smad1/VEGF kaskád, vedoucích k protekci z hlediska aterogeneze u apoE/LDLR deficientního myšního modelu, byl naznačen v předcházejících studiích (Nachtigal et al., 2009; Rathouska et al., 2011). V této studii jsme se zaměřili na schopnost ovlivnění výše uvedených kaskád atorvastatinem v rámci jeho nelipidových účinků v aortě apoE/LDLR deficientního modelu myši krmených standardní dietou.

Změny exprese endoglinu, ALK-1, ALK-5, Smad-1, Smad-2 (a jejich aktivních fosforylovaných forem), eNOS a VEGF při dávce atorvastatinu 50mg/kg/den byly hodnoceny pomocí imunohistochemie a Western blot analýzy. Lokalizace endoglinu v aortě a jeho možná koexprese s výše uvedenými proteiny byla dále hodnocena pomocí imunofluorescence. Biochemicky byl určen lipidový profil myši a změny velikosti plátů zhodnoceny morfometricky (olejová červeň).

Biochemický profil myši odhalil významné zvýšení hladin celkového a VLDL cholesterolu po podávání atorvastatinu. Zároveň však došlo k signifikantní redukci velikosti plátů oproti kontrole na standardní dietě bez přídatku ATV. Atorvastatin dále zvýšil expresi endoglinu, ALK-1, ALK-5, aktivních forem Smad2 i Smad1, eNOS, VEGF a rovněž byla prokázána koexprese (kooperace) těchto markerů s endoglinem, především v endotelových buňkách.

Souhrn výsledků naznačuje, že atorvastatin je schopen zvyšovat ateroprotektivní endoglin/ALK-5/Smad2/eNOS a endoglin/ALK-1/Smad1/VEGF kaskády a redukovat velikost aterosklerotické léze v rámci svých nelipidových (pleiotropních) účinků. Zároveň dokazuje, že se zmíněná protekce, jejímž významným faktorem je zřejmě endoglin, patrně odehrává především na úrovni cévního endotelu.

4.6. The role of endoglin in atherosclerosis

Nachtigal P., Zemankova Vecerova L., Rathouska J., Strasky Z. (2012); *Atherosclerosis* 224(1): 4-11 (IF:3.706).

Hlavním cílem tohoto přehledového článku bylo souhrnně zhodnotit význam endoglinu v procesu aterogeneze u lidí a experimentálních modelů zvířat. Základem bylo popsání interakce mezi jednotlivými receptory TGF- β kaskády a zapojení TGF- β receptoru III do cytokinové signalizace. Dalším krokem bylo zhodnocení exprese v lidských aterosklerotických cévách a specifika jeho detekce oproti cévám zvířecím. K hodnocení jeho významu z hlediska aterogeneze pak posloužila rešerše řady významných studií a závěrů v oblasti humánní a experimentální aterosklerózy, což bylo následně shrnuto ve vztahu k jeho expresi a funkci. Výrazně pozitivní vliv tkáňového endoglinu byl diskutován v samostatné kapitole týkající se kooperace endoglinu s endoteliální NO syntázou. Naopak hladiny sérového endoglinu byly široce popsány v kontextu humánní aterosklerózy a ve vztahu k řadě patologických onemocnění kardiovaskulárního systému, jakými jsou preeklampsie, hypertenze či diabetes mellitus.

V závěru práce byl nastíněn souhrnný hypotetický model role endoglinu v aterogenezi. Byly popsány dvě možné dráhy signalizace, přičemž první zahrnuje součinnost komplexu TGF- β receptoru II a III s ALK-5 receptorem vedoucí k aktivaci p-Smad2/3 signalizace a následné produkci kolagenu, eNOS a protizánětlivému působení, což v důsledku vede ke stabilizaci plátu, k ochraně funkce endotelu, a tedy k možné ateroprotekci. Druhá popsaná dráha zahrnuje součinnost výše zmíněného komplexu receptorů II a III s ALK-1, aktivaci p-Smad1/5 a následnou produkci VEGF, který stimuluje expresi protektivní eNOS.

Samotný konec souhrnného článku poukazuje na limitaci v rámci závěrů ohledně endoglinu a jeho role v aterogenezi vzhledem k nereálnosti využití homozygotního endoglin deficientního modelu myši z důvodu odumření zárodku již ve stádiu embryogeneze (fatální poruchy rozvoje kardiovaskulárního systému) a dosud nejasně naznačené pozici endoglinu v samotné TGF- β signalizaci. Naopak, jako potenciálně významné autoři shledávají monitorování hladin sérového endoglinu jako indikátoru progresu aterosklerotického procesu, včetně sledování účinnosti terapeutických zásahů v podobě terapie statiny.

4.7. Souhrnná diskuse a shrnutí

Ústředním tématem této disertační práce bylo studium experimentální aterosklerózy ve vztahu k expresi endoglinu u různých myších modelů aterosklerózy. ApoE/LDLR deficientní model myši se vyznačuje vysokými hladinami cholesterolu a jeho frakcí a tvorbou významných aterosklerotických plátů již na standardní dietě (Witting et al., 1999), nebo přidáním 1% cholesterolu do diety. U těchto myši byly sledovány změny v lipidovém spektru, velikosti plátů, expresi řady proteinů TGF- β signalizační kaskády kooperující s endoglinem, zejména pak ALK-1/Smad1 a ALK-5/Smad2 signalizace vedoucí k expresi protektivních molekul na cévním endotelu z hlediska endoteliální dysfunkce/aterosklerózy – eNOS (Vanhoutte, 1997) a VEGF (Walshe et al., 2009). Kromě parametru tkáňové exprese endoglinu byly sledovány také změny hladin sérové formy tohoto proteinu (sENG), která byla již dříve označena za potenciálně slibný marker aterosklerotického procesu (Blaha et al., 2008). Pro sledování lipidových a nelipidových (pleiotropních) účinků léčiv ze skupiny statinů byl ve studiích použit atorvastatin, frekventovaně užívané hypolipidemikum v humánní medicíně (Zhou and Liao, 2010).

Výsledky výše zmíněných studií naznačily, že růst plátů po cholesterolové dietě je doprovázen významnou redukcí exprese řady potenciálně protektivních proteinů působících ve stěně myší aorty společně s endoglinem a zároveň zvyšuje podíl sérového endoglinu (Strasky et al., 2011). Rovněž bylo prokázáno, že atorvastatin je schopen zvyšovat ateroprotektivní endoglin/ALK-1/Smad1/VEGF (Rathouska et al., 2011) a endoglin/ALK-5/Smad2/eNOS kaskády, a to i v rámci svých pleiotropních účinků, tedy bez ohledu na změny hladin cholesterolu (Vecerova et al., 2012). Pleiotropní účinky atorvastatinu byly také prokázány na úrovni redukce velikosti aterosklerotické léze (Rathouska et al., 2011; Vecerova et al., 2012) a na úrovni signifikantní redukce hladin sENG po podání statinu, což může vypovídat o potenciálu sENG jako markeru progresu onemocnění, či naopak účinnosti terapie aterosklerózy.

