

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

Vliv statinů na TGF- β 1 signalizační kaskádu *in vivo* a *in vitro*

Disertační práce

Mgr. Lenka Zemánková

Vedoucí disertační práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za vedení mého pre- i postgraduálního studia a cenné rady při tvorbě této disertační práce. Děkuji za spolupráci svým kolegům a přátelům z Katedry farmakologie a toxikologie a také kolegům z Lékařské fakulty v Hradci Králové. Děkuji doktorce Luise Botella Cubells z centra CIB-CSIC v Madridu za získání nových poznatků v oblasti *in vitro* experimentů. Rovněž děkuji pracovníkům z Katedry biologických a lékařských věd, kteří mi při mé práci pomáhali a vytvářeli přátelské prostředí po celou dobu mého studia.

Děkuji také za finanční podporu grantovým projektům GAUK 129208/C, 300811/C, 137310/C, 136310/C, a projektu SVV-2014-260-064, Výzkumnému záměru MŠMT ČR MSM0021620820 a Výzkumnému projektu MZO 001799060.

Mé největší poděkování patří mé rodině a blízkým za jejich podporu a trpělivost v průběhu celého studia.

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.“

Lenka Zemánková

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Mgr. Lenka Zemánková

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

Název disertační práce: Vliv statinů na TGF- β 1 signalizační kaskádu *in vivo* a *in vitro*.

Tato disertační práce je zaměřena na studium vlivu statinů a zánětu na TGF- β 1 signalizaci, především na endoglin a jeho význam ve vztahu k endotelu, jak *in vivo*, tak *in vitro*.

Transformující růstový faktor beta (TGF- β) je multifunkční růstový faktor, který reguluje řadu specifických buněčných pochodů v aterogenezi. Endoglin (TGF- β RIII, CD105) je považován za pomocný TGF- β receptor, který může ovlivnit aktivitu TGF- β 1 a dalších TGF- β receptorů. Byla popsána spojitost mezi endoglinem a expresí eNOS v cévách, což ukazuje na klíčovou roli endoglinu pro funkci endotelových buněk.

Naše *in vivo* experimenty byly zaměřeny na studium exprese členů TGF- β signalizace, na expresi endoglinu v myší aortě a jeho hladiny v séru. Dále jsme zjišťovali, zda jsou tyto proteiny ovlivněny cholesterolem či podáváním atorvastatinu v dietě. Imunohistochemická analýza prokázala lokalizaci endoglinu na endotelu cév bez aterosklerózy a také na povrchu aterosklerotických plátů. Dále byla pozorována kolokalizace endoglinu, Smad2, pSmad2/3 a eNOS na endotelu aorty. Podávání cholesterolové diety vedlo ke zvýšení hladin cholesterolu a zvýšení solubilního endoglinu, zároveň ke snížení exprese endoglinu v aortě. Atorvastatin v kombinaci se standardní dietou zvýšil hladiny cholesterolu, ale hladiny endoglinu v séru zůstaly beze změny. Western blot analýza prokázala zvýšení exprese endoglinu a ostatních sledovaných proteinů TGF- β kaskády v myší aortě po podávání atorvastatinu, bez ohledu na jeho hypolipidemický účinek. Při podávání atorvastatinu v kombinaci s cholesterolovou dietou došlo k poklesu hladin cholesterolu a také hladin solubilního endoglinu, zároveň byla detekována jeho zvýšená exprese v aortě. Na základě těchto výsledků lze říci, že hladiny sérového endoglinu a jeho exprese v aortě se mění ve vztahu k hladinám cholesterolu a podávání atorvastatinu u ApoE/LDLR deficientního myšího

modelu. Navíc bylo zjištěno, že hladiny sérového endoglinu jsou opačné vzhledem k jeho expresi v aortě. Zdá se tedy, že endoglin by mohl být zajímavý biomarker probíhající aterogeneze v cévní stěně či případně účinnosti statinové terapie. Navíc popisovaná aktivace endoglin/ALK5/Smad2/3 signalizace představuje možný mechanismus protekce cévní stěny vůči ateroskleróze.

V *in vitro* studii jsme se zaměřili na expresi endoglinu a eNOS během zánětu a po podávání atorvastatinu u endotelových buněk (HUVEC). Také jsme studovali, zda zvyšování exprese eNOS po podávání statinu je nějak spojeno s expresí endoglinu. Podávání atorvastatinu vedlo ke zvýšení exprese endoglinu a eNOS u HUVEC buněk. Naopak indukce zánětu, po podání TNF α po dobu 16h, vedla ke snížení exprese endoglinu a zároveň ke zvýšení jeho solubilní formy v médiu. Preventivní podávání atorvastatinu, před podáním TNF α , vedlo k zabránění poklesu exprese endoglinu a eNOS, který způsobuje samotný TNF α . Indukce zánětu tedy vede k poklesu exprese endoglinu a eNOS u endotelových buněk a podání atorvastatinu brání tomuto poklesu. Snížení exprese endoglinu u buněk se siRNA endoglinu ukázalo, že endoglin je pravděpodobně zásadní pro indukci exprese eNOS po podání statinů, protože siRNA endoglinu vedla k tomu, že takto ovlivněné buňky nejsou schopny zvyšovat expresi eNOS po podání atorvastatinu.

Endoglin a eNOS jsou významné v řadě patologických stavů jako je ateroskleróza, hypertenze, diabetes mellitus, preeklamsie a hereditární hemoragická teleangiektázie (HHT). Z těchto důvodů lze konstatovat, že účinky statinů na signalizaci endoglinu a jeho ovlivnění exprese eNOS by mohly vést k pozitivnímu účinku v procesu aterosklerózy, případně jiných onemocnění, u kterých dochází k poklesu endoglinu a eNOS jako je např. hereditární hemoragická teleangiektázie. Nicméně je nezbytné dosud získaná data ověřit v klinických studiích.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Mgr. Lenka Zemánková

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

Title of Doctoral Thesis: The effects of statins on TGF- β 1 signaling *in vivo* and *in vitro*.

This doctoral dissertation summarizes the effects of statins and inflammation on TGF- β 1 signaling both *in vivo* and *in vitro*, especially the role of endoglin in the endothelial cells.

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a multifunctional factor that regulates various cell specific functions in atherogenesis. Endoglin (TGF- β RIII, CD105) is known as accessory TGF- β receptor, and it is able to modulate activity of TGF- β 1 and TGF- β receptors. Previous studies demonstrated relation between endoglin and eNOS expression in blood vessels suggesting crucial role of endoglin in endothelial cell functions.

Our *in vivo* experimental studies, were focused on the expressions of TGF- β family members, on endoglin expression in aorta and its blood serum levels. We wanted to evaluate, whether these proteins are affected by cholesterol levels or atorvastatin treatment in different types of diet in mice. Immunohistochemical analysis showed the expression of endoglin in intact endothelium and in endothelium covering atherosclerotic lesions. Moreover, co-localization of endoglin, Smad2, pSmad2/3 and eNOS in aortic endothelium was described. Cholesterol feeding resulted in an increased cholesterol and soluble endoglin levels in blood serum, with concurrent decrease of its expression in aorta. Atorvastatin treatment in mice on chow diet resulted in a significant increase of cholesterol, whereas endoglin levels in blood serum remained unchanged. Moreover, Western blot analysis revealed that atorvastatin treatment significantly increased the expression of endoglin and other proteins of TGF- β signaling in aorta beyond its lipid lowering effects. The administration of atorvastatin in cholesterol fed mice resulted in a significant decrease of cholesterol and endoglin levels in blood serum, with concurrent increase of endoglin expression in aorta. These data show that endoglin blood serum levels and its expression in aorta are affected by both atorvastatin treatment and

cholesterol levels in ApoE/LDLR double knockout mice. Moreover, changes in blood serum levels are conversely related to endoglin expression in aorta. Thus, we propose that endoglin might be interesting blood marker, which could reflect atherosclerotic process in the vessel wall and efficiency of statin treatment. Moreover, activation of endoglin/ALK-5/Smad2/3 signaling might represent protective mechanism in aortic endothelium.

In our *in vitro* study, we focused on endoglin and eNOS expression during inflammation and after atorvastatin treatment in HUVEC cells. We also hypothesized whether statin induced eNOS expression depends on endoglin. Atorvastatin treatment significantly increased endoglin and eNOS expression in HUVECs. TNF α treatment for 16h significantly reduced endoglin expression, together with significant increase of soluble endoglin in medium. Atorvastatin pretreatment, before TNF α exposure, significantly prevented decrease of endoglin and eNOS expression mediated by TNF α . These results showed that inflammation reduces expression of endoglin and eNOS in HUVECs, which could be prevented by atorvastatin treatment. Moreover, endoglin siRNA experiment showed, that atorvastatin induced eNOS expression seems to be dependent on proper endoglin expression.

Endoglin and eNOS play important role in various cardiovascular pathologies including atherosclerosis, hypertension, diabetes, preeclampsia and hereditary hemorrhagic telangiectasia. For these reasons, we propose that statin effects on endoglin signaling and its regulation of eNOS expression may contribute to the positive effects on atherosclerosis and other diseases where lower levels of endoglin and eNOS were described including hereditary hemorrhagic telangiectasia. However, this hypotheses must be evaluated in clinical studies.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 9 |
| 2. Teoretická část | 11 |
| 2.1. Ateroskleróza a její rozvoj | 11 |
| 2.2. Myší modely aterosklerózy | 13 |
| 2.3. TGF- β signalizace | 14 |
| 2.4. Endoglin | 17 |
| 2.5. Endotelová NO syntáza..... | 20 |
| 2.6. Statiny | 22 |
| 3. Cíle práce | 28 |
| 4. Komentáře k publikovaným pracím | 29 |
| 4.1. Atorvastatin zvyšuje ENG, SMAD2, pSMAD2/3 a eNOS expresi u ApoE/LDLR def. myšího modelu | 29 |
| 4.2. Imunohistochemická studie kolokalizace ENG s eNOS, SMAD2, pSMAD2/3 u myších modelů | 30 |
| 4.3. Vliv cholesterolu na ENG a jeho signalizaci u ApoE/LDLR def. myší..... | 31 |
| 4.4. Endoglin jako možný marker pro sledování přínosu atorvastatinové terapie v ateroskleróze | 32 |
| 4.5. Aktivace TGF- β signalizace po podání atorvastatinu souvisí se snížením aterogeneze u ApoE/LDLR def. myšího modelu | 33 |
| 4.6. Role endoglinu v procesu aterosklerózy | 35 |
| 4.7. ENG je zapojen do zvýšení exprese eNOS při podání atorvastatinu u endotelových buněk <i>in vitro</i> | 36 |
| 4.8. Souhrnná diskuze a shrnutí | 37 |
| 5. Závěry | 42 |
| 6. Podíl předkladatelky na publikovaných pracích zahrnutých v disertační práci..... | 43 |
| 7. Přehled publikační činnosti..... | 45 |
| 8. Prezentace na konferencích | 47 |
| 9. Seznam zkratk | 49 |
| 10. Použitá literatura | 51 |
| 11. Přílohy..... | 59 |

1. Úvod

Ateroskleróza je komplexní onemocnění, které se rozvíjí po řadu let a je ovlivněno řadou rizikových faktorů. Úlohu zde má mnoho typů buněk a faktorů. Přestože je toto onemocnění studováno už více než 30 let a byla popsána již řada mechanismů, stále je zde řada nepoznaného. Proto snad další studie přinesou poznatky vedoucí k rozvoji nových přístupů v léčbě aterosklerózy.

Statiny jsou vysoce účinná léčiva snižující plazmatické hladiny cholesterolu a snižující riziko infarktu myokardu a cévní mozkové příhody. Nicméně mnoho studií již ukázalo, že protektivní účinek statinů nesouvisí jen se snižováním cholesterolu, ale spíše přímo s ovlivněním funkce endotelu, a také s anti-trombotickými a protizánětlivými efekty (Martinez-Gonzalez and Badimon, 2007).

Členové TGF- β a BMP signalizace hrají klíčovou úlohu v regulaci funkce endotelových buněk. Byla popsána řada molekulárních mechanismů, kterými tyto molekuly ovlivňují cévní systém. Protikladné efekty TGF- β signalizace jsou podmíněny typem buněk, koncentrací jednotlivých cytokinů či přítomností jejich receptorů v daném místě. Identifikace a popis jednotlivých molekul a mechanismů zapojených do TGF- β signalizace přispěje k pochopení pro- a anti-angiogenních účinků TGF- β . Kombinace anti-proliferativního a protizánětlivého účinku TGF- β jak na buňky imunitního systému, tak na další typy buněk v aterosklerotickém plátu, ukazuje na jeho protektivní roli v aterogenezi. V rozvoji aterosklerózy vykazuje TGF- β protektivní účinky zejména proti tvorbě nestabilního plátu, stimuluje buňky hladké svaloviny k produkci kolagenu a potlačuje aktivitu T-buněk (Bobik, 2006).

Endoglin jako součást TGF- β receptorového komplexu má významnou úlohu v rozvoji aterosklerózy. Je možné monitorovat jeho expresi jak v tkáni, tak jeho hladiny v cirkulaci. V ateroskleróze je exprimován zejména na endotelu a v buňkách hladké svaloviny aterosklerotických cév, a jeho funkce je spojena s migrací a proliferací buněk hladké svaloviny cév a regulací aktivity endotelových buněk. Zvýšené hladiny solubilního endoglinu inhibují TGF- β signalizaci v cévní stěně což může vést k rozvoji endotelové dysfunkce, aterosklerózy a následně jejím komplikacím. Zároveň je možné tyto hladiny snížit například prostřednictvím statinové terapie a tím podpořit TGF- β signalizaci v cévách (Nachtigal et al., 2012).

Hypotéza, týkající se ovlivnění tkáňové exprese a hladin solubilního endoglinu, byla testována v naší laboratoři pro významnost například v možné terapii pacientů s hereditární hemoragickou teleangiektázií, či možností použití solubilního endoglinu jako markeru progresu aterosklerózy a účinnosti terapie. Samozřejmě je nezbytné budoucí ověření v klinických studiích.

Za fyziologických podmínek je oxid dusnatý (NO) v cévách produkován enzymem endotelovou NO syntázou (eNOS) a má anti-hypertenzní a anti-trombotické účinky. Vede k relaxaci buněk hladké svaloviny v cévách, inhibuje agregaci destiček a adhezi leukocytů k cévní stěně, tím přispívá k inhibici aterogeneze. V případě aterosklerózy je dostupnost NO snížena v důsledku zvýšené inaktivace NO kyslíkovými radikály a inhibice či nesprávné funkce eNOS (Li and Forstermann, 2009). Je popsána souvislost mezi endoglinem a eNOS, kdy endoglin reguluje expresi a správnou funkci eNOS a tím účinky NO na endotelové buňky (Jerkic et al., 2004; Toporsian et al., 2005). Ovlivnění exprese endoglinu pomocí statinové terapie a následné ovlivnění exprese eNOS by mohlo být zajímavým terapeutickým přístupem v léčbě aterosklerózy.

Statiny mohou být prospěšné jak svými účinky na snížení cholesterolu, tak mechanismy nezávislými na hladinách cholesterolu. Jsou tedy neocenitelným nástrojem v prevenci a terapii kardiovaskulárních chorob. Zlepšením funkce endotelu a produkce NO může léčba statiny omezit rozvoj aterosklerózy a zvýšit klinický přínos pro pacienty. Proto studium a pochopení mechanismů, kterými statiny regulují anti-aterogenní účinky TGF- β /endoglin signalizace představují důležitý cíl současného výzkumu.

Tato disertační práce byla vypracována jako součást dlouhodobého výzkumu aterosklerózy na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Zahrnuje výsledky z experimentů na myších modelech a také po zavedení *in vitro* metodik na pracovišti výsledky z experimentů na buněčných liniích.