Na podkladě výsledků dřívější *in vitro* studie naznačující, že na zvýšené citlivosti C57BL/6J (B6) kmene oproti méně citlivému C3H/HeJ (C3H) kmeni myši se může podílet mj. odlišná reaktivita endotelových buněk (Shi et al., 2000), a naší předchozí studie, poukazující na možné protektivní účinky endoglinu na úrovni cévního endotelu (Vecerova et al., 2012), byla následující *in vivo* studie směřována na hodnocení některých proaterogenních adhezních molekul, či naopak potenciálně ateroprotektivních markerů v endotelu myší aorty u

těchto kmenů. Výsledky studie prokázaly nižší expresi adhezních molekul (P-selektin, VCAM-1, ICAM-1) u C3H protektivního kmene oproti B6 senzitivnímu kmeni, a to i přes vyšší hladiny celkového cholesterolu u C3H kmene. Zároveň došlo u C3H kmene po cholesterolové dietě ke zvýšení všech potenciálně ateroprotektivních markerů TGF- β kaskády (ENG, TGF- β receptor II, eNOS/peNOS). Byla tedy prokázána nižší citlivost cévy C3H myši (ateroprotektivního kmene) k expresi prozánětlivých molekul a markerů endoteliální dysfunkce, a to bez ohledu na lipidový profil, a zároveň byl naznačen podíl endoglinu na upregulaci eNOS pouze u protektivního C3H kmene.

Lokalizací exprese endoglinu a jeho změnám v průběhu aterogeneze se zabývala histologická studie s apoE deficientním modelem myši (Rathouska et al. 2014, manuscript v recenzním řízení). Zároveň byla hodnocena případná koexprese endoglinu s adhezními molekulami, tedy jeho možný podíl na adhezi a transmigraci leukocytů, což bylo naznačeno v dřívější studii ve venulách, tedy v lokalitě bez souvislosti s aterosklerotickým procesem (Rossi et al., 2013). Výsledky této studie potvrdily závěry předchozích studií týkajících se exprese endoglinu výhradně v endotelu aorty u apoE/LDLR deficientního modelu (Rathouska et al., 2011; Strasky et al., 2011; Vecerova et al., 2012), ale v tomto případě na modelu apoE deficientních myši. Rovněž jsme prokázali, že extrakardiální úsek aorty je pravděpodobně více relevantní z hlediska studia aterogeneze a exprese endoglinu, ve srovnání s kořenem aorty, ve kterém se exprese endoglinu v průběhu procesu neměnila, a kde jeho exprese může spíše souviset s vývojem srdce a srdečních chlopní, na kterých se endoglin také podílí (Qu et al., 1998). V závěru studie byla diskutována absence koexprese (kolokalizace) endoglinu s P-selektinem i VCAM-1, což naznačuje, že endoglin pravděpodobně nepřispívá k akumulaci leukocytů v aortě apoE deficientních myši v průběhu aterogeneze.

Přehledový článek týkající se role endoglinu v aterogenezi pak shrnul současné poznatky související s TGF- β receptorem III a jeho úlohou v procesu aterogeneze u lidí i experimentálních zvířat. Byla hodnocena zejména jeho exprese v lidských aterosklerotických plátech a specifika jeho detekce oproti cévám zvířecím, zejména u myši, kde byla jeho exprese pozorována zatím výhradně na cévním endotelu (Nachtigal et al., 2012). Součinnost endoglinu s dalšími členy TGF- β kaskády a jeho zapojení do signalizace vyústující v expresi endotel protektivních a ateroprotektivních molekul (VEGF a eNOS) byla názorně schematicky shrnuta. Rovněž byla intenzivně diskutována kooperace tkáňového endoglinu s protektivní endoteliální NO syntázou, tedy potenciální podíl endoglinu na zvyšování oxidu dusnatého v cévě. Jako jistý protipól tkáňového endoglinu byla komentována sérová forma tohoto proteinu, která úzce souvisí s řadou chorob a patologií v oblasti kardiovaskulárního

systemu, včetně aterogeneze (Nachtigal et al., 2012). Vazba tkáňového a sérového endoglinu a sledování hladin sérové formy byla komplexně diskutována zejména ve vztahu k možné aplikaci do klinické praxe. Sledování změn hladin sENG jako potenciálního markeru závažnosti onemocnění, případně efektu konkrétního terapeutického zásahu statiny v případě aterosklerózy však stále zůstává tématem k dalšímu výzkumu.

5. ZÁVĚRY

- ❖ Tkáňový TGF- β receptor III (endoglin) byl označen za významný článek v kooperaci a regulaci TGF- β cytokinové signalizace, zejména s ohledem na produkci některých protektivních molekul v endotelu myši aterosklerotické cévy aorty, především eNOS.
- ❖ Bylo prokázáno, že atorvastatin je schopen zvyšovat aortální expresi endoglinu a eNOS a zároveň snižovat velikost plátů, což poukazuje na jeho možné ateroprotektivní účinky u modelu apoE/LDLR deficientních myši nezávislé na hypolipidemických efektech statinů.
- ❖ Sérová forma endoglinu (sENG) byla označena za potenciálně negativní marker, tedy marker závažnosti aterosklerotického procesu u myšního modelu. Podávání atorvastatinu u modelu apoE/LDLR deficientních myši vedlo k poklesu jeho hladin zároveň se snížením velikosti plátů. Implementace do humánní medicíny, například ve smyslu sledování účinnosti terapie statiny, však ještě stále vyžaduje hlubší souvislosti.
- ❖ Na modelu normocholesterolemických myši s rozdílnou predispozicí k ateroskleróze (protektivní kmen C3H/HeJ vs. citlivý C57BL/6J kmen) byla prokázána snížená citlivost C3H protektivního kmene k expresi prozánětlivých molekul a markerů endoteliální dysfunkce a zároveň byl naznačen podíl endoglinu na upregulaci eNOS pouze u C3H kmene.
- ❖ Studie apoE deficientního modelu myši označila extrakardiální úsek aorty za relevantnější z hlediska studia progresu aterosklerotického procesu ve vztahu k expresi endoglinu. Nepřítomností koexprese endoglinu s adhezními molekulami P-selektin a VCAM-1 pak naznačila, že endoglin se pravděpodobně nepodílí na akumulaci a transmigraci leukocytů přes endotel v průběhu aterosklerotického procesu.
- ❖ Obecný pohled na roli endoglinu v aterosklerotickém procesu byl kriticky zhodnocen v přehledovém článku, jehož součástí byla také řada vlastních výsledků a závěrů výzkumné skupiny zabývající se experimentální aterogenezí na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

6. PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Brcakova E., Mullerova Z., Andrys C., Micuda S., Nachtigal P. (2011); Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacological Research* 64(1): 53-59 (IF:4.346).

- Hlavní podíl na sepsání textu publikace
- Podíl na imunohistochemickém barvení

Rathouska J., Nemeckova I., Zemankova L., Strasky Z., Jezkova K., Varejckova M., Nachtigal P. (2014); Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predisposition to atherosclerosis. *Heart and Vessels* (IF: 2.126) (manuscript přijat do tisku).

- Hlavní podíl na sepsání textu publikace
- Hlavní podíl na analýze dat
- Podíl na zpracování biologického materiálu (aorty a krevní sérum)
- Western blot analýza proteinů

Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Zemankova L., Varejckova M., Nachtigal P.; Endoglin is not co-expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice. *Histology and Histopathology* (manuscript v recenzním řízení).