2. Teoretická část

2.1. Ateroskleróza a její rozvoj

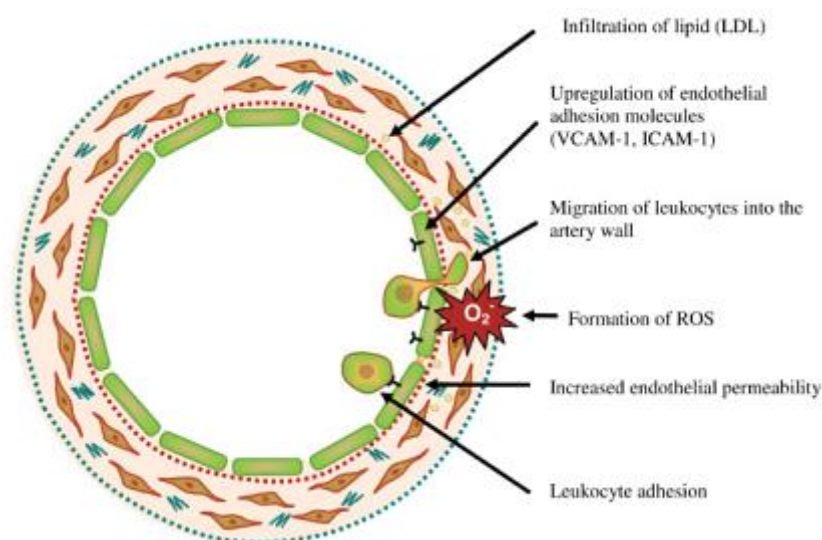
Ateroskleróza je obecně považována za onemocnění, při kterém dochází ke kumulaci lipidů v cévní stěně, zejména LDL cholesterolu. Přestože v posledních letech došlo ke změnám v životním stylu i k rozmachu farmakologické léčby, jsou onemocnění kardiovaskulárního systému stále hlavní příčinou úmrtí. Toto onemocnění je definováno jako zánětlivé a je potřeba nahlížet na něj jako na soubor specifických odpovědí na buněčné i molekulární úrovni (Ross, 1999).

Z epidemiologického hlediska jsou koronární onemocnění nejčastější příčinou smrti v Evropě. Mortalita je u mužů vyšší než u žen a stoupá s věkem, navíc je ovlivněná etnickým původem a sociálním postavením. Obecně jsou rizikové faktory rozdělovány na osobní (neovlivnitelné – věk, pohlaví, rodinná zátěž), způsobené životním stylem (ovlivnitelné – kouření, dieta bohatá na nasycené tuky a cukry, pohybová inaktivita, emoční stres, nadměrná konzumace alkoholu a obezita) a faktory biochemické a fyziologické (ovlivnitelné – hyperlipoproteinemie, hypertenze, nízký HDL cholesterol, hypertriglyceridemie, diabetes mellitus, trombogenní faktory) (George and Lyon, 2010).

Prvotním dějem v rozvoji aterosklerózy je endotelová dysfunkce, která se rozvíjí na podkladě řady reakcí cévní stěny na poškození, což popisuje obrázek 1. Výstelku normální cévní stěny tvoří jedna vrstva endotelových buněk, která se spolu se sub-endotelovým prostorem nazývá tunica intima. Následuje vrstva tunica media, která obsahuje elastickou tkáň a buňky hladké svaloviny (George and Lyon, 2010). Mezi možné příčiny vzniku endotelové dysfunkce patří zvýšený a modifikovaný LDL cholesterol (oxidací, navázáním cukerných zbytků, shlukováním, tvorbou komplexů, pohlcováním makrofágy a vznikem pěnových buněk), volné radikály v důsledku kouření, onemocnění jako hypertenze a diabetes mellitus, zvýšená plazmatická koncentrace homocysteinu (toxická pro endotel, pro-trombogenní, snižuje dostupnost oxidu dusnatého), genetické modifikace a infekce způsobené mikroorganismy. Vysoká koncentrace vasokonstrikčního angiotenzinu II v důsledku hypertenze, podporuje růst buněk hladké svaloviny a tvorbu volných radikálů. Rozvíjí se řada kompenzačních mechanismů, které ovlivňují přirozenou homeostázu cévního endotelu. Zvyšuje se přilnavost leukocytů a destiček k endotelu a také jeho propustnost. Mění se jeho protisrážlivý charakter směrem k pro-koagulačnímu. Aterosklerotická ložiska vznikají

především ve velkých a středně velkých arteriích elastického a svalového typu (Ross, 1999).

Pokračování zánětlivé reakce vede ke kumulaci makrofágů a lymfocytů ve stěně cévy a k rozvoji aterosklerotické léze označované jako tukové proužky. Tukové proužky jsou malé, mírně vyvýšené léze způsobené lokálním nahromaděním pěnových buněk v intimě. Mohou být počátkem vzniku velké aterosklerotické léze, ale také mohou ustoupit. Do jisté míry lze považovat za součást fyziologických změn v aortě. Progrese těchto proužků vede ke vzniku komplexnějších lézí. Pěnové buňky praskají a uvolňují svůj obsah, tak se vytváří jádro léze, které tvoří tukové látky a nekrotická tkáň. Migrace a proliferace buněk hladké svaloviny vede ke tvorbě fibrózní čepičky, která tvoří ochrannou vrstvu mezi lézí a lumen cévy (George and Lyon, 2010; Ross, 1999). Typy aterosklerotických plátů se mohou klasifikovat právě dle charakteru jádra a fibrózní čepičky. Nestabilní plát je tvořen velkým nekrotickým jádrem, s vysokým obsahem buněk zánětu, a tenkou fibrózní čepičkou. Plát s malým nekrotickým jádrem, s nízkým obsahem buněk zánětu, a s tlustou fibrózní čepičkou se označuje jako stabilní aterosklerotický plát, který je méně náchylný k prasknutí. Rozvinutá komplikovaná léze zasahuje do lumen cévy a ovlivňuje průtok krve. Hrozící prasknutí plátu a vznik trombózy je příčinou až poloviny akutních koronárních příhod a infarktů myokardu (Stary et al., 1995; Stary et al., 1994).



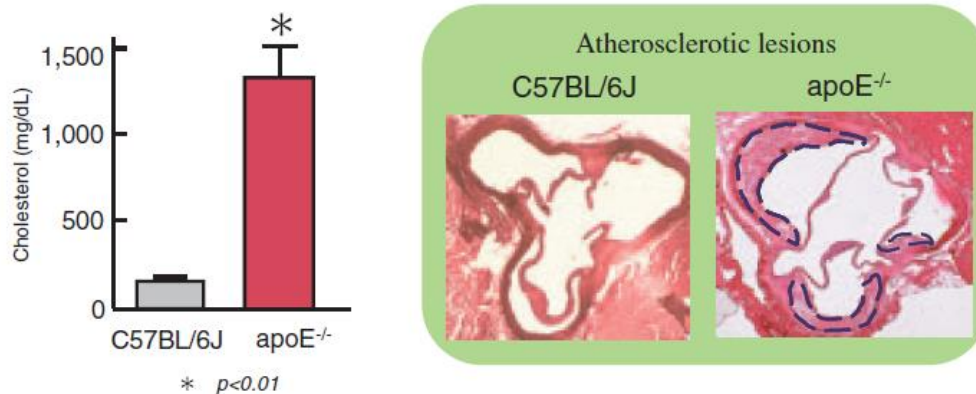
Obrázek 1: Vznik aterosklerotického plátu – endotelová dysfunkce (George and Lyon, 2010).

Rozvoji aterosklerotické léze předchází nejdříve poškození či změny endotelu. Mezi tyto změny patří zvýšení propustnosti pro lipoproteiny a ostatní plazmatické komponenty, aktivace leukocytárních a endotelových adhezních molekul, migrace leukocytů do cévní stěny a tvorba volných radikálů v důsledku oxidačních procesů.

2.2. Myší modely aterosklerózy

Existuje několik zvířecích druhů používaných ke studiu patogeneze a potenciální léčby v ateroskleróze. Nicméně nejvíce používaným modelem s řadou výhod je myší model, kde lze bezpečně sledovat vliv prostředí a složení potravy. Druhově je myš vysoce rezistentní k rozvoji aterosklerózy. Přesto bylo zjištěno, že nejvíce náchylný kmen k rozvoji alespoň minimální morfologicky detekovatelné aterosklerózy je kmen C57BL/6 (Jawien et al., 2004). U myší tvoří hlavní lipoproteinovou složku HDL. U kmene C57BL/6 byly popsány nižší hladiny HDL v porovnání s jinými kmeny (Paigen et al., 1987). Ovšem k navození aterosklerózy je nutné podávání diety bohaté na tuky a cholesterol. Nicméně tento model poskytuje vznik jen malých lézí v oblasti kořene aorty. A celkový rozvoj aterosklerózy není blízký lidskému (Jawien et al., 2004).

Díky genovému inženýrství bylo možné vyvinout takové myší modely, které mají sklon k rozvoji tohoto onemocnění. Myši, kterým chybí apolipoprotein E (ApoE^{-/-}), rozvíjejí léze podobné těm popsaným u lidí. Tento proces je ještě zesílen podáváním diety bohaté na cholesterol či tzv. „Western-type diet“. Reddick a kolektiv popisuje postupný rozvoj aterosklerotických lézí u tohoto modelu. Při podávání standardní diety dochází u ApoE^{-/-} myší ke vzniku pěnových buněk a později rozvinutých lézí v oblasti aortálního sinu. U zvířat starších 10 měsíců byly popsány rozsáhlé léze kryté fibrózní čepičkou také ve vzestupné části aorty, abdominální části aorty, karotických a iliakálních arteriích (Reddick et al., 1994). Celková hladina cholesterolu v plazmě je u tohoto modelu až pětikrát vyšší než u výchozího kmene C57BL/6 a neovlivňuje ji ani pohlaví zvířat ani jejich věk. Porovnání je demonstrováno na obrázku 2. ApoE^{-/-} zvířata vykazují posun v zastoupení lipoproteinů od HDL k VLDL a chylomikronům (Jawien et al., 2004). Po použití tzv. „Western-type diet“ (21 % tuku, 0,15 % cholesterolu, bez cholové kyseliny) u tohoto modelu byly již po pěti týdnech pozorovány pokročilejší a větší pláty než při podání nízko-tukové diety (Jawien et al., 2004).



Obrázek 2: Sérové koncentrace cholesterolu a reprezentativní obrázek aterosklerotické léze u myších modelů (Imaizumi, 2011)

V porovnání s kmenem C57BL/6 mají ApoE^{-/-} extrémně zvýšený cholesterol v plazmě a tvoří aterosklerotické léze podobné lidským plátům.

Dalším velice zajímavým modelem jsou myši, kterým chybí receptor pro LDL (LDLR^{-/-}), model familiární hypercholesterolemie. Při podávání standardní diety mají tyto myši nárůst plazmatických koncentrací v LDL a VLDL frakci, ale nerozvíjejí aterosklerózu. Rozvoj lézí je podmíněn podáváním cholesterolové diety, jako je tzv. „Paigen diet“ tvořená 15 % tuku, 1,25 % cholesterolu a 0,15 % kyseliny cholové, nebo méně toxické „Western-type diet“. U obou těchto diet vznikají u tohoto modelu rozsáhlé pláty (Ishibashi et al., 1994).

Ishibashi a jeho pracovní skupina vytvořili model s dvojitým deficitem ApoE^{-/-} a zároveň LDLR^{-/-} myš. Při podávání standardní diety nebyly pozorovány rozdíly v hladinách cholesterolu v porovnání s ApoE^{-/-}, i zastoupení lipoproteinů odpovídá původnímu modelu ApoE^{-/-} (Ishibashi et al., 1994). Nicméně model s dvojitým deficitem vykazuje vyšší progresi aterosklerózy už na standardní dietě než samotný ApoE^{-/-} model. Proto je tento myší model vhodný ke studiu anti-aterosklerotických účinků látek, bez nutnosti podávání cholesterolové diety (Witting et al., 1999). Navíc byl u tohoto modelu pozorován zajímavý jev, kdy podávání statinu nevedlo ke snížení cholesterolu, ale jeho hladiny byly dokonce zvýšeny (Vecerova et al., 2012). Stejný fenomén byl popsán i u ApoE^{-/-} myši (Nachtigal et al., 2006).

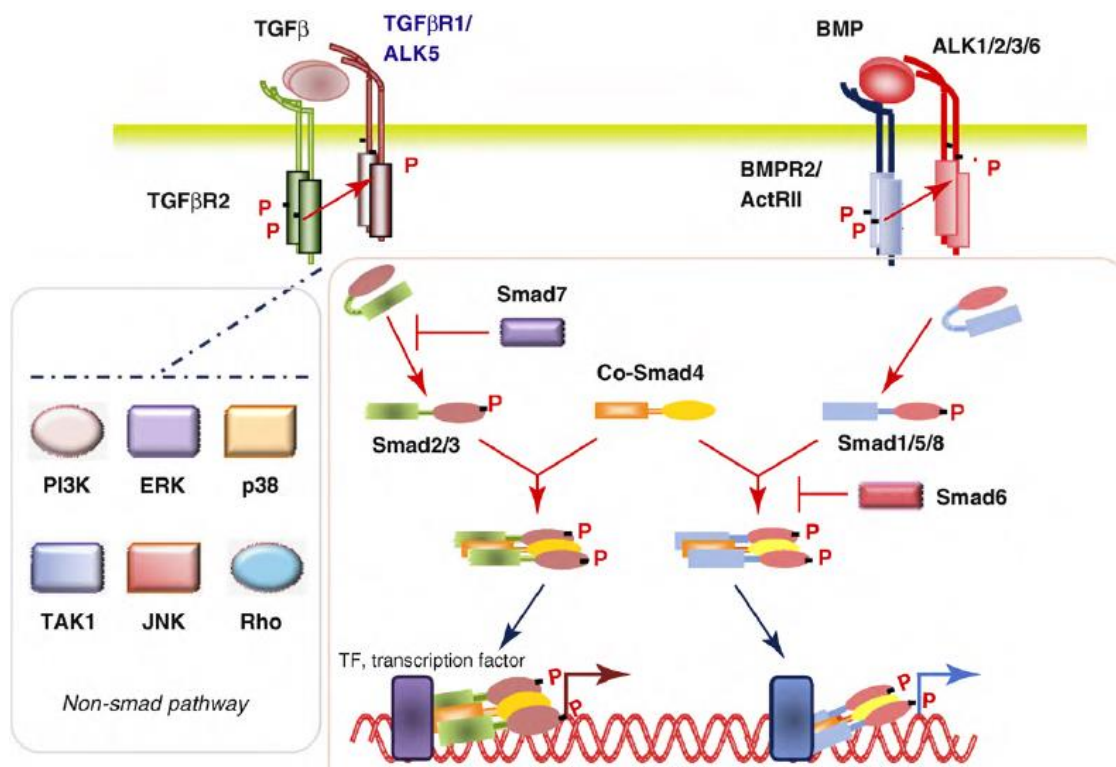
2.3. TGF- β signalizace

Členové rodiny transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) hrají stěžejní úlohu ve vývoji, fyziologických procesech a onemocněním cév. Tyto cytokiny vyvolávají v buňkách cévy specifické účinky prostřednictvím receptoru typu I a II, které mají

serin/treonin kinázovou aktivitu, a přes aktivaci Smad transkripčních faktorů regulují expresi řady genů (Pardali et al., 2010). Pozměněná TGF- β signalizace může vést k rozvoji řady cévních patologií, jako je hereditární hemoragická teleangiektázie či nádorová angiogeneze.

Mezi členy TGF- β rodiny patří nejen cytokiny TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, ale také aktiviny/inhibiny, BMP proteiny a růstové faktory pro diferenciaci (GDF). TGF- β cytokiny jsou vytvářeny jako neaktivní dimerní prekurzory, které musí být rozštěpeny proteázami, což umožní jejich přístup k receptorům. BMP proteiny jsou sekretovány v aktivní formě (Pardali et al., 2010).

Pro TGF- β /Smad signalizační kaskádu je nutná aktivace trans-membránového receptorového komplexu TGF- β RI a II (serin/treonin kinázy). U savců bylo popsáno pět typů receptoru II a sedm typů receptoru I, také nazývané aktivin receptor-like kinázy (ALK). Ve většině buněk jde TGF- β signalizace přes TGF- β RI (ALK5) a TGF- β RII, aktivin signalizace přes aktivin receptor typu IIA, IIB a ALK4, a BMP signalizace přes BMP receptor typu II, aktivin receptor typu II a ALK1, ALK2, ALK3 a ALK6. Také jsou popisovány dva pomocné receptory, endoglin a betaglykan (Pardali et al., 2010). Po navázání ligandu receptor typu II fosforyluje receptor typu I, který následně fosforyluje Smad proteiny. Smad proteiny jsou vnitrobuněčnými posly (transkripční faktory) pro rodinu TGF- β cytokinů a jsou rozděleny do tří skupin: R-Smad (regulující) – Smad1,5,8,2,3, Co-Smad (mediátorové) – Smad4 a I-Smad (inhibující) – Smad6,7. ALK4 a 5 způsobuje aktivaci Smad2 a Smad3, zatímco ALK1,2,3,6 vede k fosforylaci Smad1,5,8. Aktivované R-Smad vytváří komplex se Smad4 a dochází k přesunu do jádra buňky, kde za účasti dalších transkripčních faktorů mohou regulovat expresi cílových genů. Inhibující Smad6 a Smad7 soutěží s R-Smady o vazbu na receptor a podněcují jejich degradaci či defosforylaci (Massague et al., 2005). Existují i další signalizační cesty pro TGF- β a BMP, které nezahrnují Smad proteiny. Patří zde TGF- β aktivovaná kináza 1 (TAK-1), ERK, JNK, p38, Rho a PI3K-AKT signalizace (Pardali et al., 2010). Signalizaci přes Smad proteiny i cesty mimo Smad proteiny demonstruje obrázek 3.