- Hlavní podíl na sepsání textu publikace
- Hlavní podíl na analýze dat
- Podíl na zpracování biologického materiálu (aorty) a systematickém výběru řezů
- Imunohistochemické barvení

Strasky Z., Vecerova L., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Kudlackova Z., Andrys C., Micuda S., Nachtigal P. (2011); Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circulation Journal* 75(7): 1747-1755 (IF:3.578).

- Podíl na textu publikace
- Podíl na imunohistochemickém barvení

Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Micuda S., Nachtigal P. (2012); Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 19(2): 115-126 (IF:2.933).

- Podíl na textu publikace
- Podíl na imunohistochemickém barvení

Nachtigal P., Zemankova Vecerova L., Rathouska J., Strasky Z. (2012); The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 224(1): 4-11 (IF:3.706).

- Podíl na textu publikace

7. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predisposition to atherosclerosis

Rathouska J., Nemeckova I., Zemankova L., Strasky Z., Jezkova K., Varejckova M., Nachtigal P. (2014); *Heart and Vessels* (IF: 2.126) (*manuscript přijat do tisku*).

Spirulina platensis and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis

Strasky Z., Zemankova L., Nemeckova I., Rathouska J., Wong J. R., Muchova L., Iva Subhanova I., Vanikova J., Vanova K., Vitek L., Nachtigal P. (2013); *Food & Function* 4(11): 1586-1594 (IF:2.694).

The role of endoglin in atherosclerosis

Nachtigal P., Zemankova Vecerova L., Rathouska J., Strasky Z. (2012); *Atherosclerosis* 224(1): 4-11 (IF:3.706).

Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice

Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Micuda S., Nachtigal P. (2012); *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 19(2): 115-126 (IF:2.933).

Book title: Atherogenesis (ISBN 978-953-307-992-9)

Chapter title: The Role of TGF- β and TGF- β Receptors in Atherosclerosis. p. 327-344

Nachtigal P., Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z. (2012)

<http://www.intechopen.com/books/atherogenesis>

Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice

Strasky Z., Vecerova L., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Kudlackova Z., Andrys C., Micuda S., Nachtigal P. (2011); *Circulation Journal* 75(7): 1747-1755 (IF:3.578).

Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis

Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Brcakova E., Mullerova Z., Andrys C., Micuda S., Nachtigal P. (2011); *Pharmacological Research* 64(1): 53-59 (IF:4.346).

Antioxidants and vitamins in clinical conditions

Zadak Z., Hyspler R., Ticha A., Hronek M., Fikrova P., Rathouska J., Hrciarikova D., Stetina R. (2009); *Physiological research* 58: 13-17 (IF: 1.531).

8. PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

J. Rathouská, L. Večeřová, Z. Stráský, M. Slanařová, E. Brčáková, P. Nachtigal; Potential effects of atorvastatin treatment on TGF-beta receptor cascade in experimental model of atherosclerosis. 78th European Atherosclerosis Society Congress, Hamburg, Germany (2010)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Večeřová, E. Brčáková, M. Slanařová, P. Nachtigal; Expression of endoglin and Smad proteins in normocholesterolemic mice with different predisposition to atherogenesis. 4. morfologická PGS konference, Hradec Králové (2010)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Večeřová, E. Brčáková, M. Slanařová, P. Nachtigal; Expression of various markers of TGF- β 1 cascade in aorta of normocholesterolemic C3H/HeJ and C57BL/6J mice. XIV. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn (2010)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Večeřová, E. Brčáková, M. Slanařová, P. Nachtigal; Expression of endoglin-related pathways in normocholesterolemic mice with distinct predisposition to atherosclerosis. 1. fakultní postgraduální vědecká konference, Hradec Králové (2011)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Večeřová, E. Brčáková, M. Slanařová, P. Nachtigal; Endoglin-related pathways are not related to distinct predisposition to atherosclerosis in C57BL/6J and C3H/HeJ mice. 79th European Atherosclerosis Society Congress, Gothenburg, Sweden (2011)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Večeřová, E. Doleželová, M. Slanařová, P. Nachtigal; Expression of various endothelial markers in C57BL/6J and C3H/HeJ normocholesterolemic mice. 61. Farmakologické dny, Brno (2011)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Večeřová, E. Doleželová, M. Slanařová, P. Nachtigal; Expression changes of endoglin and other atheroprotective proteins in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice. XV. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn (2011)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Zemánková, E. Doleželová, M. Slanařová, P. Nachtigal; Early response of endothelium to cholesterol diet in aortas of mice with distinct predisposition to atherosclerosis. 2. fakultní postgraduální vědecká konference, Hradec Králové (2012)

J. Rathouská, Z. Stráský, L. Zemánková, E. Doleželová, M. Slanařová, P. Nachtigal; HO-1 may participate in different atherosclerosis susceptibility between C3H/HeJ and C57BL/6J mice *in vivo*. 7th International Congress on Heme Oxygenases and Related Enzymes, Edinburg, United Kingdom (2012)

J. Rathouská, Z. Stráský, E. Doleželová, M. Slanařová, P. Nachtigal; Endothelial response as a possible cause of difference in atherosclerosis susceptibility in mice. 10th meeting “New Frontiers in Basic Cardiovascular Research“, Hradec Králové (2012)

J. Pfeiferová (Rathouská), Z. Stráský, M. Slanařová, P. Nachtigal; Endoglin and eNOS might play a role in different susceptibility to atherosclerosis between C57BL/6J and C3H/HeJ mouse strains. XVI. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn (2012)

J. Pfeiferová (Rathouská), Z. Stráský, K. Ježková, P. Nachtigal; Endoglin and eNOS might play a protective role in endothelium in early atherogenesis. 3. postgraduální a 1. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (2013)

J. Pfeiferová (Rathouská), Z. Stráský, K. Ježková, P. Nachtigal; Endothelial expressions of endoglin and eNOS differ between C57BL/6J and C3H/HeJ mice after cholesterol diet - implications in development of endothelial dysfunction? 81st European Atherosclerosis Society Congress, Lyon, France (2013)

J. Rathouská, K. Ježková, I. Němečková, P. Nachtigal; Different susceptibility to atherosclerosis between C3H/HeJ and C57BL/6J mouse strains might be related to distinct expression of adhesion molecules and eNOS in aorta. XVII. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn (2013)

J. Rathouská, K. Ježková, I. Němečková, P. Nachtigal; The evaluation of endoglin, VCAM-1 and P-selectin expression and co-expression in aortas of apoE-deficient mice – an immunohistochemical study. 82nd European Atherosclerosis Society Congress, Madrid, Spain (2014)