Obrázek 3: TGF- β signalizace (Pardali et al., 2010).

ALK-aktivin receptor-like kináza, BMP-kostní morfogenetický protein, BMPR-BMP receptor, ERK-early response kináza, PI3K-fosfatidylinositol 3-kináza, TAK-TGF- β aktivovaná kináza, TGF- β -transformující růstový faktor β , TGF- β R-TGF- β receptor.

TGF- β signalizace hraje důležitou úlohu ve vaskulogenezi a angiogenezi. Delece TGF- β 1 byla letální u myších embryí v důsledku poškození tvorby cév, stejně jako delece TGF- β R1 a TGF- β R2. Významné efekty vykazuje TGF- β signalizace v ovlivnění endotelových buněk, kde jsou popisovány dvě různé signální kaskády. TGF- β po navázání na TGF- β R2 fosforyluje buď ALK5 nebo ALK1, přičemž ALK5 aktivace vede k fosforylaci Smad2/3, zatímco ALK1 k fosforylaci Smad1/5. Obě signalizace ALK1 i ALK5 mají opačný efekt na funkci endotelových buněk (Pardali et al., 2010). Bylo popsáno, že TGF- β /ALK1 signální kaskáda aktivuje a TGF- β /ALK5 inhibuje proliferaci a migraci endotelových buněk (Goumans et al., 2003; Goumans et al., 2002). Přestože TGF- β /ALK5/Smad2,3 signalizace působí opačně než TGF- β /ALK1/Smad1, přítomnost ALK5 je nezbytná pro aktivaci a zapojení ALK1 do receptorového komplexu (Goumans et al., 2003). Převaha jedné či druhé kaskády pak podmiňuje TGF- β pro- nebo anti-angiogenní účinky. Mezi další cévní buňky ovlivněné TGF- β signalizací patří buňky hladké svaloviny. TGF- β reguluje jejich proliferaci, maturaci a funkci prostřednictvím Smad2. Dalším efektem TGF- β u buněk hladké svaloviny je protizánětlivý účinek. TGF- β tlumí zánětlivé markery jako indukibilní NO syntázu (iNOS) a IL-6, prostřednictvím

Smad3 signalizace (Feinberg and Jain, 2005). Makrofágy a T-buňky mohou být také aktivovány či inhibovány TGF- β 1 (Bobik, 2006). Pro potlačení zánětlivé odpovědi u makrofágů je důležitý Smad3, prostřednictvím inhibice transkripce zánětlivých cytokinů, nebo kompeticí s transkripčním faktorem (NF- κ B) o koaktivátor p300/CBP (Feinberg and Jain, 2005). Významnou roli hraje TGF- β signalizace také v rozvoji nádorů a metastáz, kdy byla popsána souvislost mezi zvýšenou expresí TGF- β a zhoršenou prognózou (Pardali et al., 2010).

U pacientů s rozvinutou aterosklerózou byly pozorovány snížené hladiny TGF- β 1, naproti tomu bylo zjištěno, že tyto hladiny se zvyšují po fyzickém tréninku. Také bylo popsáno, že zvýšené hladiny adhezní molekuly VCAM-1 byly doprovázeny snížením TGF- β 1 v cirkulaci. U myších modelů bylo pozorováno formování aterosklerotických lézí po zablokování TGF- β signalizace pomocí protilátek. Souvislost mezi nedostatkem TGF- β 1 nebo poškozením TGF- β signalizace a rozvojem lézí vypovídá o potenciální TGF- β 1 protektivní roli v aterogenezi (Feinberg and Jain, 2005).

V procesu aterosklerózy bylo popsáno, že TGF- β může ovlivnit fenotyp léze regulací T-buněk a stimulací buněk hladké svaloviny k produkci kolagenu. U stabilních plátů byla pozorována vyšší exprese TGF- β v buňkách hladké svaloviny, než u plátů nestabilních. Buňky hladké svaloviny u fibrózního plátu exprimují Smad proteiny, které jsou nezbytné pro TGF- β vyvolanou zvýšenou expresi kolagenu. U tukových plátů bohatých na makrofágy neexprimují buňky hladké svaloviny Smad proteiny, tedy mají oslabenou schopnost produkovat kolagen při odpovědi na TGF- β (Kalinina et al., 2004). U T-buněk vede poškození TGF- β signalizace k zvětšení lézí a rozvoji nestabilního typu plátu (Robertson et al., 2003). TGF- β tedy podporuje rozvoj stabilního typu plátu inhibicí T-buněk prostřednictvím CD4+CD25+ regulačních T-buněk (Veillard et al., 2004). Také hypercholesterolemie může oslabit normální signalizaci TGF- β , kdy TGF- β odpověď může být ovlivněna změnou exprese TGF- β RI a TGF- β RII v plazmatické membráně (Chen et al., 2008). Výše uvedené informace poukazují na jistou složitost při hodnocení účinků TGF- β v různých typech buněk a v různých fázích aterogeneze.

2.4. Endoglin

Endoglin (CD105, TGF- β receptor III, ENG), je trans-membránový glykoprotein s molekulovou hmotností dimeru 180 kDa, hrající významnou roli v TGF- β signalizaci. Jeho exprese je popisována především na cévním endotelu, v buňkách hladké svaloviny

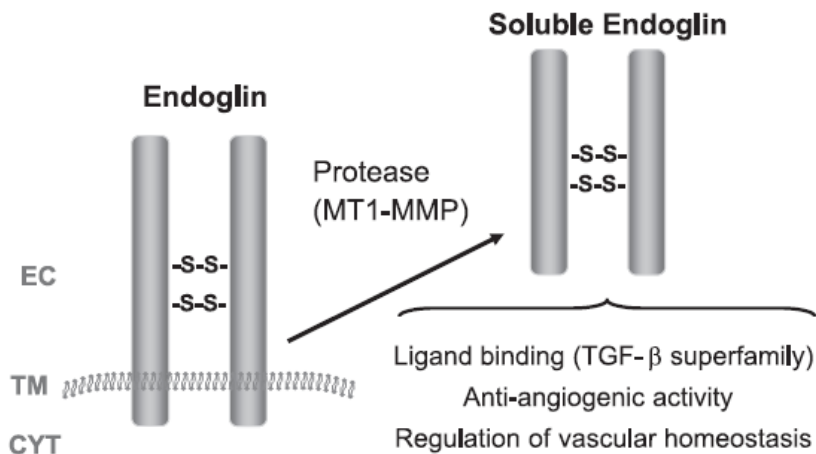
cév, srdečních fibroblastech, monocytech a makrofázích (Ma et al., 2000; Piao and Tokunaga, 2006; Pospisilova et al., 2006). Doposud byly popsány tři jeho formy, které mají různé efekty při ovlivnění cévní homeostázy. „Long“ a „short“ izoformy endoglinu, které vznikly různou variantou sestřihu, a solubilní forma endoglinu, která může vzniknout uvolněním endoglinu z buněčné membrány do cirkulace (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Bylo popsáno, že endoglin jako TGF- β receptor typu III je velmi důležitý pro TGF- β signalizaci v endotelových buňkách. Endoglin je součástí TGF- β receptorového komplexu a spolupracuje s TGF- β receptorem I a II, které mají serin/treonin kinázovou aktivitu (Cheifetz et al., 1992), také může regulovat TGF- β signalizaci (Lastres et al., 1996). Endoglin není schopný samostatně vázat ligand, ale může prostřednictvím jak extracelulární tak cytoplazmatické části regulovat fosforylaci TGF- β RII a TGF- β RI (ALK1 a ALK5) a tím signalizaci TGF- β (Guerrero-Esteo et al., 2002). V řadě *in vitro* studií bylo popsáno, že endoglin ovlivňuje TGF- β signalizaci regulací aktivity ALK a Smad proteinů (Santibanez et al., 2007; Tian et al., 2010). Nejčastěji jsou sledovány dvě signalizační kaskády a jejich propojení. Endoglin/ALK1/Smad1/5 signalizace vede k aktivaci endotelových buněk, jejich migraci, proliferaci a angiogenezi, naproti tomu druhá kaskáda endoglin/ALK5/Smad2 inhibuje aktivitu endotelových buněk a vede ke stabilizaci endotelu. Také byl popsán inhibiční efekt endoglinu na signalizaci TGF- β /ALK5/Smad3 a opačně zvýšení ALK5/Smad2 signalizace (Bernabeu et al., 2007). Nicméně tyto regulační účinky endoglinu jsou specifické pro určitý typ buněk a jsou závislé na typu přítomných TGF- β receptorů v dané tkáni.

Endoglin je zapojen do procesu angiogeneze a je nezbytný pro vývoj kardiovaskulárního systému. Zároveň je studován v souvislosti s řadou patologických stavů, jako je preeklampsie, hereditární hemoragická teleangiektázie či nádorová onemocnění (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; ten Dijke et al., 2008). Hereditární hemoragická teleangiektázie je genetické cévní onemocnění charakteristické výskytem krvácení z nosu a gastrointestinálního traktu a vznikem arteriovenózních malformací v plicích, mozku a játrech. Jde o mutaci endoglinu (HHT1) a mutaci ALK1 (HHT2). Cílené vypnutí endoglinu způsobilo cévní a kardiovaskulární poruchy u myších embryí. Funkční endoglin je tedy nezbytný pro správný vývoj kardiovaskulárního systému (Bourdeau et al., 2000). Zvýšená exprese endoglinu je používána jako marker nádorové

angiogeneze a endoglin značené protilátky zaměřené na endotelové buňky jsou součástí anti-angiogenní terapie nádorů (ten Dijke et al., 2008).

V klinické praxi byla pozorována souvislost mezi hladinami sérového endoglinu a hladinami cholesterolu v krvi u pacientů s hypercholesterolémií (Blaha et al., 2008), dále bylo zvýšení solubilního endoglinu zjištěno u pacientů s diabetem mellitus či hypertenzí (Blazquez-Medela et al., 2010). U preklamsie zvýšené hladiny solubilního endoglinu pocházejí z proteolytického štěpení endoglinu v membráně trofoblastu, navíc solubilní forma endoglinu soutěží s TGF- β o navázání na jeho receptory a tím blokuje TGF- β signalizaci v buňkách endotelu (Venkatesha et al., 2006). Ve studii na nádorové tkáni bylo popsáno, že solubilní forma endoglinu vzniká odštěpením jeho extracelulární části z membrány endotelových buněk pomocí matrix metaloproteázy (MMP-14) (Hawinkels et al., 2010). Navíc byl solubilní endoglin detekován v průběhu aterogeneze a byla popsána jeho spojitost s dysfunkcí endotelu (Blazquez-Medela et al., 2010; Rathouska et al., 2011). Vznik solubilního endoglinu a jeho účinky popisuje obrázek 4. Původ solubilního endoglinu v ateroskleróze je zatím neznámý a nejsou ani informace o roli MMP-14 proteázy jako enzymu štěpícího endoglin v aterosklerotických cévách.



Obrázek 4: Vznik solubilního endoglinu proteolytickým štěpením membránově vázané formy endoglinu (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Bylo zjištěno, že zásadní roli v odštěpení extracelulární části endoglinu hraje proteáza MMP-14. Solubilní endoglin pak má řadu funkcí, jako například kompetice s TGF- β o vazbu na receptory, zhoršuje angiogenezi a vasodilataci u endotelových buněk a přispívá k dysfunkci endotelu.

Jak bylo již zmíněno výše, exprese endoglinu bývá pozorována zejména v buňkách cévní stěny a je ovlivněna v důsledku různých patologických dějů. TGF- β stimuluje expresi endoglinu (Lastres et al., 1996), naproti tomu TNF α snižuje expresi

endoglinu u endotelových buněk (Li et al., 2003). Buňky endotelu hrají významnou roli v patogenezi aterosklerózy, zejména v rozvoji endotelové dysfunkce. U myších modelů byla popsána exprese endoglinu na endotelu aorty a v kapilárách myokardu u normocholesterolemických a hypercholesterolemických myší (Nachtigal et al., 2009b). Buňky hladké svaloviny jsou zapojené do zvětšování lézí v důsledku produkce extracelulární matrix, nicméně také jsou důležité pro stabilizaci rozvinutých plátů zvýšenou produkcí kolagenu a utvářením fibrózní čepičky. Endoglin hraje důležitou roli ve zrání buněk hladké svaloviny v cévách. Což potvrzují studie na myších s defektem endoglinu, u kterých byla pozorována embryonální letalita v důsledku abnormálního vývoje buněk hladké svaloviny v cévách (Bourdeau et al., 2000). Expresi endoglinu v lidských aterosklerotických cévách byla pozorována zejména v buňkách hladké svaloviny rozvinutých lézí (Conley et al., 2000), dále v makrofázích, v endotelových buňkách a buňkách hladké svaloviny v časných stádiích aterosklerotických lézí v lidské aortě (Piao and Tokunaga, 2006). Studie na lidských karotidách z endarterektomií ukázala opět expresi endoglinu v endotelových buňkách, makrofázích a buňkách hladké svaloviny a jeho exprese byla zvýšena u plátů s vyšším obsahem kolagenu a menším výskytem trombů. Tyto výsledky ukazují na možné spojení mezi expresí endoglinu a stabilním fenotypem plátu (Bot et al., 2009).

Na základě dostupných informací lze shrnout funkci endoglinu v ateroskleróze. Endoglin/TGF- β receptorový komplex může aktivovat buď ALK1/Smad1/5 nebo ALK5/Smad2/3 signalizaci. Aktivace ALK1/Smad1/5 signalizace může vést k neovaskularizaci plátů anebo protekci endotelu v důsledku zvýšení eNOS exprese prostřednictvím cévního endotelového růstového faktoru (VEGF) (Walshe et al., 2009). Nicméně role této signalizace vzhledem k ateroskleróze je nejasná. Aktivace ALK5/Smad2/3 signalizace může vést ke zvýšení eNOS, k protizánětlivým účinkům inhibicí NF- κ B, k aktivaci transkripčního faktoru EGR-1, k produkci kolagenu a stabilizaci plátu (Bot et al., 2009; DiChiara et al., 2000; Toporsian et al., 2005). Endoglin a jeho signalizace, zejména přes ALK5/Smad2/3, může tedy hrát ochrannou úlohu v ateroskleróze.

2.5. Endotelová NO syntáza

Oxid dusnatý je uvolňován endotelem cév po stimulaci endotelové NO syntázy. Nejvýznamnějším fyziologickým faktorem, který aktivuje jeho syntézu, je tzv. „shear

stress“ (odporová síla proudící krve na povrch endotelu). Trvalé uvolňování NO je nezbytné pro normální funkci endotelu a vede k vasodilataci a inhibici shlukování destiček. Navíc NO brání adhezi leukocytů a expresi chemotaktických proteinů, čímž snižuje zánětlivou reakci (Dimmeler and Zeiher, 1999).

Byly popsány tři typy syntázy NO – neuronální (nNOS), inducibilní (iNOS) a endotelová (eNOS, NOS3). NO produkovaný enzymem nNOS je považován za protektivní v ateroskleróze, naopak iNOS spíše podporuje rozvoj aterosklerózy. iNOS produkuje NO, který souvisí s produkcí peroxynitritu. NO syntetizovaný prostřednictvím eNOS je anti-aterogenní (Li and Forstermann, 2009).