9. POUŽITÁ LITERATURA

- Adam P. J., Clesham G. J. and Weissberg P. L., 1998. Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 33-7.
- Agrotis A., Samuel M., Prapas G. and Bobik A., 1996. Vascular smooth muscle cells express multiple type I receptors for TGF-beta, activin, and bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 613-8.
- Ahmad M., Theofanidis P. and Medford R. M., 1998. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 273, 4616-21.
- Ali K., Middleton M., Pure E. and Rader D. J., 2005. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res* 97, 922-7.
- Ashcroft G. S., 1999. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect* 1, 1275-82.
- Assoian R. K. and Sporn M. B., 1986. Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 102, 1217-23.
- Bahadori L., Milder J., Gold L. and Botney M., 1995. Active macrophage-associated TGF-beta co-localizes with type I procollagen gene expression in atherosclerotic human pulmonary arteries. *Am J Pathol* 146, 1140-9.
- Baldwin A. L., Thurston G. and al Naemi H., 1998. Inhibition of nitric oxide synthesis increases venular permeability and alters endothelial actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 274, H1776-84.
- Barbara N. P., Wrana J. L. and Letarte M., 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 274, 584-94.
- Barrick W. T., Schofferman J. A., Reynolds J. B., Goldthwaite N. D., McKeehen M., Keaney D. and White A. H., 2000. Anterior lumbar fusion improves discogenic pain at levels of prior posterolateral fusion. *Spine* 25, 853-857.
- Bellon T., Corbi A., Lastres P., Cales C., Cebrian M., Vera S., Cheifetz S., Massague J., Letarte M. and Bernabeu C., 1993. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23, 2340-5.
- Bentzon J. F. and Falk E., 2010. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Curr Opin Lipidol* 21, 434-40.
- Biffi W. L., Moore E. E., Moore F. A. and Barnett C., 1996. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. *J Surg Res* 63, 328-32.
- Blaha M., Cermanova M., Blaha V., Jarolim P., Andrys C., Blazek M., Maly J., Smolej L., Zajic J., Masin V., Zimova R. and Rehacek V., 2008. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 197, 264-70.
- Blanco F. J., Grande M. T., Langa C., Oujó B., Velasco S., Rodriguez-Barbero A., Perez-Gomez E., Quintanilla M., Lopez-Novoa J. M. and Bernabeu C., 2008. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 103, 1383-92.
- Blanco F. J., Santibanez J. F., Guerrero-Esteo M., Langa C., Vary C. P. and Bernabeu C., 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 204, 574-84.

- Blann A. D., Wang J. M., Wilson P. B. and Kumar S., 1996. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 120, 221-6.
- Blazquez-Medela A. M., Garcia-Ortiz L., Gomez-Marcos M. A., Recio-Rodriguez J. I., Sanchez-Rodriguez A., Lopez-Novoa J. M. and Martinez-Salgado C., 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8, 86.
- Blobe G. C., Schiemann W. P. and Lodish H. F., 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342, 1350-8.
- Bobik A., 2006. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1712-20.
- Bobik A., Agrotis A., Kanellakis P., Dilley R., Krushinsky A., Smirnov V., Tararak E., Condron M. and Kostolias G., 1999. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* 99, 2883-91.
- Boger R. H., 2003. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 59, 824-33.
- Boger R. H., Bode-Boger S. M. and Frolich J. C., 1996. The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* 127, 1-11.
- Bombeli T., Mueller M. and Haerberli A., 1997. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 77, 408-23.
- Bonthu S., Heistad D. D., Chappell D. A., Lamping K. G. and Faraci F. M., 1997. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2333-40.
- Bot P. T., Hoefler I. E., Sluijter J. P., van Vliet P., Smits A. M., Lebrin F., Moll F., de Vries J. P., Doevendans P., Piek J. J., Pasterkamp G. and Goumans M. J., 2009. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke* 40, 439-47.
- Bourdeau A., Dumont D. J. and Letarte M., 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104, 1343-51.
- Braverman I. M., Keh A. and Jacobson B. S., 1990. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* 95, 422-7.
- Buhring H. J., Muller C. A., Letarte M., Gougos A., Saalmuller A., van Agthoven A. J. and Busch F. W., 1991. Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* 5, 841-7.
- Burrows F. J., Derbyshire E. J., Tazzari P. L., Amlot P., Gazdar A. F., King S. W., Letarte M., Vitetta E. S. and Thorpe P. E., 1995. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1, 1623-34.
- Cannon R. O., 3rd, 1998. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 44, 1809-19.
- Cardillo C. and Panza J. A., 1998. Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension. *Vasc Med* 3, 138-44.
- Cines D. B., Pollak E. S., Buck C. A., Loscalzo J., Zimmerman G. A., McEver R. P., Pober J. S., Wick T. M., Konkle B. A., Schwartz B. S., Barnathan E. S., McCrae K. R., Hug B. A., Schmidt A. M. and Stern D. M., 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-61.

- Cipollone F., Fazia M., Mincione G., Iezzi A., Pini B., Cuccurullo C., Uchino S., Spigonardo F., Di Nisio M., Cuccurullo F., Mezzetti A. and Porreca E., 2004. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 35, 2253-7.
- Conley B. A., Smith J. D., Guerrero-Esteo M., Bernabeu C. and Vary C. P., 2000. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153, 323-35.
- Cybulsky M. I., Lichtman A. H., Hajra L. and Iiyama K., 1999. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta* 286, 207-18.
- Davidson M. H., 2010. Update on CETP inhibition. *J Clin Lipidol* 4, 394-8.
- Davidson W. S., Silva R. A., Chantepie S., Lagor W. R., Chapman M. J. and Kontush A., 2009. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 870-6.
- Davies M. J., Gordon J. L., Gearing A. J., Pigott R., Woolf N., Katz D. and Kyriakopoulos A., 1993. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 171, 223-9.
- Davignon J., 2005. Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 267-9.
- Davignon J. and Ganz P., 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109, III27-32.
- de Caestecker M., 2004. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 1-11.
- De Vivo A., Baviera G., Giordano D., Todarello G., Corrado F. and D'Anna R., 2008. Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87, 837-42.
- Dechend R., Fiebler A., Lindschau C., Bischoff H., Muller D., Park J. K., Dietz R., Haller H. and Luft F. C., 2001. Modulating angiotensin II-induced inflammation by HMG Co-A reductase inhibition. *Am J Hypertens* 14, 55S-61S.
- Dejana E., Corada M. and Lampugnani M. G., 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9, 910-8.
- Dejana E., Lampugnani M. G., Martinez-Estrada O. and Bazzoni G., 2000. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44, 743-8.
- Dejana E., Valiron O., Navarro P. and Lampugnani M. G., 1997. Intercellular junctions in the endothelium and the control of vascular permeability. *Ann N Y Acad Sci* 811, 36-43; discussion 43-4.
- Derynck R. and Zhang Y. E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-84.
- Duff S. E., Li C., Garland J. M. and Kumar S., 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17, 984-92.
- Dustin M. L., Rothlein R., Bhan A. K., Dinarello C. A. and Springer T. A., 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137, 245-54.
- Fernandez-Ruiz E., St-Jacques S., Bellon T., Letarte M. and Bernabeu C., 1993. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* 64, 204-7.
- Ford I., Murray H., Packard C. J., Shepherd J., Macfarlane P. W. and Cobbe S. M., 2007. Long-term follow-up of the West of Scotland Coronary Prevention Study. *N Engl J Med* 357, 1477-86.