Endotelová NO syntáza produkuje oxid dusnatý s vasodilatačními účinky, který nepřetržitě reguluje průměr krevních cév a udržuje anti-proliferativní a anti-apoptické prostředí v cévní stěně. eNOS je regulován řadou ko- a post-translačních modifikací, fosforylací a protein-protein interakcí. Uvolnění NO z endotelových buněk je ovlivněno různými extracelulárními signály, jako je proudění krve (shear stress), VEGF, estrogen a bradykinin. eNOS využívá molekulární kyslík a elektrony z NADPH k oxidaci substrátu L-argininu za vzniku NO a L-citrulinu. Byla popsána spolupráce membránově vázaného eNOS s proteinem caveolin-1 (Cav-1) a heat shock proteinem 90 (Hsp90) (Sessa, 2004).

Exprese eNOS je také regulována na transkripční úrovni. Smad2 transkripční faktor, vazbou na eNOS promoter, aktivuje TGF- β indukci eNOS v endotelových buňkách (Saura et al., 2002). Toto může být jeden z mechanismů jak TGF- β inhibuje rozvoj aterosklerózy. Navíc bylo popsáno, že zvýšení exprese eNOS prostřednictvím Smad2 je regulováno endoglinem. Zvýšená exprese endoglinu u endotelových buněk vede ke zvýšení Smad2 proteinu v důsledku zvýšení stability Smad2, zvýšení aktivity tedy Smad2 interakce s receptorovým komplexem a fosforylace Smad2, a poté ke zvýšení exprese eNOS (Santibanez et al., 2007).

Spojitosť mezi expresí endoglinu a eNOS byla zjištěna u myšího modelu ENG+/-, kde byla pozorována snížená exprese eNOS a následně zhoršená vasodilatace. Také u buněk po transfekci lidského endoglinu bylo pozorováno významné zvýšení exprese eNOS v porovnání s buňkami bez endoglinu. Bylo prokázáno, že vztah mezi endoglinem a NO zprostředkovanou vasodilatací souvisí s regulací exprese eNOS *in vitro* i *in vivo* (Jerkic et al., 2004). Přestože tyto pozorování byly prováděny ve vztahu k HHT,

domníváme se, že podobná souvislost mezi endoglinem a eNOS by mohla existovat i v procesu aterogeneze.

Řada cévních onemocnění souvisí s oxidačním stresem, kde je hlavním zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS), které inaktivují NO, právě NADPH oxidáza. Oxidační stres je také hlavní příčinou oxidace základního kofaktoru pro NOS – tetrahydrobiopterinu (BH₄), jehož nedostatek vede k nesprávné funkci eNOS (Li and Forstermann, 2009). Exprese eNOS a dostupnost NO v cévě je klíčová pro funkci endotelu. Snížení eNOS nebo změna jeho funkce může vést k rozvoji dysfunkce endotelu a následně procesu aterosklerózy. Touto změnou může být neschopnost eNOS k vazbě kyslíku na L-arginin vedoucí ke vzniku kyslíkových radikálů, tento proces se nazývá „uncoupling“. eNOS produkující superoxid je následně pro-aterogenní. Následkem je snížení dostupnosti NO a rozvoj aterogeneze (Forstermann and Sessa, 2012). Nedostatek BH₄ je primární příčinou dysfunkce eNOS v ateroskleróze. Některé informace uvádějí, že se eNOS nachází zároveň v obou formách, jako „coupled“ enzym je součástí membrány připraven na aktivaci a produkci NO, jako „uncoupled“ enzym zůstává v cytosolu a produkuje ROS (Li and Forstermann, 2009). Rovněž bylo popsáno, že endoglin je schopen regulovat eNOS „uncoupling“ prostřednictvím interakce eNOS a Hsp90 (Toporsian et al., 2005).

2.6. Statiny

Inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy – statiny jsou široce používanými léčivy v terapii hypercholesterolémie. Snižují hladiny LDL cholesterolu výrazněji než ostatní hypolipidemika a také snižují triglyceridy u pacientů s hypertriglyceridemií. Obecně jde o látky bezpečné a velice dobře tolerované. V klinických studiích bylo prokázáno, že statiny snižují relativní riziko koronární příhody a přináší tak významný prospěch pro pacienty s vysokým rizikem komplikací při ischemické chorobě srdce. Kromě účinků na plazmatické lipoproteiny, byly u těchto léčiv pozorovány i účinky nezávislé na hladinách cholesterolu tzv. „pleiotropní účinky“, které rozšiřují jejich použití nejen jako hypolipidemika, ale i jako látky pro léčbu aterosklerózy (Maron et al., 2000).

Statiny kompetitivně inhibují HMG-CoA reduktázu, klíčový enzym v syntéze cholesterolu. Výsledné snížení cholesterolu v jaterních buňkách vede ke zvýšení exprese LDL receptorů, které dále vedou ke snížení koncentrace LDL a jeho prekurzorů

z cirkulace. Statiny také inhibují syntézu apolipoproteinů B-100 v hepatocytech a snižují produkci a sekreci lipoproteinů bohatých na triglyceridy (Maron et al., 2000).

V klinických studiích bylo pozorováno, že statiny jsou vysoce účinné při snižování LDL cholesterolu a také mírně zvyšují HDL cholesterol. Hlavním nežádoucím účinkem je toxické působení na játra a svaly. Ovšem tento výskyt je vzácný a souvisí s dávkou a přítomností lékových interakcí. V klinické praxi je někdy nutné pro dosažení cílových hladin lipoproteinů kombinovat statiny s dalšími druhy hypolipidemických léčiv. Nicméně u statinů bylo prokázáno významné snížení kardiovaskulární morbidity a mortality v primární i sekundární prevenci (Maron et al., 2000). Tyto efekty ovšem souvisí s inhibicí jaterní HMG-CoA reductázy a následným snížením hladin cholesterolu v cirkulaci, ale inhibice endotelové HMG-CoA reductázy může být dalším pozitivním účinkem statinů v ateroskleróze (Laufs et al., 1998).

Mezi další pozorované efekty statinů, které mají klinický přínos, patří přímé ovlivnění funkce endotelu, struktury a stability plátu, trombózy a zánětu (Maron et al., 2000).

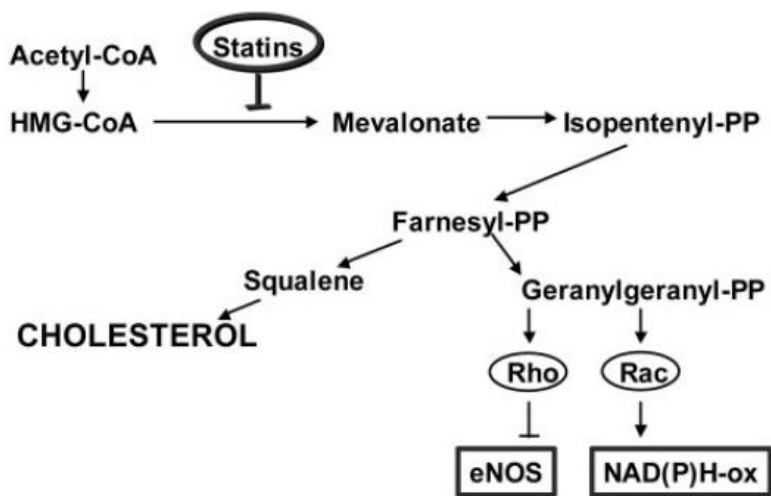
2.6.1. Účinky statinů na cévní endotel

Nejvýznamnějším produktem endotelu je oxid dusnatý a jeho poškozená syntéza a uvolňování je hlavní příčinou dysfunkce endotelu. Právě zlepšení dysfunkce endotelu a uvolňování NO představuje nový terapeutický přístup v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Řada studií ukázala, že zvýšení produkce NO statiny souvisí s dávkově závislým nárůstem exprese eNOS jak v lidských endotelových buňkách *in vitro*, tak u zvířecích modelů. Bylo popsáno několik mechanismů, kterými statiny ovlivňují uvolňování NO, jako je zabránění tvorby mevalonátu a prekursorů isoprenoidů a tím ovlivnění exprese eNOS. Dále statiny zvyšují aktivitu eNOS přes PI3-kinázu a Akt signalizaci nebo ve spolupráci s Hsp90 proteinem (Laufs, 2003).

Mechanismy účinků statinů vedoucí ke zvýšení produkce NO závislé na cholesterolu: Zvýšený cholesterol, respektive LDL a jeho modifikace (oxLDL) souvisí se sníženou produkcí a nadměrnou degradací NO endotelem, v důsledku snížení exprese eNOS (Hernandez-Perera et al., 1998). Zvýšený LDL cholesterol vede ke zvýšení proteinu Cav-1, který tvoří komplex s eNOS a tím inhibuje uvolňování NO (Feron et al., 2001). Proto snížení cholesterolu statiny přispívá ke zlepšení funkce endotelu. Později bylo popsáno, že statiny ovlivňují formování tzv. mikrodomén v membráně endotelových

buněk, snižují koncentraci cholesterolu v membráně a také expresi proteinů inhibujících eNOS, tím zvyšují normální produkci NO endotelem (Mason et al., 2004).

Mechanismy účinků statinů vedoucí ke zvýšení produkce NO nezávislé na cholesterolu: Mechanismus, kterým statiny zlepšují funkci endotelu nezávisle na snížení cholesterolu, spočívá ve schopnosti zvyšovat expresi a aktivitu eNOS, prostřednictvím zvýšení stability eNOS mRNA (Laufs et al., 1998). Dalším mechanismem je snížení hladin endotelinu-1 (ET-1) a jeho silných vasokonstričních účinků (Hernandez-Perera et al., 1998). Statiny snižují expresi Cav-1 v endotelových buňkách nezávisle na hladinách cholesterolu (Feron et al., 2001). Jedním z popsaných mechanismů účinku statinů na endotel je inhibice Rho a Rac G-proteinů, což popisuje obrázek 5. Rho vede k negativní regulaci eNOS a Rac aktivuje NADPH oxidázu a produkci superoxidu. Statiny inhibují jak Rho, tak Rac aktivitu prostřednictvím zablokování geranylgeranylace, což vede ke zvýšené aktivaci eNOS a poklesu produkce superoxidových radikálů (Endres and Laufs, 2004).



Obrázek 5: Schéma zobrazující úlohu statinů v syntéze isoprenoidů a cholesterolu (Endres and Laufs, 2004).

Statiny deaktivují Rho a Rac G-proteiny inhibicí geranylgeranylace. Což vede ke zvýšení eNOS a tím produkce NO, poté také k poklesu ROS díky poklesu aktivity NADPH oxidázy.

Mezi zdroje superoxidových radikálů v buňce patří nejen NADPH oxidáza, ale i eNOS, který produkuje ROS při nedostatku kofaktoru BH4. Statiny patří mezi terapeutika, která jsou schopná působit proti eNOS „uncoupling“ a zvyšovat expresi a aktivitu eNOS. Statiny zvyšují dostupnost zásadního kofaktoru pro eNOS tetrahydrobiopterinu, což vede k posunu eNOS produkující ROS k eNOS tvořícímu NO

(Forstermann and Sessa, 2012). Superoxidové radikály reagují s NO za tvorby peroxynitritu (ONOO^{2-}), který je velmi cytotoxický. Statiny snižují hladiny ONOO^{2-} a posunují tak rovnováhu mezi tvorbou NO/ ONOO^{2-} směrem k NO a ke zlepšení funkce endotelu (Heeba et al., 2007).

Další mechanismy účinků statinů vedoucí ke zvýšení produkce NO a zlepšení funkce endotelu: Statiny mohou zvýšit aktivitu eNOS prostřednictvím aktivace PI3-kinázy a Akt signalizace, interakcí s Hsp90 proteinem. Dochází k fosforylaci eNOS na serinu Ser1177 (Brouet et al., 2001; Wolfrum et al., 2003). Tyto účinky byly studovány i v souvislosti s dalšími léčivy, například kombinace simvastatinu a nifedipinu vedla ke zvýšení fosforylace Akt a tedy zvýšení fosforylace eNOS u endotelových buněk a zároveň ke snížení ROS (Chen et al., 2010). Statiny také snižují expresi adhezních molekul a tím adhezi leukocytů k endotelu (Zapolska-Downar et al., 2004).

2.6.2. Účinky statinů na složení aterosklerotického plátu

Statiny zpomalují růst buněk hladké svaloviny, snižují proliferaci makrofágů aktivovaných oxLDL a snižují nahromadění esterů cholesterolu v makrofázích (Maron et al., 2000). Snížení hladin cholesterolu vede k redukcí velikosti lézí, ke snížení mimobuněčného ukládání tuků a kumulaci makrofágů. Dalším efektem je snížení hladin inhibitoru plazminogenového aktivátoru (PAI-1) a produkce a kumulace kolagenu. Tyto účinky statinové terapie přispívají ke stabilizaci plátu (Libby and Aikawa, 2001).

2.6.3. Účinky statinů na trombózu a zánět

Statiny ovlivňují tvorbu trombu, deformabilitu erytrocytů a hladiny PAI-1 a fibrinogenu. Také bylo zjištěno, že snižují C-reaktivní protein a eliminují tak riziko kardiovaskulární příhody související s tímto markerem zánětu (Maron et al., 2000).

2.6.4. Vliv statinů na členy TGF- β signalizace

Vzhledem k významné roli TGF- β signalizace v procesu aterosklerózy, byly provedeny také studie zaměřené na vliv statinů na samotné členy TGF- β signalizace v různých typech buněk a v různých fázích aterogeneze. *In vitro* u buněk hladké svaloviny bylo zjištěno, že statiny zvyšují expresi TGF- β RII a následně signalizaci přes Smad2/3 proteiny. Což bylo potvrzeno *in vivo* u myšího modelu, kde podávání atorvastatinu vedlo ke zvýšení fosforylace Smad3 a exprese TGF- β RII, což vedlo ke zvýšení produkce

kolagenu (Rodriguez-Vita et al., 2008). Tyto výsledky vypovídají o účinku statinů na stabilizaci plátu díky zvýšení TGF- β /Smad signalizace a tím produkce kolagenu. Experimentální studie autora Chen CL. a kolektivu prokázaly, že statiny zvyšují TGF- β /Smad signalizaci i u endotelových buněk. Cholesterol zvyšuje nahromadění a různé zastoupení TGF- β RI a TGF- β RII v komplexech v plazmatické membráně a oslabuje tak TGF- β odpověď. Odstranění cholesterolu z plazmatické membrány pomocí statinů vede ke zvýšení exprese TGF- β receptorů v nelipidových mikrodoménech a podpoře TGF- β signalizace *in vitro* u endotelových buněk i *in vivo* u ApoE^{-/-} myši (Chen et al., 2008). Ovlivnění endoglinu a jeho signalizace může být také zajímavým dějem v terapii statiny v ateroskleróze. V experimentech na myších normocholesterolemických a hypercholesterolemických modelech byl popsán účinek atorvastatinu na snížení exprese endoglinu na intaktním endotelu aorty (Nachtigal et al., 2007; Pospisilova et al., 2006). Naproti tomu bylo pozorováno jeho zvýšení po podávání statinu, zejména na povrchu plátů v aterosklerotické aortě myšního modelu (Nachtigal et al., 2009a). Z těchto výsledků vyplývá, že účinky statinů na expresi endoglinu a jeho signalizaci souvisí se stádiem aterogeneze a designem *in vivo* experimentu. *In vitro* u endotelových buněk byl pozorován nárůst exprese endoglinu po podávání atorvastatinu (Giordano et al., 2012).

TGF- β signalizace a její ovlivnění statiny byla studována i v jiných patologických procesech a typech buněk. Přestože pozorované efekty jsou odlišné od účinků v buňkách cévní stěny, vykazují statiny pozitivní efekt, zejména při zmírnění hypertrofie srdce či redukci renální fibrózy. Statiny vedly ke zvýšení TGF- β RII u kardiomyocytů (Park and Galper, 1999). U hypertenzních potkanů bylo popsáno snížení srdeční hypertrofie a fibrózy po podávání fluvastatinu, díky zvýšení exprese Smad7 a snížení TGF- β 1 (Zhai et al., 2008). Také exprese endoglinu může být statiny jinak regulována v buňkách cévní stěny v aterogenezi a jinak například u srdečních fibroblastů. *In vitro* na srdečních fibroblastech bylo zjištěno, že atorvastatin snižuje expresi endoglinu, který je zodpovědný za TGF- β pro-fibrotický účinek u těchto buněk (Shyu et al., 2010).