- Forstermann U. and Kleinert H., 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352, 351-64.
- Frenette P. S., Mayadas T. N., Rayburn H., Hynes R. O. and Wagner D. D., 1996. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 84, 563-74.
- Getz G. S. and Reardon C. A., 2012. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 1104-15.
- Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K. and Brown M. S., 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-7.
- Goodenough D. A., Goliger J. A. and Paul D. L., 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65, 475-502.
- Gorelik L. and Flavell R. A., 2000. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12, 171-81.
- Goubergrits L., Affeld K., Fernandez-Britto J. and Falcon L., 2002. Atherosclerosis and flow in carotid arteries with authentic geometries. *Biorheology* 39, 519-24.
- Gougos A. and Letarte M., 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265, 8361-4.
- Goumans M. J. and Mummery C., 2000. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44, 253-65.
- Goumans M. J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Lebrin F., Larsson J., Mummery C., Karlsson S. and ten Dijke P., 2003. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* 12, 817-28.
- Goumans M. J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P. and ten Dijke P., 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 21, 1743-53.
- Grainger D. J., 2007. TGF-beta and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74, 213-22.
- Grainger D. J., Reckless J. and McKilligin E., 2004. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* 173, 6366-75.
- Griendling K. K. and Alexander R. W., 1996. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 10, 283-92.
- Gryglewski R. J., 1995. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 77, 1-9.
- Guerrero-Esteo M., Sanchez-Elsner T., Letamendia A. and Bernabeu C., 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277, 29197-209.
- Harris M. B., Blackstone M. A., Sood S. G., Li C., Goolsby J. M., Venema V. J., Kemp B. E. and Venema R. C., 2004. Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H560-6.
- Hawinkels L. J., Kuiper P., Wiercinska E., Verspaget H. W., Liu Z., Pardali E., Sier C. F. and ten Dijke P., 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70, 4141-50.
- Hayashidani S., Tsutsui H., Shiomi T., Suematsu N., Kinugawa S., Ide T., Wen J. and Takeshita A., 2002. Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 105, 868-73.
- He P., Zeng M. and Curry F. E., 1997. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on basal microvessel permeability and endothelial cell $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol* 273, H747-55.

- Helset E., Ytrehus K., Tveita T., Kjaeve J. and Jorgensen L., 1994. Endothelin-1 causes accumulation of leukocytes in the pulmonary circulation. *Circ Shock* 44, 201-9.
- Hernandez-Presa M. A., Ortego M., Tunon J., Martin-Ventura J. L., Mas S., Blanco-Colio L. M., Aparicio C., Ortega L., Gomez-Gerique J., Vivanco F. and Egido J., 2003. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res* 57, 168-77.
- Hill G. E. and Whitten C. W., 1997. The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis, and the propagation of disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11, 316-21.
- Hirschi K. K., Rohovsky S. A. and D'Amore P. A., 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 141, 805-14.
- Hobbs H. H., Russell D. W., Brown M. S. and Goldstein J. L., 1990. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 24, 133-70.
- Cheifetz S., Bellon T., Cales C., Vera S., Bernabeu C., Massague J. and Letarte M., 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267, 19027-30.
- Chen C. L., Huang S. S. and Huang J. S., 2008. Cholesterol modulates cellular TGF-beta responsiveness by altering TGF-beta binding to TGF-beta receptors. *J Cell Physiol* 215, 223-33.
- Chen J. K., Hoshi H. and McKeehan W. L., 1987. Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5287-91.
- Ikemoto T., Hojo Y., Kondo H., Takahashi N., Hirose M., Nishimura Y., Katsuki T., Shimada K. and Kario K., 2012. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels* 27, 344-51.
- Inoue N., Venema R. C., Sayegh H. S., Ohara Y., Murphy T. J. and Harrison D. G., 1995. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1255-61.
- Ishibashi S., Herz J., Maeda N., Goldstein J. L. and Brown M. S., 1994. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4431-5.
- Jang Y., Lincoff A. M., Plow E. F. and Topol E. J., 1994. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24, 1591-601.
- Janssens S., Flaherty D., Nong Z., Varenne O., van Pelt N., Haustermans C., Zoldhelyi P., Gerard R. and Collen D., 1998. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 97, 1274-81.
- Jerkic M., Rivas-Elena J. V., Prieto M., Carron R., Sanz-Rodriguez F., Perez-Barriocanal F., Rodriguez-Barbero A., Bernabeu C. and Lopez-Novoa J. M., 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 18, 609-11.
- Jeziorska M., 2001. Transforming growth factor-betas and CD105 expression in calcification and bone formation in human atherosclerotic lesions. *Z Kardiol* 90 Suppl 3, 23-6.
- Kalinina N., Agrotis A., Antropova Y., Ilyinskaya O., Smirnov V., Tararak E. and Bobik A., 2004. Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1391-6.

- Kampschulte M., Gunkel I., Stieger P., Sedding D. G., Brinkmann A., Ritman E. L., Krombach G. A. and Langheinrich A. C., 2014. Thalidomide influences atherogenesis in aortas of ApoE/LDLR double knockout mice: a nano-CT study. *Int J Cardiovasc Imaging*.
- Katznelson S., Wilkinson A. H., Kobashigawa J. A., Wang X. M., Chia D., Ozawa M., Zhong H. P., Hirata M., Cohen A. H., Teraski P. I. and et al., 1996. The effect of pravastatin on acute rejection after kidney transplantation--a pilot study. *Transplantation* 61, 1469-74.
- Kay N. E., Bone N. D., Tschumper R. C., Howell K. H., Geyer S. M., Dewald G. W., Hanson C. A. and Jelinek D. F., 2002. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia* 16, 911-9.
- Keaney J. F., Jr., 2000. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 21, 99-166.
- Kerwin J. F., Jr., Lancaster J. R., Jr. and Feldman P. L., 1995. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38, 4343-62.
- Knowles J. W. and Maeda N., 2000. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2336-45.
- Kobashigawa J. A., Katznelson S., Laks H., Johnson J. A., Yeatman L., Wang X. M., Chia D., Terasaki P. I., Sabad A., Cogert G. A. and et al., 1995. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 333, 621-7.
- Kojda G., Husgen B., Hacker A., Perings D., Schnaith E. M., Kottenberg E. and Noack E., 1998. Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in experimental atherosclerosis is dependent on gender. *Cardiovasc Res* 37, 738-47.
- Koleva R. I., Conley B. A., Romero D., Riley K. S., Marto J. A., Lux A. and Vary C. P., 2006. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 281, 25110-23.
- Krams R., Wentzel J. J., Oomen J. A., Vinke R., Schuurbijs J. C., de Feyter P. J., Serruys P. W. and Slager C. J., 1997. Evaluation of endothelial shear stress and 3D geometry as factors determining the development of atherosclerosis and remodeling in human coronary arteries in vivo. Combining 3D reconstruction from angiography and IVUS (ANGUS) with computational fluid dynamics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2061-5.
- Kreisberg J. I., Radnik R. A. and Kreisberg S. H., 1996. Phosphorylation of cAMP responsive element binding protein after treatment of mesangial cells with high glucose plus TGF beta or PMA. *Kidney Int* 50, 805-10.
- Krupinski J., Turu M. M., Luque A., Badimon L. and Slevin M., 2008. Increased PrPC expression correlates with endoglin (CD105) positive microvessels in advanced carotid lesions. *Acta Neuropathol* 116, 537-45.
- Lampugnani M. G. and Dejana E., 1997. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* 9, 674-82.
- Lastres P., Bellon T., Cabanas C., Sanchez-Madrid F., Acevedo A., Gougos A., Letarte M. and Bernabeu C., 1992. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22, 393-7.
- Lastres P., Letamendia A., Zhang H., Rius C., Almendro N., Raab U., Lopez L. A., Langa C., Fabra A., Letarte M. and Bernabeu C., 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 133, 1109-21.
- Lastres P., Martin-Perez J., Langa C. and Bernabeu C., 1994. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* 301 (Pt 3), 765-8.