V našich *in vivo* studiích na myších modelech, byl podáván druhý nejúčinnější statin – atorvastatin, v dávkách od 10 mg/kg za den až 100 mg/kg za den (Nachtigal et al., 2006; Nachtigal et al., 2009a; Vecerova et al., 2012). V klinické praxi se používají jednodenní p.o. dávky od 10 mg a maximální dávka je 80 mg. Intenzivní hypolipidemická terapie, podávání 80 mg atorvastatinu za den, u pacientů se stabilním koronárním

onemocněním přinesla v klinických studiích významný benefit v zabránění objevení se kardiovaskulární příhody, v porovnání s běžně užívanou dávkou 10 mg za den (LaRosa et al., 2005). V našich *in vitro* studiích jsme zvolili koncentrační rozmezí atorvastatinu od 1 μ M do 5 μ M dle předchozích experimentů (Heeba et al., 2007; Hernandez-Perera et al., 1998; Zapolska-Downar et al., 2004), jde o modelové koncentrace, které asi 40x překračují plazmatické koncentrace používané v klinické praxi.

3. Cíle práce

Analýza současné odborné literatury zabývající se úlohou endoglinu v lidské a experimentální ateroskleróze.

Analýza odborné literatury zkoumající solubilní formu endoglinu a jeho úlohu v ateroskleróze.

Studium lokalizace endoglinu společně se členy TGF- β signální kaskády a společně s eNOS *in vivo* v aortě myšího modelu, a sledování zda je tato exprese ovlivněna podáváním atorvastatinu.

Studium exprese endoglinu, jednotlivých receptorů TGF- β , Smad proteinů a markerů endotelové dysfunkce při různém typu diety *in vivo* u ApoE/LDLR deficientního myšího modelu.

Studium exprese endoglinu *in vitro* u endotelových buněk a jeho zapojení do účinku atorvastatinu vedoucímu ke zvýšení eNOS.

4. Komentáře k publikovaným pracím

Tato disertační práce je předkládána jako soubor publikovaných prací, ze kterých šest je otištěno v odborném časopise s impaktním faktorem a jedna je t.č. rukopisem v recenzním řízení. Pět z těchto publikací je původními experimentálními pracemi *in vivo*, zabývajícími se expresí TGF- β receptorů u myších modelů a ovlivněním této exprese typem diety či podáním atorvastatinu. Jedna z těchto prací je věnována shrnutí současných poznatků o roli endoglinu a jeho expresi v procesu aterosklerózy. Poslední předkládaná publikace je věnována roli endoglinu v mechanismu zvýšení exprese eNOS po podání atorvastatinu *in vitro*. V některých publikacích je autorka uvedena pod rodným příjmením Večeřová.

4.1. Atorvastatin zvyšuje ENG, SMAD2, pSMAD2/3 a eNOS expresi u ApoE/LDLR def. myšního modelu

Atorvastatin increases endoglin, SMAD2, phosphorylated SMAD2/3 and eNOS expression in ApoE/LDLR double knockout mice

P. Nachtigal, N. Pospisilova, L. Vecerova, S. Micuda, E. Brcakova, K. Pospeschova and V. Semecky, *J Atheroscler Thromb*, 16 (2009), pp. 265-74. (IF: 2.933)

Na základě poznatků, že endoglin je exprimován buňkami v lidských aterosklerotických plátech (Piao and Tokunaga, 2006), a že jeho exprese ovlivňuje TGF- β signalizaci (Lastres et al., 1996) a expresi eNOS (Santibanez et al., 2007), byla pro tuto studii stanovena hypotéza, zda je endoglin lokalizován společně se členy TGF- β signalizační kaskády a společně s eNOS *in vivo* v aortě u ApoE/LDLR deficientního myšního modelu, a zda je tato exprese ovlivněna podáváním atorvastatinu.

Ve studii byl použit model myši s kombinovaným defektem apoE lipoproteinu a LDL receptoru. Pro tento model je charakteristický snadný rozvoj aterosklerotických lézí a hypercholesterolemie. Kontrolní skupina byla krmena „Western type“ dietou, u skupiny se statinem byl do diety přidáván atorvastatin v dávce 100 mg/kg za den. Byla provedena imunohistochemická analýza a Western blot analýza exprese sledovaných proteinů v aortě.

Výsledky biochemické analýzy ukázaly, že podávání atorvastatinu vedlo k významnému poklesu hladin celkového cholesterolu, VLDL, LDL cholesterolu

a triglyceridů, také došlo k významnému nárůstu u HDL lipoproteinové frakce. Expres endoglinu byla lokalizovaná zejména na cévním endotelu aterosklerotických plátů i intaktní cévy v oblasti kořene aorty, také na endotelu srdečních chlopní a v kapilárách okolního myokardu. Lokalizace endoglinu byla podobná u obou experimentálních skupin, nicméně po podávání atorvastatinu byla pozorována vyšší intenzita barvení, tedy vyšší exprese endoglinu. Imunofluorescenční imunohistochemické barvení ukázalo, že exprese endoglinu je lokalizovaná ve stejných místech jako exprese Smad2, pSmad2/3 a eNOS a to pouze na cévním endotelu aterosklerotických plátů u obou skupin zvířat. Pomocí Western blot analýzy bylo prokázáno, že podávání atorvastatinu vedlo ke zvýšení všech těchto proteinů v porovnání s kontrolní skupinou.

Společná kolokalizace endoglinu a eNOS jen u endotelu na povrchu plátů naznačuje možný protektivní účinek endoglinu na cévní endotel díky ovlivnění exprese eNOS, tedy jeho možnou roli v rozvoji endotelové dysfunkce a procesu aterosklerózy.

4.2. Imunohistochemická studie kolokalizace ENG s eNOS, SMAD2, pSMAD2/3 u myších modelů

Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study

P. Nachtigal, L. Vecerova, N. Pospisilova, S. Micuda, E. Brcakova, E. Navarro Hernandez, K. Pospechova and V. Semecky, *Histol Histopathol*, 24 (2009), pp. 1499-506. (IF: 2.281)

Tato experimentální studie vychází z předchozích *in vitro* poznatků, že exprese endoglinu ovlivňuje TGF- β signalizaci a expresi eNOS prostřednictvím Smad proteinů (Santibanez et al., 2007), a že změny exprese endoglinu odpovídají změnám v expresi eNOS (Jerkic et al., 2004). Cílem studie tedy bylo detekovat expresi endoglinu v aortě u normocholesterolemických a hypercholesterolemických myší pomocí imunohistochemické analýzy. A zjistit zda je kolokalizován s ostatními sledovanými proteiny na cévním endotelu u obou modelů.

Ve studii byly použity dva modely myší. Myš kmene C57BL/6J krmena standardní dietou a myš s kombinovaným defektem apoE lipoproteinu a LDL receptoru,

krmena „Western type“ dietou. Byla provedena imunohistochemická analýza v oblasti aortálního kořene, který je považován za referenční místo pro studium myší aterogeneze.

Expres endoglinu byla pozorována na cévním endotelu bez aterosklerotických lézí u obou skupin zvířat, dále na endotelu pokrývajícím aterosklerotické pláty u ApoE/LDLR deficientního modelu. Také byla detekována jeho exprese v kapilárách okolního myokardu a na povrchu chlopní. Dvojitě fluorescenční barvení prokázalo kolokalizaci endoglinu se Smad2 a pSmad2/3 na intaktním endotelu u C57BL/6J myší a na endotelu na povrchu rozvinutých plátů u ApoE/LDLR deficientních myší. U obou skupin byla také pozorována společná lokalizace endoglinu a eNOS jen na endotelu aorty a jinde nebyla nalezena.

V době vzniku této studie nebyly dostupné žádné *in vitro* data, studující mechanismus zapojení endoglinu, Smad proteinů a eNOS za různých podmínek modelujících proces aterogeneze, například v přítomnosti cholesterolu. Proto byl na podkladě dosažených výsledků formulován závěr, že exprese endoglinu v cévách, respektive na endotelu, může být prospěšná díky možnosti ovlivnění exprese eNOS prostřednictvím Smad2 signalizace.

4.3. Vliv cholesterolu na ENG a jeho signalizaci u ApoE/LDLR def. myší

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

Z. Strasky, L. Vecerova, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Brcakova, Z. Kudlackova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal, *Circ J*, 75 (2011), pp. 1747-55. (IF: 3.578)

Funkce endoglinu je úzce spojována s TGF- β signalizační kaskádou. Byla zaznamenána řada studií, které popisují dvě komplikované signalizační dráhy – endoglin/ALK1/Smad1/5, která vede k proliferaci a migraci endotelových buněk, a endoglin/ALK5/Smad2/3, která vede ke snížení aktivity endotelu (Goumans et al., 2003; Goumans et al., 2002). Jednou z forem endoglinu je solubilní endoglin, který může být uvolňován z buněčné membrány do cirkulace a jeho zvýšení bylo pozorováno například u pacientů s hypertenzí či diabetem mellitus (Blazquez-Medela et al., 2010). Cílem této experimentální studie bylo popsat vliv cholesterolové diety na hladiny solubilního endoglinu, velikost aterosklerotických plátů a expresi endoglinu ve tkáni

u ApoE/LDLR deficientního myšího modelu. Dále byly studovány exprese dalších proteinů zapojených do endoglin-signalizační kaskády.

V experimentu byl použit model myši se spontánní hypercholesterolémií, kdy aterosklerotické léze lze pozorovat už po několika týdnech na standardní dietě. Kontrolní skupině byla podávána standardní dieta. Sledované skupině byla podávána 1% cholesterolová dieta po dobu 8 týdnů. Byla provedena biochemická analýza hladin cholesterolu v séru, Western blot analýza v homogenátu aorty, stanovení solubilního endoglinu pomocí metodiky ELISA, imunohistochemické a histologické barvení odebrané tkáně aorty, a následné stereologické hodnocení velikosti plátů.

Podávání cholesterolové diety vedlo k očekávanému zvýšení hladin celkového cholesterolu, VLDL a LDL cholesterolu. Tato hypercholesterolémie vedla ke zvětšení aterosklerotických plátů v aortě v porovnání s kontrolní skupinou na standardní dietě. U skupiny s cholesterolovou dietou byly zjištěny vyšší hladiny solubilního endoglinu a zároveň významný pokles jeho exprese ve tkáni. Při studiu exprese členů kaskády endoglin/ALK1/Smad1/VEGF jsme pozorovali významné snížení exprese ALK1 receptoru a snížení exprese cévního endotelového růstového faktoru (VEGF) po podávání cholesterolové diety. Bylo popsáno, že pokles VEGF může souviset s destabilizací endotelu, tedy poškozením vasodilatace a zvýšením adheze leukocytů (Walshe et al., 2009). Při sledování kaskády endoglin/ALK5/Smad2/eNOS jsme pozorovali po podávání cholesterolu významnou změnu jen u pSmad2. Lokalizace endoglinu byla pozorována pouze na endotelu, ale ALK1, pSmad2 a VEGF byly pozorovány v celé cévní stěně. Snížení exprese těchto proteinů může být příčinou zvětšení aterosklerotických plátů.

Největší význam této práce je ve zjištění možné souvislosti mezi zvýšením hladin solubilního endoglinu a jeho sníženou expresí ve stěně cévy po podávání cholesterolu, což může mít vztah k progresi aterosklerózy. Proto monitorování hladin solubilního endoglinu by mohlo být zajímavým ukazatelem probíhající aterogeneze.

4.4. Endoglin jako možný marker pro sledování přínosu atorvastatinové terapie v ateroskleróze

Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis

J. Rathouska, L. Vecerova, Z. Strasky, M. Slanarova, E. Brcakova, Z. Mullerova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal, *Pharmacol Res*, 64 (2011), pp. 53-9. (IF: 4.346)

Tato studie je opět experimentální a rozšiřuje předchozí studii. Zde jsme se zaměřili na sledování exprese endoglin/ALK1/pSmad1/VEGF kaskády v myši aortě a její ovlivnění nejen podáváním cholesterolu, ale zároveň podáváním atorvastatinu.

V experimentu byl opět použit model myši s dvojitým deficitem apoE lipoproteinu a LDL receptoru. Kontrolní skupině byla podávána 1% cholesterolová dieta po dobu 8 týdnů, sledované skupině byla podávána cholesterolová dieta s přidáním atorvastatinu v dávce 50 mg/kg na den. Byla provedena biochemická analýza hladin cholesterolu v séru, Western blot analýza v homogenátu aorty, stanovení solubilního endoglinu pomocí metodiky ELISA, imunohistochemické a histologické barvení odebrané tkáně aorty, a následné stereologické hodnocení velikosti plátů.

Podávání atorvastatinu vedlo k významnému poklesu celkového cholesterolu, VLDL a LDL cholesterolu a také ke zmenšení aterosklerotických lézí v aortě, v porovnání se zvířaty jen s cholesterolovou dietou. Významný pokles byl zjištěn i u hladin solubilního endoglinu po podávání atorvastatinu. Naopak sledovaná kaskáda byla po atorvastatinu zvýšena. Lokalizace endoglinu byla opět pozorována pouze na endotelu, ale exprese ALK1, pSmad1 a VEGF byla pozorována v celé cévní stěně s vyšší intenzitou u zvířat po podávání atorvastatinu.

Výsledky studie přinesly nové poznatky o vlivu atorvastatinu na expresi endoglin/ALK1/pSmad1/VEGF kaskády u hypercholesterolemických zvířat. Aktivace této signalizace a zjištěné zmenšení lézí ukazuje na anti-aterogenní účinek atorvastatinu. Navíc zde byl opět pozorován opačný efekt na hladiny solubilního endoglinu, proto se zdá být tento marker také zajímavým ukazatelem účinnosti statinové terapie u aterosklerózy.

4.5. Aktivace TGF- β signalizace po podání atorvastatinu souvisí se snížením aterogeneze u ApoE/LDLR def. myšního modelu

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

L. Vecerova, Z. Strasky, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Brackova, S. Micuda and P. Nachtigal, *J Atheroscler Thromb*, 19 (2012), pp. 115-26. (IF: 2.933)

TGF- β cytokin hraje významnou úlohu v procesu aterogeneze, jeho signalizace je zprostředkována TGF- β receptory a Smad signálními posly (Pardali et al., 2010). V této

experimentální studii jsme se zaměřili na dvě již zmiňované signalizační dráhy endoglin/ALK5/Smad2/eNOS a endoglin/ALK1/Smad1/VEGF a jejich ovlivnění atorvastatinem u myšího modelu, kde nedošlo k hypolipidemickému účinku statinu.

Ve studii byl použit model myší s kombinovaným defektem apoE lipoproteinu a LDL receptoru. Pro tento model je charakteristický časný rozvoj aterosklerotických lézí a hypercholesterolémie. Kontrolní skupina byla krmena standardní dietou, u skupiny se statinem byl do diety přidáván atorvastatin v dávce 50 mg/kg za den. Byla provedena biochemická analýza hladin cholesterolu, imunohistochemická analýza ve světelné a fluorescenční mikroskopii, Western blot analýza exprese sledovaných proteinů v aortě a také měření velikosti plátů.

Podávání atorvastatinu v kombinaci se standardní dietou vedlo u tohoto myšího modelu překvapivě k významnému nárůstu cholesterolu, hlavně ve VLDL frakci. Tento efekt nám umožnil studium tzv. pleiotropních účinků statinů. Podobné zvýšení cholesterolu po statinech u myší bylo již dříve popsáno v souvislosti s designem experimentu (Zadelaar et al., 2007).

Velikost aterosklerotických plátů byla po atorvastatinu snížena. Lokalizace endoglinu byla pozorována zejména na endotelu na povrchu aterosklerotických lézí, dále na endotelu chlopní, v kapilárách okolního myokardu a na intaktním endotelu aorty, stejně jako v předchozích studiích. Nicméně vyšší intenzita exprese byla u skupiny s atorvastatinem. Podobné barvení bylo i u eNOS, který byl také detekován jen na endotelu a také s vyšší intenzitou po atorvastatinu. Lokalizace ALK1 a ALK5 byla popsána na endotelu, v adventicii, v medii a uvnitř aterosklerotického plátu. Fosforylované formy Smad1 a Smad2 (pozitivita v jádrech buněk) byly detekovány v adventicii, medii, v aterosklerotické lézi a na endotelu. VEGF byl také lokalizován v celé cévní stěně. Exprese všech těchto proteinů byla zvýšená po statinové terapii. Pro ověření, zda jsou sledované proteiny kolokalizovány s endoglinem, bylo provedeno dvojité fluorescenční barvení. Pro potvrzení výhradně endotelové exprese endoglinu, byla prokázána jeho kolokalizace s PECAM-1 (marker endotelových buněk). Dále byla kolokalizace endoglinu prokázána se všemi dalšími sledovanými proteiny, zejména na endotelu aterosklerotických plátů. Western blot analýza potvrdila zvýšení exprese všech sledovaných proteinů po podávání atorvastatinu, pouze exprese ne-fosforylovaných forem Smad1 a Smad2 zůstaly nezměněny.