- Laufs U., La Fata V., Plutzky J. and Liao J. K., 1998. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97, 1129-35.
- Lebrin F., Deckers M., Bertolino P. and Ten Dijke P., 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65, 599-608.
- Lebrin F., Goumans M. J., Jonker L., Carvalho R. L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H. M. and ten Dijke P., 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23, 4018-28.
- Leonarduzzi G., Scavazza A., Biasi F., Chiarpotto E., Camandola S., Vogel S., Dargel R. and Poli G., 1997. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J* 11, 851-7.
- Li C., Guo B., Ding S., Rius C., Langa C., Kumar P., Bernabeu C. and Kumar S., 2003a. TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res* 23, 1189-96.
- Li C., Hampson I. N., Hampson L., Kumar P., Bernabeu C. and Kumar S., 2000. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 14, 55-64.
- Li C., Issa R., Kumar P., Hampson I. N., Lopez-Novoa J. M., Bernabeu C. and Kumar S., 2003b. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* 116, 2677-85.
- Li C., Mollahan P., Baguneid M. S., McMahon R. F., Kumar P., Walker M. G., Freemont A. J. and Kumar S., 2006. A comparative study of neovascularisation in atherosclerotic plaques using CD31, CD105 and TGF beta 1. *Pathobiology* 73, 192-7.
- Li D. Y., Sorensen L. K., Brooke B. S., Urness L. D., Davis E. C., Taylor D. G., Boak B. B. and Wendel D. P., 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-7.
- Li X., van der Meer J. J., van der Loos C. M., Ploegmakers H. J., de Boer O. J., de Winter R. J. and van der Wal A. C., 2012. Microvascular endoglin (CD105) expression correlates with tissue markers for atherosclerotic plaque vulnerability in an ageing population with multivessel coronary artery disease. *Histopathology* 61, 88-97.
- Liao F., Andalibi A., deBeer F. C., Fogelman A. M. and Lusis A. J., 1993. Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 91, 2572-9.
- Liao J. K. and Laufs U., 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 89-118.
- Libby P. and Galis Z. S., 1995. Cytokines regulate genes involved in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 748, 158-68; discussion 168-70.
- Lopez-Novoa J. M. and Bernabeu C., 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H959-74.
- Lukacs N. W., Strieter R. M., Elner V., Evanoff H. L., Burdick M. D. and Kunkel S. L., 1995. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86, 2767-73.
- Lum H. and Malik A. B., 1994. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267, L223-41.
- Lum H. and Malik A. B., 1996. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol* 74, 787-800.
- Lutgens E., Gijbels M., Smook M., Heeringa P., Gotwals P., Kotliansky V. E. and Daemen M. J., 2002. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 975-82.

- Majesky M. W., Lindner V., Twardzik D. R., Schwartz S. M. and Reidy M. A., 1991. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest* 88, 904-10.
- Mallat Z., Gojova A., Marchiol-Fournigault C., Esposito B., Kamate C., Merval R., Fradelizi D. and Tedgui A., 2001. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89, 930-4.
- Mallat Z. and Tedgui A., 2002. The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* 13, 523-9.
- Massague J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-91.
- Massague J., 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 169-78.
- Massague J. and Gomis R. R., 2006. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 580, 2811-20.
- McCaffrey T. A., 2000. TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 103-14.
- McCaffrey T. A., Consigli S., Du B., Falcone D. J., Sanborn T. A., Spokojny A. M. and Bush H. L., Jr., 1995. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest* 96, 2667-75.
- McCaffrey T. A., Du B., Consigli S., Szabo P., Bray P. J., Hartner L., Weksler B. B., Sanborn T. A., Bergman G. and Bush H. L., Jr., 1997. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest* 100, 2182-8.
- McCarey D. W., McInnes I. B., Madhok R., Hampson R., Scherbakov O., Ford I., Capell H. A. and Sattar N., 2004. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 363, 2015-21.
- McIntyre T. M., Modur V., Prescott S. M. and Zimmerman G. A., 1997. Molecular mechanisms of early inflammation. *Thromb Haemost* 78, 302-5.
- Miida T., Hirayama S. and Nakamura Y., 2004. Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. *J Atheroscler Thromb* 11, 253-64.
- Miller N. E., 1987. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 113, 589-97.
- Miyazono K., ten Dijke P. and Heldin C. H., 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75, 115-57.
- Miyoshi T., Tian J., Matsumoto A. H. and Shi W., 2006. Differential response of vascular smooth muscle cells to oxidized LDL in mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Atherosclerosis* 189, 99-105.
- Moncada S., Palmer R. M. and Higgs E. A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-42.
- Murohara T., Horowitz J. R., Silver M., Tsurumi Y., Chen D., Sullivan A. and Isner J. M., 1998. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97, 99-107.
- Nabel E. G., Shum L., Pompili V. J., Yang Z. Y., San H., Shu H. B., Liptay S., Gold L., Gordon D., Derynck R. and et al., 1993. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10759-63.

- Nachtigal P., Pospisilova N., Jamborova G., Pospechova K., Solichova D., Andrys C., Zdansky P., Micuda S. and Semecky V., 2008. Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci* 82, 708-17.
- Nachtigal P., Pospisilova N., Vecerova L., Micuda S., Breckova E., Pospechova K. and Semecky V., 2009. Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* 16, 265-74.
- Nachtigal P., Zemankova Vecerova L., Rathouska J. and Strasky Z., 2012. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 224, 4-11.
- Nakao A., Miike S., Hatano M., Okumura K., Tokuhisa T., Ra C. and Iwamoto I., 2000. Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *J Exp Med* 192, 151-8.
- Nakashima Y., Plump A. S., Raines E. W., Breslow J. L. and Ross R., 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-40.
- Nakashima Y., Raines E. W., Plump A. S., Breslow J. L. and Ross R., 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 842-51.
- Naples M., Federico L. M., Xu E., Nelken J. and Adeli K., 2008. Effect of rosuvastatin on insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance: evidence for statin-induced hepatic insulin sensitization. *Atherosclerosis* 198, 94-103.
- Nikol S., Isner J. M., Pickering J. G., Kearney M., Leclerc G. and Weir L., 1992. Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *J Clin Invest* 90, 1582-92.
- Nishikawa S. I., Hirashima M., Nishikawa S. and Ogawa M., 2001. Cell biology of vascular endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 947, 35-40; discussion 41.
- Oi S., Haneda T., Osaki J., Kashiwagi Y., Nakamura Y., Kawabe J. and Kikuchi K., 1999. Lovastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat heart cells. *Eur J Pharmacol* 376, 139-48.
- Ota T., Fujii M., Sugizaki T., Ishii M., Miyazawa K., Aburatani H. and Miyazono K., 2002. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 193, 299-318.
- Otsuji S., Nakajima O., Waku S., Kojima S., Hosokawa H., Kinoshita I., Okubo T., Tamoto S., Takada K., Ishihara T. and et al., 1995. Attenuation of acetylcholine-induced vasoconstriction by L-arginine is related to the progression of atherosclerosis. *Am Heart J* 129, 1094-100.
- Paigen B., Mitchell D., Reue K., Morrow A., Lusis A. J. and LeBoeuf R. C., 1987a. Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3763-7.
- Paigen B., Morrow A., Holmes P. A., Mitchell D. and Williams R. A., 1987b. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68, 231-40.
- Panchenko M. P., Williams M. C., Brody J. S. and Yu Q., 1996. Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol* 270, L547-58.
- Panousis C. G., Evans G. and Zuckerman S. H., 2001. TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma. *J Lipid Res* 42, 856-63.