V této studii bylo prokázáno, že atorvastatin je schopen zvýšit expresi endoglinu, ALK1, ALK5, pSmad1 a pSmad2, VEGF a eNOS a snížit velikost aterosklerotických lézí, to vše bez jeho hypolipidemických účinků. Na základě těchto výsledků usuzujeme, že endoglin a s ním spojená signalizace může mít protektivní úlohu v aterogenezi.

4.6. Role endoglinu v procesu aterosklerózy

The role of endoglin in atherosclerosis

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

V tomto přehledovém článku jsme se zaměřili na souhrn dostupných informací o úloze endoglinu v ateroskleróze. Hlavní část práce tvoří přehled exprese endoglinu jak v lidské, tak v experimentální ateroskleróze u zvířecích modelů. V přehledné tabulce jsou zpracovány dostupné informace o lokalizaci exprese u určitého druhu, a jaké efekty byly pozorovány. Endoglin byl popsán v lidských aterosklerotických cévách na endotelu, v buňkách hladké svaloviny a makrofázích. U prasat byla lokalizace endoglinu popsána na endotelu a v buňkách hladké svaloviny koronárních arterií. U myši je exprese endoglinu popisována výhradně na endotelu jak intaktních, tak aterosklerotických cév.

V další části práce jsme se zaměřili na souhrn informací o solubilní formě endoglinu a jeho úloze v ateroskleróze. U řady kardiovaskulárních onemocnění jako ateroskleróza, hypertenze, dále u diabetes mellitus a preeklamsie bylo popsáno zvýšení hladin solubilního endoglinu v krvi. Což může vést k interakci mezi endoglinem a TGF- β 1 v cirkulaci a tím ke snížení TGF- β signalizace v cévách, tedy k rozvoji aterogeneze. Terapie statiny, snížení cholesterolu v krvi či aplikace mimo-tělové LDL reoferézy/aferézy vedla ke snížení solubilního endoglinu, což může vést ke zvýšení TGF- β signalizace v cévní stěně a možnému pozitivnímu ovlivnění aterogeneze.

V závěru práce je navržen hypotetický model pro funkci endoglinu v ateroskleróze. Endoglin tvoří funkční komplex s TGF- β receptory a TGF- β 1 cytokinem. Tento komplex může aktivovat buď ALK1/Smad1/5 nebo ALK5/Smad2/3 signální kaskádu. Aktivace ALK1/Smad1/5 signalizace může vést k neovaskularizaci plátů anebo protekci endotelu v důsledku zvýšení eNOS exprese prostřednictvím VEGF. Nicméně role této signalizace vzhledem k ateroskleróze je nejasná. Aktivace ALK5/Smad2/3 signalizace může vést ke zvýšení eNOS, k protizánětlivým účinkům inhibicí NF- κ B,

k aktivaci transkripčního faktoru EGR-1, k produkci kolagenu a stabilizaci plátu. Proto aktivace endoglin/ALK5/Smad2/3 signalizace představuje mechanismus protekce cévní stěny vůči ateroskleróze.

4.7. ENG je zapojen do zvýšení exprese eNOS při podání atorvastatinu u endotelových buněk *in vitro*

Endoglin is involved in atorvastatin-induced eNOS expression of endothelial cells

L. Zemankova, M. Varejckova, I. Nemeckova, K. Jezkova, J. Rathouska, P. Fikrova, L. Cerveny, L. Bottela, C. Bernabeu, P. Nachtigal, (*rukopis v recenzním řízení*)

V našich předchozích experimentech jsme zjistili, že endoglin je exprimován převážně buňkami endotelu *in vivo* v myší aortě (Nachtigal et al., 2009a; Nachtigal et al., 2009b). Dále jsme pozorovali zvýšení exprese endoglinu a eNOS v aortě po podávání atorvastatinu zároveň s redukcí aterosklerózy (Rathouska et al., 2011; Vecerova et al., 2012). Nicméně nebyl prokázán přímý efekt endoglinu na zvýšení eNOS po atorvastatinu, proto jsme se v této experimentální studii zaměřili na to, zda je exprese endoglinu u endotelových buněk klíčová pro zvýšení eNOS po podávání atorvastatinu.

Ve studii byly použity lidské endotelové buňky z pupečnickové žíly (HUVEC), které byly vystaveny jak působení atorvastatinu v různých dávkách, tak působení TNF α či jejich kombinaci. Analýza exprese vybraných markerů byla provedena pomocí Western blot analýzy a imunofluorescenční průtokové cytometrie. V případě endoglinu nám průtoková cytometrie umožnila detekci pouze jeho extracelulární části, tedy jeho exprese na povrchu endotelových buněk. Při přípravě vzorků nebyly buňky ani fixovány ani permeabilizovány. Celková exprese endoglinu v buňkách byla hodnocena pomocí Western blotu po homogenizaci buněk. Také byly změřeny hladiny solubilního endoglinu metodou ELISA v médiu. Bylo provedeno oslabení exprese endoglinu pomocí transfekce siRNA a následné ovlivnění atorvastatinem.

Protože ateroskleróza je považována za zánětlivé onemocnění, pro model zánětu jsme si vybrali podávání TNF α v dávce 10 ng/ml. Exprese endoglinu nebyla ovlivněna podáváním TNF α v časech 2 hodiny a 6 hodin. V časovém intervalu 16 hodin bylo prokázáno významné snížení exprese endoglinu u HUVEC metodou průtokové cytometrie a pomocí Western blot analýzy byl potvrzen i pokles celkového endoglinu. Zároveň byl popsán nárůst hladin solubilního endoglinu po 16 hodinách TNF α .

Ve stejném časovém designu byl popsán i pokles exprese eNOS. Pro potvrzení zánětlivého efektu u HUVEC buněk jsme provedli analýzu VCAM-1 (adhezní protein zvyšující se při zánětlivém procesu).

V další části studie jsme se zaměřili na účinky atorvastatinu u HUVEC. Bylo vyzkoušeno dávkové rozmezí od 1 μ M do 5 μ M. Podávání atorvastatinu po dobu 24 hodin vedlo k dávkově závislému nárůstu exprese endoglinu s maximálním účinkem při dávce 5 μ M. Tato dávka pak byla použita i v dalších experimentech. Podávání atorvastatinu vedlo také ke zvýšení eNOS u těchto buněk.

Abychom popsali efekt atorvastatinu na endoglin a eNOS během zánětu, použili jsme tzv. „pretreatment“ model. To znamená, že buňky byly nejprve vystaveny podání atorvastatinu po dobu 24 hodin a poté byly vystaveny na 16 hodin účinkům TNF α . Preventivní podání atorvastatinu vedlo k zabránění poklesu endoglinu a eNOS popsanému po TNF α . Zároveň toto preventivní podání atorvastatinu vedlo ke snížení reaktivních forem kyslíkových radikálů.

Pro ověření zda je endoglin nezbytný pro efekt atorvastatinu na zvýšení eNOS, jsme zavedli siRNA endoglinu. Podávání atorvastatinu u siRNA buněk vedlo k mírnému zvýšení ještě zachované exprese endoglinu, ale nevedlo ke změnám v expresi eNOS, jako tomu bylo u buněk bez siRNA.

V této studii jsme poprvé ukázali, že zánět může vést k poklesu exprese endoglinu u endotelových buněk a zároveň k nárůstu jeho solubilní formy v médiu, což odpovídá našim předchozím *in vivo* experimentům. Také jsme popsali, že preventivní podání atorvastatinu může zabránit poklesu exprese endoglinu a eNOS v zánětlivých podmínkách. Z výsledků siRNA experimentu usuzujeme na nezbytnost správné exprese endoglinu pro efekt atorvastatinu na zvýšení eNOS.

4.8. Souhrnná diskuze a shrnutí

První dvě předkládané práce byly zaměřeny na studium lokalizace endoglinu společně se členy TGF- β signální kaskády a společně s eNOS *in vivo* v aortě myšího modelu. Výsledky z těchto dvou publikací ukazují, že endoglin je u myšího modelu lokalizovaný výhradně na endotelu cév. U lidí byla popsána exprese endoglinu nejen u endotelových buněk, ale i u fibroblastů, buněk hladké svaloviny a makrofágů (Piao and Tokunaga, 2006). Tento rozdíl v expresi by mohl souviset s rozdílností v lidské a myší

aterogenezi. Nicméně fakt, že je endoglin u myši lokalizován pouze na endotelu nám umožňuje studovat jeho endotelovou funkci v procesu aterogeneze. Dalším přínosem těchto prací byl průkaz společné lokalizace endoglinu, Smad2, pSmad2/3 a eNOS, jak na intaktním endotelu u C57BL/6J myši, tak na endotelu na povrchu aterosklerotických lézí u apoE/LDLR deficientních myši. Protože exprese eNOS a následná produkce NO je důležitá pro funkci endotelu, naznačuje společná kolokalizace endoglinu a eNOS na endotelu cév, zejména na povrchu plátů, možný protektivní účinek endoglinu na cévní endotel díky ovlivnění exprese eNOS.

Na další tři *in vivo* experimentální práce u apoE/LDLR deficientního myšního modelu, lze pohlížet jako na velkou studii, která měla několik částí, kdy cílem bylo popsat TGF- β /endoglin signalizační dráhu. Studovali jsme expresi jednotlivých receptorů TGF- β R, Smad proteinů a markerů endotelové dysfunkce při různém typu diety. Hlavním cílem bylo popsat možné změny exprese endoglinu v aortě a jeho sérových hladin při podávání atorvastatinu, nebo při podávání cholesterolové diety. Již dříve bylo zjištěno, že zvýšené hladiny solubilního endoglinu v cirkulaci mohou být ukazatelem progresu aterosklerózy (Blaha et al., 2008). Ovšem původ a role solubilního endoglinu zůstala neobjasněna. Ve studii byl použit model ApoE/LDLR deficientní myši ve věku 16 týdnů. V první části, podávání cholesterolové diety vedlo ke zvýšení hladin cholesterolu v krvi a ke zvětšení aterosklerotických plátů v aortě. Byla zaznamenána zvýšená hladina solubilního endoglinu v séru a zároveň snížení jeho exprese v aortě. V druhé části, po podávání cholesterolové diety s atorvastatinem bylo pozorováno snížení hladin cholesterolu v krvi a také zmenšení aterosklerotických plátů v aortě. Zároveň došlo k poklesu solubilního endoglinu v séru a jeho zvýšení ve tkáni. Nicméně v tomto designu experimentu nejsme schopni určit, zda je za zvýšení exprese endoglinu ve tkáni zodpovědný hypolipidemický efekt, nebo podávání samotného atorvastatinu. Proto ve třetí části studie, kde byl podáván atorvastatin v kombinaci se standardní dietou, nám design experimentu umožnil vyloučit hypolipidemický efekt statinu. Po podávání standardní diety s atorvastatinem došlo ke zvýšení hladin cholesterolu v krvi, ale přesto ke zmenšení aterosklerotických plátů v aortě. Nebylo sice prokázáno statisticky významné ovlivnění solubilního endoglinu, ale k pozorovanému zvýšení endoglinu v aortě došlo pouze účinkem statinu, nezávisle na změnách cholesterolu. Výsledky tedy ukazují na to, že hladiny sérového endoglinu a jeho exprese v aortě se mění ve vztahu k hladinám cholesterolu a podávání atorvastatinu. Pokud hodnotíme možnou aplikaci do

humánní medicíny, můžeme navrhnout sledování sérových hladin endoglinu jako zajímavého markeru probíhající aterogeneze či případně účinnosti statinové terapie.

Bylo již dříve popsáno, že cholesterol je schopný potlačit TGF- β signalizaci a měnit expresi TGF- β RI a TGF- β RII (Chen et al., 2008). O efektech VEGF v ateroskleróze jsou rozdílné informace. Může podporovat progresi aterosklerózy, na druhou stranu stimuluje produkci NO u buněk endotelu (Takahashi et al., 2010). Při sledování exprese jednotlivých členů signalizační kaskády a jejich ovlivnění přinesla studie Z. Strasky, L. Vecerova a kolektiv následující poznatky. Bylo pozorováno, že podávání cholesterolu snížilo endoglin/ALK1/VEGF expresi v myší aortě a zároveň bylo pozorováno zvětšení aterosklerotických plátů. Z těchto výsledků vyvozujeme závěr, že cholesterol může ovlivnit produkci NO právě zasažením této kaskády a tak významně přispět k rozvoji aterosklerotického procesu. V naší předchozí *in vivo* studii bylo po podávání atorvastatinu pozorováno snížení hladin cholesterolu a zvýšení exprese endoglinu, Smad2 a eNOS v myší aortě (Nachtigal et al., 2009a). Nicméně nebyly dostupné *in vivo* data popisující vliv atorvastatinu na druhou kaskádu zahrnující ALK1 a Smad1, na kterou jsme se zaměřili ve studii J. Rathouska, L. Vecerova a kolektiv. Atorvastatin významně zvýšil expresi ALK1, pSmad1 a VEGF v cévní stěně, zároveň byla prokázána lokalizace všech proteinů na endotelu, kde byl exprimován i endoglin. Pozorované zmenšení plátů po podávání atorvastatinu dokazuje jeho anti-aterogenní účinky. Tyto data naznačují, že endoglin ovlivňuje či je zapojen do této signalizace, která vede k protekci endotelu. Ve studii L. Vecerova, Z. Strasky a kolektiv jsme poprvé prokázali současný nárůst exprese u obou sledovaných kaskád ALK5/pSmad2 a ALK1/pSmad1 v aterogenezi ve vztahu k pleiotropním účinkům atorvastatinu. Navzdory hyperlipidemickému účinku atorvastatinu bylo pozorováno zmenšení aterosklerotických lézí, a tedy protektivní efekt atorvastatinu bez přítomnosti snížení cholesterolu. Řada *in vitro* studií popsala zapojení endoglinu do TGF- β signalizace regulací ALK a Smad aktivity (Santibanez et al., 2007; Tian et al., 2010). Nejčastěji jsou popisovány dvě komplikované signalizační dráhy – endoglin/ALK1/Smad1/5, která vede k proliferaci, migraci endotelových buněk a zvýšené angiogenezi, a endoglin/ALK5/Smad2/3, která vede ke snížení aktivity endotelu (Goumans et al., 2003; Goumans et al., 2002). Ovšem tyto opačné efekty byly pozorovány pouze *in vitro*. My jsme prokázali nárůst exprese v myší aortě s rozvinutou aterosklerózou u obou sledovaných kaskád po podávání atorvastatinu. Pro potvrzení propojení mezi endoglinem

a ostatními zvýšenými proteiny jsme provedli dvojitě fluoresceční barvení, které ukázalo na kolokalizace endoglinu a všech sledovaných proteinů na endotelu na povrchu aterosklerotických plátů. Což ukazuje na zapojení těchto proteinů do procesu aterogeneze na endotelu těchto lézí. Nicméně jsme nebyli schopni dostupnými metodami analyzovat, která z těchto signálních drah je více aktivovaná. Zvyšování exprese endoglinu ve tkáni může souviset se zmenšením aterosklerotických plátů, nicméně na základě provedených *in vivo* studií nejsme schopni určit, zda jde o příčinu či následek.

Výsledky těchto experimentálních *in vivo* studií spolu s dalšími dostupnými informacemi jsme shrnuli v přehledovém článku, ve kterém je předložen hypotetický model pro funkci endoglinu v ateroskleróze. Tento model naznačuje, že právě aktivace ALK5/Smad2/3 signalizace, která vede ke zvýšení eNOS, k protizánětlivým účinkům a k produkci kolagenu a stabilizaci plátu, představuje protektivní mechanismus vůči rozvoji aterosklerózy v cévní stěně.

Protože v předchozích *in vivo* studiích nebyl prokázán přímý efekt endoglinu na zvýšení eNOS po atorvastatinu, zaměřili jsme se v poslední předkládané publikaci na sledování exprese endoglinu *in vitro* u endotelových buněk a jeho zapojení do účinku atorvastatinu vedoucímu ke zvýšení eNOS. Zánětlivé podmínky navozené podáváním TNF α (model aterosklerózy) vedly k poklesu exprese endoglinu, tento výsledek se shoduje s již publikovanými daty *in vitro* (Li et al., 2003; Rossi et al., 2013). Ovšem tito autoři neměřili hladiny solubilní formy. Navíc Rosii a kolektiv prokázali nejen pokles exprese endoglinu po TNF α pomocí průtokové cytometrie, ale také popsali nárůst exprese endoglinu v mezibuněčných kontaktech metodou fluoresceční mikroskopie (Rossi et al., 2013). V naší studii byl detekován pokles celkového endoglinu v buňkách pomocí Western blotu. Tyto zjištění vedou k závěru, že zánětlivé podmínky mění lokalizaci endoglinu, ale také redukuje jeho celkovou expresi v buňkách. Naopak jsme naměřili zvýšenou hladinu solubilního endoglinu v médiu kultivovaných buněk v průběhu experimentů s TNF α . Tento výsledek je shodný se studií na HUVEC buňkách (Ikemoto et al., 2012), kde ale neměřili expresi endoglinu v samotných buňkách. Zánětlivé podmínky tedy vedou k poklesu exprese endoglinu a eNOS, které mají protektivní efekt na endotel. Indukce zánětu byla potvrzena díky dramatickému zvýšení exprese VCAM-1, což je známý a dlouhodobě používaný marker zánětu a endotelové dysfunkce.

Atorvastatin zvýšil expresi endoglinu a eNOS u endotelových buněk v této studii a tyto výsledky potvrzují naše pozorování v předchozích *in vivo* experimentech. Také jsme pozorovali nárůst hladin solubilního endoglinu po atorvastatinu, což ale neodpovídá našim výsledkům na myším modelu. Tento rozdíl nejsme zatím schopni vysvětlit, nevíme zda solubilní forma endoglinu detekována u myších modelů opravdu pochází z endotelu cév a zda její zvýšení souvisí se změnami na endotelu. Nicméně nás v našem *in vitro* experimentu zajímalo, zda je atorvastatin schopen zvýšit endoglin a eNOS během zánětlivých podmínek. Byl zaveden tzv. „pretreatment“ model, kde bylo prokázáno, že preventivní podání atorvastatinu vedlo k prevenci poklesu exprese endoglinu a eNOS způsobenému TNF α . Santibanez a kolektiv popsali mechanismus působení endoglinu na zvýšení eNOS exprese prostřednictvím fosforylace a stabilizace Smad2 proteinu (Santibanez et al., 2007). Při použití inhibitoru fosforylace Smad2 (SB-431542) jsme přesto pozorovali zvýšení eNOS exprese po podávání atorvastatinu, což vede k závěru, že zvýšení eNOS po statinu není podmíněno signalizací přes Smad2. V předchozích *in vivo* experimentech byla pozorována kolokalizace endoglinu/eNOS/Smad2 na endotelu po statinu, nicméně tento fakt neprokazuje jejich přímou spolupráci. Popsaná zvýšená exprese Smad2 po statinu může mít i jiný přínos, jako jsou protizánětlivé a plát stabilizující účinky (Bot et al., 2009; DiChiara et al., 2000). Pro ověření zda je samotný endoglin nezbytný pro efekt atorvastatinu na zvýšení eNOS jsme použili siRNA endoglinu. Z výsledků vyplynulo, že endoglin není jediným regulačním proteinem eNOS exprese, nicméně jeho úplná či nenarušená exprese je důležitá pro efekt atorvastatinu na zvýšení eNOS.

Zjištěné účinky statinu na TGF- β signalizační kaskádu *in vivo* a *in vitro*, zejména jeho vliv na zvýšení endoglinu a eNOS, by do budoucna měly být prostudovány v klinických podmínkách. A to zejména u patologických stavů, které souvisejí se sníženými hladinami endoglinu a eNOS, jako jsou například pacienti s hereditární hemoragickou teleangiektázií nebo pacienti s kardiovaskulárními onemocněními souvisejícími s endotelovou dysfunkcí.

5. Závěry

TGF β R typu III – endoglin je u myšího modelu lokalizovaný výhradně na endotelu cév jak na povrchu aterosklerotických plátů, tak na endotelu bez přítomnosti aterosklerózy.

Kolokalizace endoglinu, TGF β receptorů, Smad proteinů a eNOS na endotelu cév, zejména na povrchu plátů, naznačuje zapojení endoglinové signalizace do exprese eNOS v cévách, které mohou být postiženy aterosklerotickým procesem.

Hladiny sérového endoglinu a jeho exprese v aortě se mění ve vztahu k hladinám cholesterolu a podávání atorvastatinu.

Hladiny sérového endoglinu jsou opačné vzhledem k jeho expresi ve tkáni – možný ukazatel probíhající aterogeneze ve stěně cévy.

Oslabení signální dráhy související s endoglinem po podávání cholesterolu může pravděpodobně souviset s rozvojem endotelové dysfunkce a s rozvojem aterogeneze.

Současný nárůst exprese u obou sledovaných kaskád endoglin/ALK5/pSmad2 a endoglin/ALK1/pSmad1 lze pozorovat také bez hypolipidemického efektu atorvastatinu a proto můžeme ovlivnění této signalizace přisuzovat tzv. pleiotropním účinkům atorvastatinu.

Zánět vede k poklesu exprese endoglinu a eNOS proteinu *in vitro* a zároveň k nárůstu solubilní formy endoglinu.

Preventivní podání atorvastatinu zabraňuje poklesu exprese endoglinu a eNOS v zánětlivých podmínkách *in vitro*.

Snížení exprese endoglinu díky použití siRNA metodiky má za následek to, že exprese eNOS se po podání atorvastatinu nezvýší jako je tomu u HUVEC buněk, kde je exprese endoglinu fyziologická.

Zvýšení exprese eNOS po podávání atorvastatinu není podmíněna signalizací přes Smad2.

6. Podíl předkladatelky na publikovaných pracích zahrnutých v disertační práci

P. Nachtigal, N. Pospisilova, L. Vecerova, S. Micuda, E. Brcakova, K. Pospechova and V. Semecky, 'Atorvastatin increases endoglin, SMAD2, phosphorylated SMAD2/3 and eNOS expression in ApoE/LDLR double knockout mice', *J Atheroscler Thromb*, 16 (2009), pp. 265-74. (IF: 2.933)

- imunohistochemické barvení pro stanovení exprese endoglinu
- fluorescenční barvení pro hodnocení kolokalizace vybraných markerů
- podíl na části textu týkající se metodiky

P. Nachtigal, L. Vecerova, N. Pospisilova, S. Micuda, E. Brcakova, E. Navarro Hernandez, K. Pospechova and V. Semecky, 'Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study', *Histol Histopathol*, 24 (2009), pp. 1499-506. (IF: 2.281)

- imunohistochemické barvení pro stanovení exprese endoglinu
- fluorescenční barvení pro hodnocení kolokalizace vybraných markerů
- podíl na analýze dat a textu publikace

Z. Strasky, L. Vecerova, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Brcakova, Z. Kudlackova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal, 'Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice', *Circ J*, 75 (2011), pp. 1747-55. (IF: 3.578)

- imunohistochemické barvení pro stanovení exprese jednotlivých markerů
- histologické barvení olejovou červení pro stanovení velikosti plátů
- podíl na analýze dat a textu publikace

J. Rathouska, L. Vecerova, Z. Strasky, M. Slanarova, E. Brcakova, Z. Mullerova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal, 'Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis', *Pharmacol Res*, 64 (2011), pp. 53-9. (IF: 4.346)

- imunohistochemické barvení pro stanovení exprese jednotlivých markerů
- histologické barvení olejovou červení pro stanovení velikosti plátů
- podíl na analýze dat a textu publikace

L. Vecerova, Z. Strasky, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Breckova, S. Micuda and P. Nachtigal, 'Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice', *J Atheroscler Thromb*, 19 (2012), pp. 115-26. (IF: 2.933)

- hlavní podíl na analýze dat a textu publikace
- imunohistochemické barvení pro stanovení exprese jednotlivých markerů
- histologické barvení olejovou červení pro stanovení velikosti plátů
- fluorescenční barvení pro hodnocení kolokalizace vybraných markerů
- Western blot analýza

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

- podíl na analýze literatury a textu přehledového článku
- příprava přehledové tabulky popisující expresi endoglinu v lidských a zvířecích aterosklerotických cévách

L. Zemankova, M. Varejckova, I. Nemeckova, K. Jezkova, J. Rathouska, P. Fikrova, L. Cerveny, L. Bottela, C. Bernabeu, P. Nachtigal, 'Endoglin is involved in atorvastatin-induced eNOS expression of endothelial cells', (*rukopis v recenzním řízení*)

- hlavní podíl na analýze dat a textu publikace
- kultivace buněk HUVEC a experimenty s podáváním atorvastatinu a TNF α
- stanovení exprese sledovaných proteinů pomocí imunofluorescenční průtokové cytometrie a Western blot analýzy
- stanovení hladin solubilní endoglinu metodou ELISA
- stanovení ROS metodou DCF
- transfekce HUVEC buněk – siRNA endoglinu

7. Přehled publikační činnosti

P. Nachtigal, N. Pospisilova, L. Vecerova, S. Micuda, E. Brcakova, K. Pospechova and V. Semecky, 'Atorvastatin increases endoglin, SMAD2, phosphorylated SMAD2/3 and eNOS expression in ApoE/LDLR double knockout mice', *J Atheroscler Thromb*, 16 (2009), pp. 265-74. (IF: 2.933)

P. Nachtigal, L. Vecerova, N. Pospisilova, S. Micuda, E. Brcakova, E. Navarro Hernandez, K. Pospechova and V. Semecky, 'Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study', *Histol Histopathol*, 24 (2009), pp. 1499-506. (IF: 2.281)

P. Nachtigal, M. Sterba, O. Popelova, L. Vecerova, Z. Kudlackova, E. Jirkovsky, V. Gersl, 'Daunorubicin does not induce immunohistochemically detectable endothelial dysfunction in rabbit aorta and femoral artery', *Histol Histopathol*, 26 (2011): s. 551-62. (IF: 2.281)

Z. Strasky, L. Vecerova, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Brcakova, Z. Kudlackova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal, 'Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice', *Circ J*, 75 (2011), pp. 1747-55. (IF: 3.578)

J. Rathouska, L. Vecerova, Z. Strasky, M. Slanarova, E. Brcakova, Z. Mullerova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal, 'Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis', *Pharmacol Res*, 64 (2011), pp. 53-9. (IF: 4.346)

L. Stejskalova, L. Vecerova, LM. Peréz, R. Vrzal, Z. Dvorak, P. Nachtigal, P. Pavek, 'Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures', *Toxicol Sci*, 123 (2011), pp. 26-36. (IF: 4.328)

P. Nachtigal, J. Rathouska, L. Vecerova, Z. Strasky; Book title: *Atherogenesis* (ISBN 978-953-307-992-9); Chapter title: 'The role of TGF- β 1 cytokine and its receptors in atherosclerosis' (2011), pp. 327-344; <http://www.intechopen.com/books/atherogenesis>

L. Vecerova, Z. Strasky, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Brcakova, S. Micuda and P. Nachtigal, 'Activation of TGF- β receptors and Smad proteins by atorvastatin is related

to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice', *J Atheroscler Thromb*, 19 (2012), pp. 115-26. (IF: 2.933)

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

D. Ahmadimoghaddam, J. Hofman, L. Zemankova, P. Nachtigal, E. Dolezelova, L. Cerveny, M. Ceckova, S. Micuda, F. Staud, 'Synchronized activity of organic cation transporter 3 (Oct3/Slc22a3) and multidrug and toxin extrusion 1 (Mate1/Slc47a1) transporter in transplacental passage of MPP+ in rat', *Toxicol Sci*, 128 (2012), pp. 471-81. (IF: 4.328)

D. Ahmadimoghaddam, L. Zemankova, P. Nachtigal, E. Dolezelova, Z. Neumanova, L. Cerveny, M. Ceckova, M. Kacerovsky, S. Micuda, F. Staud, 'Organic Cation Transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and Multidrug and Toxin Extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) Transporter in the Placenta and Fetal Tissues: Expression Profile and Fetus Protective Role at Different Stages of Gestation', *Biol Reprod*, 88 (2013), pp. 55. (IF: 4.027)

Z. Strasky, L. Zemankova, I. Nemeckova, J. Rathouska, R.J. Wong, L. Muchova, I. Subhanova, J. Vanikova, K. Vanova, L. Vitek, P. Nachtigal, 'Spirulina platensis and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis', *Food Funct*, 4 (2014), pp. 1586-94. (IF: 2.694)

J. Rathouska, I. Nemeckova, L. Zemankova, Z. Strasky, K. Jezkova, M. Varejckova, P. Nachtigal, 'Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis', *Heart Vessels*, (2014). [Epub ahead of print] (IF: 2.126)

L. Zemankova, M. Varejckova, I. Nemeckova, K. Jezkova, J. Rathouska, P. Fikrova, L. Cerveny, L. Bottela, C. Bernabeu, P. Nachtigal, 'Endoglin is involved in atorvastatin-induced eNOS expression of endothelial cells'. (*rukopis v recenzním řízení*)

8. Prezentace na konferencích

Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Rathouska J., Brcakova E., Nachtigal P.; Diskutovaný poster s názvem: Endoglin expression in atherogenesis and its changes in relation to cholesterol levels or plaque size in ApoE/LDLR-deficient mice; 78th European Atherosclerosis Society Congress, Hamburg 2010

Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Rathouska J., Brcakova E., Nachtigal P.; Přednáška s názvem: Změny exprese endoglinu v aterogenezi ve vztahu k hladinám cholesterolu a velikosti plátu u ApoE/LDLR deficientního myšího modelu; 60. Česko-Slovenské farmakologické dny, Hradec Králové 2010

Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Nachtigal P.; Přednáška s názvem: Změny exprese endoglinu v aterogenezi ve vztahu k hladinám cholesterolu a velikosti plátu u ApoE/LDLR deficientního myšího modelu aterosklerózy; 4. Morfologická postgraduální konference, Lékařská fakulta v Hradci Králové 2010

Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Andrýs C., Micuda S., Nachtigal P.; Přednáška s názvem: Atorvastatin treatment and cholesterol levels affect endoglin levels in blood serum and its expression in aorta in ApoE/LDLR double knockout mice; 1. Postgraduální konference na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové 2011

Vecerova L., Strasky Z., Rathouska J., Slanarova M., Brcakova E., Nachtigal P.; Poster s názvem: Changes of endoglin levels in serum and mice aorta with respect to cholesterol and atorvastatin; 79th European Atherosclerosis Society Congress, Gothenburg 2011

Vecerova L., Cerveny L., Dolezelova E., Nachtigal P.; Poster s názvem: Atorvastatin treatment affects endoglin expression in endothelial cells-pilot study; 61. Česko-Slovenské farmakologické dny, Brno 2011

Vecerova L., Cerveny L., Dolezelova E., Nachtigal P.; Poster s názvem: Atorvastatin treatment affects members of TGF β signaling pathway in endothelial cell line – pilot study; XV. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn 2011

Zemankova L., Cerveny L., Dolezelova E., Nachtigal P.; Přednáška s názvem: Monitoring of atorvastatin treatment effects on members of TGF β signaling pathway

in endothelial cell line – pilot study; 2. Postgraduální konference na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové 2012

Zemankova L., Cerveny L., Strasky Z., Nachtigal P.; Poster s názvem: Changes of endoglin and VCAM-1 expression after the TNF-alpha treatment in HUVEC cells; New frontiers in basic cardiovascular research, Hradec Králové 2012

Zemankova L., Varejkova M., Strasky Z., Nachtigal P.; Poster s názvem: Effects of atorvastatin treatment on endoglin expression in tnf-alpha-induced inflammation in HUVECs; XVI. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn 2012

Zemankova L., Varejkova M., Jezkova K., Strasky Z., Nachtigal P.; Přednáška s názvem: Effects of atorvastatin treatment on endoglin expression in TNF-alpha-induced inflammation in HUVECs; 3. Postgraduální konference na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové 2013

Zemankova L., Varejkova M., Strasky Z., Nachtigal; Poster s názvem: Atorvastatin induces endoglin and eNOS expression in endothelial cells; 81st European Atherosclerosis Society Congress, Lyon, Francie, 2013