- Park J. Y., Seong J. K. and Paik Y. K., 2004. Proteomic analysis of diet-induced hypercholesterolemic mice. *Proteomics* 4, 514-23.
- Perez-Gomez E., Eleno N., Lopez-Novoa J. M., Ramirez J. R., Velasco B., Letarte M., Bernabeu C. and Quintanilla M., 2005. Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 24, 4450-61.
- Piao M. and Tokunaga O., 2006. Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study. *J Atheroscler Thromb* 13, 82-9.
- Porreca E., Di Febbo C., Baccante G., Di Nisio M. and Cuccurullo F., 2002. Increased transforming growth factor-beta(1) circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition with pravastatin. *J Am Coll Cardiol* 39, 1752-7.
- Pospisilova N., Semecky V., Jamborova G., Pospechova K., Solichova D., Andrys C., Zdansky P. and Nachtigal P., 2006. Endoglin expression in hyper-cholesterolemia and after atorvastatin treatment in apoE-deficient mice. *J Pharm Pharm Sci* 9, 388-97.
- Price D. T. and Loscalzo J., 1999. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 107, 85-97.
- Qu R., Silver M. M. and Letarte M., 1998. Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* 292, 333-43.
- Raffai R. L., Loeb S. M. and Weisgraber K. H., 2005. Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 436-41.
- Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Brckova E., Mullerova Z., Andrys C., Micuda S. and Nachtigal P., 2011. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 64, 53-9.
- Reddick R. L., Zhang S. H. and Maeda N., 1994. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14, 141-7.
- Rezaie-Majd A., Prager G. W., Bucek R. A., Scherthaner G. H., Maca T., Kress H. G., Valent P., Binder B. R., Minar E. and Baghestanian M., 2003. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 397-403.
- Rius C., Smith J. D., Almendro N., Langa C., Botella L. M., Marchuk D. A., Vary C. P. and Bernabeu C., 1998. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 92, 4677-90.
- Roberts A. B. and Sporn M. B., 1993. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8, 1-9.
- Robertson A. K., Rudling M., Zhou X., Gorelik L., Flavell R. A. and Hansson G. K., 2003. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 112, 1342-50.
- Roelen B. A., van Rooijen M. A. and Mummery C. L., 1997. Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn* 209, 418-30.
- Ross R. and Glomset J. A., 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180, 1332-9.
- Rossi E., Sanz-Rodriguez F., Eleno N., Duwell A., Blanco F. J., Langa C., Botella L. M., Cabanas C., Lopez-Novoa J. M. and Bernabeu C., 2013. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 121, 403-15.

- Sanchez-Elsner T., Botella L. M., Velasco B., Langa C. and Bernabeu C., 2002. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277, 43799-808.
- Santibanez J. F., Letamendia A., Perez-Barriocanal F., Silvestri C., Saura M., Vary C. P., Lopez-Novoa J. M., Attisano L. and Bernabeu C., 2007. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210, 456-68.
- Scalia R., Gooszen M. E., Jones S. P., Hoffmeyer M., Rimmer D. M., 3rd, Trocha S. D., Huang P. L., Smith M. B., Lefer A. M. and Lefer D. J., 2001. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 103, 2598-603.
- She X., Matsuno F., Harada N., Tsai H. and Seon B. K., 2004. Synergy between anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies and TGF-beta in suppression of growth of human endothelial cells. *Int J Cancer* 108, 251-7.
- Shi W., Pei H., Fischer J. J., James J. C., Angle J. F., Matsumoto A. H., Helm G. A. and Sarembock I. J., 2004. Neointimal formation in two apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *J Lipid Res* 45, 2008-14.
- Shi W., Wang N. J., Shih D. M., Sun V. Z., Wang X. and Lusis A. J., 2000. Determinants of atherosclerosis susceptibility in the C3H and C57BL/6 mouse model: evidence for involvement of endothelial cells but not blood cells or cholesterol metabolism. *Circ Res* 86, 1078-84.
- Shi Y., O'Brien J. E., Jr., Fard A. and Zalewski A., 1996. Transforming growth factor-beta 1 expression and myofibroblast formation during arterial repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1298-305.
- Shiomi M. and Ito T., 1999. Effect of cerivastatin sodium, a new inhibitor of HMG-CoA reductase, on plasma lipid levels, progression of atherosclerosis, and the lesional composition in the plaques of WHHL rabbits. *Br J Pharmacol* 126, 961-8.
- Shyu K. G., Wang B. W., Chen W. J., Kuan P. and Hung C. R., 2010. Mechanism of the inhibitory effect of atorvastatin on endoglin expression induced by transforming growth factor-beta1 in cultured cardiac fibroblasts. *Eur J Heart Fail* 12, 219-26.
- Schnerer O., Meurer S. K., Tihaa L., Gressner A. M. and Weiskirchen R., 2007. Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem* 282, 13934-43.
- Schmidt-Weber C. B., Letarte M., Kunzmann S., Ruckert B., Bernabeu C. and Blaser K., 2005. TGF- β signaling of human T cells is modulated by the ancillary TGF- β receptor endoglin. *Int Immunol* 17, 921-30.
- Schulick A. H., Taylor A. J., Zuo W., Qiu C. B., Dong G., Woodward R. N., Agah R., Roberts A. B., Virmani R. and Dichek D. A., 1998. Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6983-8.
- Siegel P. M. and Massague J., 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-21.
- Silbernagl S., Lang F., 2001. Atlas patofyziologie člověka, 1st Edition. Grada Publishing, Praha, 236-9.
- Spiecker M., Peng H. B. and Liao J. K., 1997. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of IkappaBalpha. *J Biol Chem* 272, 30969-74.
- St-Jacques S., Cymerman U., Pece N. and Letarte M., 1994. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134, 2645-57.

- Strasky Z., Vecerova L., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Kudlackova Z., Andrys C., Micuda S. and Nachtigal P., 2011. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J* 75, 1747-55.
- Subang M. C., Stewart-Phillips J. L. and Gagnon R. F., 1992. Effect of lovastatin on hypercholesterolemia in chronic renal failure. *Adv Perit Dial* 8, 381-4.
- Sukhova G. K., Williams J. K. and Libby P., 2002. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1452-8.
- Tashiro H., Shimokawa H., Sadamatu K. and Yamamoto K., 2002. Prognostic significance of plasma concentrations of transforming growth factor-beta in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 13, 139-43.
- ten Dijke P. and Hill C. S., 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29, 265-73.
- Toborek M., Barger S. W., Mattson M. P., Barve S., McClain C. J. and Hennig B., 1996. Linoleic acid and TNF-alpha cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells. *J Lipid Res* 37, 123-35.
- Toborek M. and Hennig B., 1994. Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 59, 60-5.
- Toborek M. and Hennig B., 1998. The role of linoleic acid in endothelial cell gene expression. Relationship to atherosclerosis. *Subcell Biochem* 30, 415-36.
- Toporsian M., Gros R., Kabir M. G., Vera S., Govindaraju K., Eidelman D. H., Husain M. and Letarte M., 2005. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96, 684-92.
- Tracey K. J. and Cerami A., 1992. Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels. *Proc Soc Exp Biol Med* 200, 233-9.
- Valdimarsdottir G., Goumans M. J., Rosendahl A., Brugman M., Itoh S., Lebrin F., Sideras P. and ten Dijke P., 2002. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106, 2263-70.
- van de Kerkhof P. C., Rulo H. F., van Pelt J. P., van Vlijmen-Willems I. M. and De Jong E. M., 1998. Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* 78, 19-21.
- VanderLaan P. A., Reardon C. A. and Getz G. S., 2004. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 12-22.
- Vanhoutte P. M., 1997. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 18 Suppl E, E19-29.
- Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Micuda S. and Nachtigal P., 2012. Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 19, 115-26.
- Venkatesha S., Toporsian M., Lam C., Hanai J., Mammoto T., Kim Y. M., Bdolah Y., Lim K. H., Yuan H. T., Libermann T. A., Stillman I. E., Roberts D., D'Amore P. A., Epstein F. H., Sellke F. W., Romero R., Sukhatme V. P., Letarte M. and Karumanchi S. A., 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12, 642-9.
- Verma S. and Anderson T. J., 2002. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 105, 546-9.

- Vidal F., Colome C., Martinez-Gonzalez J. and Badimon L., 1998. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 252, 378-84.
- Virchow R., 1858. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. *Nutr Rev* 47, 23-5.
- Vollmer T., Key L., Durkalski V., Tyor W., Corboy J., Markovic-Plese S., Preiningerova J., Rizzo M. and Singh I., 2004. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363, 1607-8.
- Wahl S. M., Allen J. B., Weeks B. S., Wong H. L. and Klotman P. E., 1993. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4577-81.
- Waite K. A. and Eng C., 2003. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 4, 763-73.
- Walshe T. E., Dole V. S., Maharaj A. S., Patten I. S., Wagner D. D. and D'Amore P. A., 2009. Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1185-92.
- Ward M. R., Agrotis A., Kanellakis P., Dilley R., Jennings G. and Bobik A., 1997. Inhibition of protein tyrosine kinases attenuates increases in expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors following arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2461-70.
- Watabe T., Nishihara A., Mishima K., Yamashita J., Shimizu K., Miyazawa K., Nishikawa S. and Miyazono K., 2003. TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Biol* 163, 1303-11.
- Werner F., Jain M. K., Feinberg M. W., Sibinga N. E., Pellacani A., Wiesel P., Chin M. T., Topper J. N., Perrella M. A. and Lee M. E., 2000. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem* 275, 36653-8.
- Wierzbicki A. S., 2003. Statin therapy in people with diabetes and high-risk patients. *Hosp Med* 64, 16-9.
- Wierzbicki A. S., Poston R. and Ferro A., 2003. The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther* 99, 95-112.
- Wieser R., Wrana J. L. and Massague J., 1995. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* 14, 2199-208.
- Williams B., Baker A. Q., Gallacher B. and Lodwick D., 1995. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25, 913-7.
- Williams K. J. and Tabas I., 1995. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 551-61.
- Witting P. K., Pettersson K., Ostlund-Lindqvist A. M., Westerlund C., Eriksson A. W. and Stocker R., 1999. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J* 13, 667-75.
- Wolf Y. G., Rasmussen L. M. and Ruoslahti E., 1994. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* 93, 1172-8.
- Wood K. M., Cadogan M. D., Ramshaw A. L. and Parums D. V., 1993. The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopathology* 22, 437-44.
- Wrana J. L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. and Massague J., 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341-7.

- Wysocki S. J., Zheng M. H., Fan Y., Lamawansa M. D., House A. K. and Norman P. E., 1996. Expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) genes during arterial repair in the pig. *Cardiovasc Res* 31, 28-36.
- Yamamoto Y., Yamashita T., Kitagawa F., Sakamoto K., Giddings J. C. and Yamamoto J., 2010. The effect of the long term aspirin administration on the progress of atherosclerosis in apoE^{-/-} LDLR^{-/-} double knockout mouse. *Thromb Res* 125, 246-52.
- Yanavitski M. and Givertz M. M., 2011. Novel biomarkers in acute heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 8, 206-11.
- Yao Y., Shao E. S., Jumabay M., Shahbazian A., Ji S. and Bostrom K. I., 2008. High-density lipoproteins affect endothelial BMP-signaling by modulating expression of the activin-like kinase receptor 1 and 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2266-74.
- Yao Y., Zebboudj A. F., Torres A., Shao E. and Bostrom K., 2007. Activin-like kinase receptor 1 (ALK1) in atherosclerotic lesions and vascular mesenchymal cells. *Cardiovasc Res* 74, 279-89.
- Yoshida Y., Okano M., Wang S., Kobayashi M., Kawasumi M., Hagiwara H. and Mitsumata M., 1995. Hemodynamic-force-induced difference of interendothelial junctional complexes. *Ann N Y Acad Sci* 748, 104-20; discussion 120-1.
- Youssef S., Stuve O., Patarroyo J. C., Ruiz P. J., Radosevich J. L., Hur E. M., Bravo M., Mitchell D. J., Sobel R. A., Steinman L. and Zamvil S. S., 2002. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420, 78-84.
- Zadelaar S., Kleemann R., Verschuren L., de Vries-Van der Weij J., van der Hoorn J., Princen H. M. and Kooistra T., 2007. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1706-21.
- Zhang H., Shaw A. R., Mak A. and Letarte M., 1996. Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol* 156, 564-73.
- Zhou Q. and Liao J. K., 2010. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ J* 74, 818-26.

10. SOUBOR PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

PŘÍLOHY

(v pořadí dle 4. kapitoly)

Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis.

Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Brcakova E., Mullerova Z., Andrys C.,

Micuda S., Nachtigal P. (2011); *Pharmacological Research* 64(1): 53-59

Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta
of normocholesterolemic mice with different predisposition to atherosclerosis.
Rathouska J., Nemeckova I., Zemankova L., Strasky Z., Jezkova K., Varejckova M.,
Nachtigal P. (2014); *Heart and Vessels* Mar 15. [Epub ahead of print]

Endoglin is not co-expressed with cell
adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice.
Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Zemankova L., Varejckova M., Nachtigal P.;
Histology and Histopathology (manuscript v recenzním řízení)

Cholesterol effects on endoglin and its
downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice.

Strasky Z., Vecerova L., Rathouska J., Slanarova M., Breckova E., Kudlackova Z., Andrys C.,
Micuda S., Nachtigal P. (2011); *Circulation Journal* 75(7): 1747-1755

Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin
is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice.
Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Micuda S., Nachtigal P.
(2012); *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 19(2): 115-126

The role of endoglin in atherosclerosis.

Nachtigal P., Zemankova Vecerova L., Rathouska J., Strasky Z. (2012);

Atherosclerosis 224(1): 4-11