Zemankova L., Varejkova M., Nemeckova I., Jezkova K., Rathouska J., Nachtigal; Poster s názvem: Effects of atorvastatin treatment on endoglin expression in tnf-alpha induced inflammation in endothelial cells; XVII. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn 2013

Zemankova L., Varejkova M., Nemeckova I., Jezkova K., Rathouska J., Nachtigal; Přednáška s názvem: Effects of atorvastatin and TNF-alpha treatment on endoglin and eNOS expression in endothelial cells; 4. Postgraduální konference na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové 2014

9. Seznam zkratek

| | |
|---------------------|---|
| AKT | serin/treonin kináza |
| ALK | activin receptor-like kináza |
| ApoE ^{-/-} | apolipoprotein E deficientní myši |
| BH4 | tetrahydrobiopterin |
| BMP | kostní růstový protein (bone morphogenetic protein) |
| Cav-1 | caveolin-1 |
| CD | diferenční skupina, označení pro skupinu molekul na buňkách |
| DCF | 2',7'-dichlorofluorescein |
| EGR-1 | early growth response protein 1 |
| ENG | endoglin, CD105 |
| ERK | early response kináza |
| eNOS | endotelová syntáza oxidu dusnatého |
| iNOS | inducibilní syntáza oxidu dusnatého |
| nNOS | neuronální syntáza oxidu dusnatého |
| HMG-CoA | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A |
| HDL | lipoproteiny o vysoké hustotě |
| HHT | hereditární hemoragická teleangiektázie |
| Hsp90 | heat shock protein 90 |
| HUVEC | endotelové buňky z lidské pupečnickové žíly |
| ICAM-1 | intracelulární adhezní molekula |
| IL | interleukin |
| JNK | c-Jun N-terminal kináza |
| LDL | lipoproteiny o nízké hustotě |

| | |
|---------------------|--|
| LDLR ^{-/-} | LDL receptor deficientní myši |
| MMP | proteolytický enzym, matrix metaloproteáza |
| MT1-MMP | matrix metaloproteáza, MMP-14 |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukovaná forma |
| NF-κB | transkripční faktor |
| NO | oxid dusnatý |
| ONOO ²⁻ | peroxynitrit |
| oxLDL | oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě |
| PAI-1 | inhibitor plazminogenového aktivátoru |
| PECAM-1 | adhezní molekula endotelových buněk, CD31 |
| PI3K | fosfatidylinositol 3-kináza |
| Rho, Rac | G proteiny, GTPázy |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| siRNA | short interfering RNA |
| Smad | protein regulující funkci TGF-β , fungující jako transkripční faktor |
| pSmad | fosforylovaná forma proteinu regulujícího funkci TGF-β |
| TAK-1 | TGF-β aktivovaná kináza 1 |
| TNF-α | tumor nekrotizující faktor α |
| TGF-β | růstový transformační faktor β |
| TGF-βRI | receptor typu I pro TGF-β |
| TGF-βRII | receptor typu II pro TGF-β |
| VCAM-1 | adhezní molekula cévních buněk |
| VEGF | cévní endotelový růstový faktor |
| VLDL | lipoproteiny o velmi nízké hustotě |

10. Použitá literatura

- Bernabeu, C., Conley, B.A., Vary, C.P., 2007. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem* 102, 1375-1388.
- Blaha, M., Cermanova, M., Blaha, V., Jarolim, P., Andrys, C., Blazek, M., Maly, J., Smolej, L., Zajic, J., Masin, V., Zimova, R., Rehacek, V., 2008. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 197, 264-270.
- Blazquez-Medela, A.M., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M.A., Recio-Rodriguez, J.I., Sanchez-Rodriguez, A., Lopez-Novoa, J.M., Martinez-Salgado, C., 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8, 86.
- Bobik, A., 2006. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1712-1720.
- Bot, P.T., Hoefer, 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., 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, 439-447.
- Bourdeau, A., Faughnan, M.E., Letarte, M., 2000. Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med* 10, 279-285.
- Brouet, A., Sonveaux, P., Dessy, C., Moniotte, S., Balligand, J.L., Feron, O., 2001. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res* 89, 866-873.
- Conley, B.A., Smith, J.D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, C., Vary, C.P., 2000. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153, 323-335.
- DiChiara, M.R., Kiely, J.M., Gimbrone, M.A., Jr., Lee, M.E., Perrella, M.A., Topper, J.N., 2000. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *J Exp Med* 192, 695-704.
- Dimmeler, S., Zeiher, A.M., 1999. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell death and differentiation* 6, 964-968.

- Endres, M., Laufs, U., 2004. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 35, 2708-2711.
- Feinberg, M.W., Jain, M.K., 2005. Role of transforming growth factor-beta1/Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis. *Panminerva Med* 47, 169-186.
- Feron, O., Dessy, C., Desager, J.P., Balligand, J.L., 2001. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103, 113-118.
- Forstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829-837, 837a-837d.
- George, S.J., Lyon, C., 2010. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*, 3-20.
- Giordano, A., Romano, S., Monaco, M., Sorrentino, A., Corcione, N., Di Pace, A.L., Ferraro, P., Nappo, G., Polimeno, M., Romano, M.F., 2012. Differential effect of atorvastatin and tacrolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H135-142.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S., ten Dijke, P., 2003. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* 12, 817-828.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., ten Dijke, P., 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 21, 1743-1753.
- Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A., Bernabeu, C., 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277, 29197-29209.
- Hawinkels, L.J., Kuiper, P., Wiercinska, E., Verspaget, H.W., Liu, Z., Pardali, E., Sier, C.F., ten Dijke, P., 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70, 4141-4150.
- Heeba, G., Hassan, M.K., Khalifa, M., Malinski, T., 2007. Adverse balance of nitric oxide/peroxynitrite in the dysfunctional endothelium can be reversed by statins. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 391-398.
- Hernandez-Perera, O., Perez-Sala, D., Navarro-Antolin, J., Sanchez-Pascuala, R., Hernandez, G., Diaz, C., Lamas, S., 1998. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the

- expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101, 2711-2719.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., Letarte, M., 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267, 19027-19030.
- Chen, C.L., Huang, S.S., Huang, J.S., 2008. Cholesterol modulates cellular TGF-beta responsiveness by altering TGF-beta binding to TGF-beta receptors. *J Cell Physiol* 215, 223-233.
- Chen, X.N., Xu, J., Feng, Z., Fan, M., Han, J.Y., Yang, Z., 2010. Simvastatin combined with nifedipine enhances endothelial cell protection by inhibiting ROS generation and activating Akt phosphorylation. *Acta pharmacologica Sinica* 31, 813-820.
- Ikemoto, T., Hojo, Y., Kondo, H., Takahashi, N., Hirose, M., Nishimura, Y., Katsuki, T., Shimada, K., Kario, K., 2012. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels* 27, 344-351.
- Imaizumi, K., 2011. Diet and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75, 1023-1035.
- Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1994. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4431-4435.
- Jawien, J., Nastalek, P., Korbut, R., 2004. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55, 503-517.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J.V., Prieto, M., Carron, R., Sanz-Rodriguez, F., Perez-Barriocanal, F., Rodriguez-Barbero, A., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J.M., 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 18, 609-611.
- Kalinina, N., Agrotis, A., Antropova, Y., Ilyinskaya, O., Smirnov, V., Tararak, E., 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, 1391-1396.
- LaRosa, J.C., Grundy, S.M., Waters, D.D., Shear, C., Barter, P., Fruchart, J.C., Gotto, A.M., Greten, H., Kastelein, J.J., Shepherd, J., Wenger, N.K., Treating to New Targets, I., 2005. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med* 352, 1425-1435.

- Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., Lopez, L.A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M., Bernabeu, C., 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 133, 1109-1121.
- Laufs, U., 2003. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *European journal of clinical pharmacology* 58, 719-731.
- Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., Liao, J.K., 1998. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97, 1129-1135.
- Li, C., Guo, B., Ding, S., Rius, C., Langa, C., Kumar, P., Bernabeu, C., Kumar, S., 2003. TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res* 23, 1189-1196.
- Li, H., Forstermann, U., 2009. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des* 15, 3133-3145.
- Libby, P., Aikawa, M., 2001. Evolution and stabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Jpn Circ J* 65, 473-479.
- Lopez-Novoa, J.M., Bernabeu, C., 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H959-974.
- Ma, X., Labinaz, M., Goldstein, J., Miller, H., Keon, W.J., Letarte, M., O'Brien, E., 2000. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2546-2552.
- Maron, D.J., Fazio, S., Linton, M.F., 2000. Current perspectives on statins. *Circulation* 101, 207-213.
- Martinez-Gonzalez, J., Badimon, L., 2007. Influence of statin use on endothelial function: from bench to clinics. *Curr Pharm Des* 13, 1771-1786.
- Mason, R.P., Walter, M.F., Jacob, R.F., 2004. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function: role of microdomains and oxidative stress. *Circulation* 109, II34-41.
- Massague, J., Seoane, J., Wotton, D., 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-2810.
- Nachtigal, P., Jamborova, G., Pospisilova, N., Pospechova, K., Solichova, D., Zdansky, P., Semecky, V., 2006. Atorvastatin has distinct effects on endothelial markers in different mouse models of atherosclerosis. *J Pharm Pharm Sci* 9, 222-230.
- Nachtigal, P., Pospisilova, N., Jamborova, G., Pospechova, K., Solichova, D., Andrys, C., Zdansky, P., Semecky, V., 2007. Endothelial expression of endoglin in

- normocholesterolemic and hypercholesterolemic C57BL/6J mice before and after atorvastatin treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 85, 767-773.
- Nachtigal, P., Pospisilova, N., Vecerova, L., Micuda, S., Brackova, E., Pospeschova, K., Semecky, V., 2009a. Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* 16, 265-274.
- Nachtigal, P., Vecerova, L., Pospisilova, N., Micuda, S., Brackova, E., Navarro Hernandez, E., Pospeschova, K., Semecky, V., 2009b. Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 24, 1499-1506.
- Nachtigal, P., Zemankova Vecerova, L., Rathouska, J., Strasky, Z., 2012. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 224, 4-11.
- Paigen, B., Holmes, P.A., Mitchell, D., Albee, D., 1987. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis* 64, 215-221.
- Pardali, E., Goumans, M.J., ten Dijke, P., 2010. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in cell biology* 20, 556-567.
- Park, H.J., Galper, J.B., 1999. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors up-regulate transforming growth factor-beta signaling in cultured heart cells via inhibition of geranylgeranylation of RhoA GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11525-11530.
- Piao, M., 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, 82-89.
- Pospisilova, N., Semecky, V., Jamborova, G., Pospeschova, K., Solichova, D., Andrys, C., Zdansky, P., Nachtigal, P., 2006. Endoglin expression in hyper-cholesterolemia and after atorvastatin treatment in apoE-deficient mice. *J Pharm Pharm Sci* 9, 388-397.
- Rathouska, J., Vecerova, L., Strasky, Z., Slanarova, M., Brackova, E., Mullerova, Z., Andrys, C., Micuda, S., Nachtigal, P., 2011. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 64, 53-59.

- Reddick, R.L., Zhang, S.H., Maeda, N., 1994. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14, 141-147.
- Robertson, A.K., Rudling, M., Zhou, X., Gorelik, L., Flavell, R.A., Hansson, G.K., 2003. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 112, 1342-1350.
- Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Galan, E., Santamaria, B., Sanchez-Lopez, E., Rodrigues-Diez, R., Blanco-Colio, L.M., Egido, J., Ortiz, A., Ruiz-Ortega, M., 2008. Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PLoS One* 3, e3959.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.
- Rossi, E., Sanz-Rodriguez, F., Eleno, N., Duwell, A., Blanco, F.J., Langa, C., Botella, L.M., Cabanas, C., Lopez-Novoa, J.M., Bernabeu, C., 2013. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 121, 403-415.
- Santibanez, J.F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C.P., Lopez-Novoa, J.M., Attisano, L., Bernabeu, C., 2007. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210, 456-468.
- Saura, M., Zaragoza, C., Cao, W., Bao, C., Rodriguez-Puyol, M., Rodriguez-Puyol, D., Lowenstein, C.J., 2002. Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ Res* 91, 806-813.
- Sessa, W.C., 2004. eNOS at a glance. *J Cell Sci* 117, 2427-2429.
- Shyu, K.G., Wang, B.W., Chen, W.J., Kuan, P., 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, 219-226.
- Strydom, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W., 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1512-1531.
- Strydom, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W., 1994. A definition

- of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14, 840-856.
- Takahashi, S., Shinya, T., Sugiyama, A., 2010. Angiostatin inhibition of vascular endothelial growth factor-stimulated nitric oxide production in endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 112, 432-437.
- ten Dijke, P., Goumans, M.J., Pardali, E., 2008. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11, 79-89.
- Tian, F., Zhou, A.X., Smits, A.M., Larsson, E., Goumans, M.J., Heldin, C.H., Boren, J., Akyurek, L.M., 2010. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 283-288.
- Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M.G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D.H., Husain, M., Letarte, M., 2005. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96, 684-692.
- Vecerova, L., Strasky, Z., Rathouska, J., Slanarova, M., Brcakova, E., Micuda, S., Nachtigal, P., 2012. Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 19, 115-126.
- Veillard, N.R., Steffens, S., Burger, F., Pelli, G., Mach, F., 2004. Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 2339-2344.
- 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., Karumanchi, S.A., 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12, 642-649.
- Walshe, T.E., Dole, V.S., Maharaj, A.S., Patten, I.S., Wagner, D.D., D'Amore, P.A., 2009. Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1185-1192.
- Witting, P.K., Pettersson, K., Ostlund-Lindqvist, A.M., Westerlund, C., Eriksson, A.W., Stocker, R., 1999. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid

- peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb J* 13, 667-675.
- Wolfrum, S., Jensen, K.S., Liao, J.K., 2003. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 729-736.
- Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H.M., Kooistra, T., 2007. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1706-1721.
- Zapolska-Downar, D., Siennicka, A., Kaczmarczyk, M., Kolodziej, B., Naruszewicz, M., 2004. Simvastatin modulates TNFalpha-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci* 75, 1287-1302.
- Zhai, Y., Gao, X., Wu, Q., Peng, L., Lin, J., Zuo, Z., 2008. Fluvastatin decreases cardiac fibrosis possibly through regulation of TGF-beta(1)/Smad 7 expression in the spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 587, 196-203.

11. Přílohy

(v pořadí dle komentářů v kapitole 4)

I.

Atorvastatin increases endoglin, SMAD2, phosphorylated SMAD2/3 and eNOS expression in ApoE/LDLR double knockout mice

P. Nachtigal, N. Pospisilova, L. Vecerova, S. Micuda, E. Brackova, K.
Pospechova and V. Semecky

J Atheroscler Thromb, 16 (2009), pp. 265-74. (IF: 2.933)

II.

**Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated
SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice:
an immunohistochemical study**

P. Nachtigal, L. Vecerova, N. Pospisilova, S. Micuda, E. Breckova, E.
Navarro Hernandez, K. Pospechova and V. Semecky

Histol Histopathol, 24 (2009), pp. 1499-506. (IF: 2.281)

III.

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

Z. Strasky, L. Vecerova, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Brcakova, Z.
Kudlackova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal

Circ J, 75 (2011), pp. 1747-55. (IF: 3.578)

IV.

Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis

J. Rathouska, L. Vecerova, Z. Strasky, M. Slanarova, E. Brcakova, Z.
Mullerova, C. Andrys, S. Micuda and P. Nachtigal

Pharmacol Res, 64 (2011), pp. 53-9. (IF: 4.346)

V.

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

L. Vecerova, Z. Strasky, J. Rathouska, M. Slanarova, E. Brcakova, S. Micuda and P. Nachtigal

J Atheroscler Thromb, 19 (2012), pp. 115-26. (IF: 2.933)

VI.

The role of endoglin in atherosclerosis

P. Nachtigal, L. Zemankova Vecerova, J. Rathouska, Z. Strasky

Atherosclerosis, 224 (2012), pp. 4-11. (IF: 3.706)

VII.

Endoglin is involved in atorvastatin-induced eNOS expression of endothelial cells

L. Zemankova, M. Varejckova, I. Nemeckova, K. Jezkova, J. Rathouska, P.
Fikrova, L. Cerveny, L. Bottela, C. Bernabeu, P. Nachtigal

(rukopis v recenzním řízení)