

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**Vztah tkáňového a solubilního endoglinu k endotelové dysfunkci a
možnosti jejich ovlivnění**

Disertační práce

Mgr. Kateřina Blažíčková

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

Konzultant: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, milou spolupráci a trpělivost během průběhu celého mého postgraduálního studia a během sepisování této disertační práce. Ráda bych poděkovala i své konzultantce PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za pomoc během sepisování disertační práce a spolupráci během celého studia. Poděkování patří i všem spolupracovníkům a zaměstnancům Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Velké díky patří především mé rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu.

Děkuji také za finanční podporu grantovým projektům SVV/2016/260293, GAUK 1284214/C a GACR GA15-24015S.

Prohlášení

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

Mgr. Kateřina Blažíčková

V Hradci Králové dne

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Mgr. Kateřina Blažíčková

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

Název disertační práce: Vztah tkáňového a solubilního endoglinu k endotelové dysfunkci a možnosti jejich ovlivnění

Ateroskleróza je komplexní zánětlivé onemocnění a jako součást kardiovaskulárních chorob je hlavním zdrojem morbidity a mortality na světě. Prvotním dějem v rozvoji aterosklerózy je endotelová dysfunkce, která je charakterizována narušením homeostázy endotelu. Lékem volby v terapii aterosklerózy jsou statiny, které snižují hladinu LDL cholesterolu a příznivě ovlivňují hladiny HDL cholesterolu. Statiny však mají i široké spektrum dalších účinků, které jsou souhrnně označovány jako nelipidové nebo tzv. pleiotropní. Mezi nejdůležitější nelipidové účinky statinů bývá řazena na lipidech nezávislá modulace endotelové funkce a dále antioxidační, antiinflamatorní, antitrombogenní a antiproliferační účinky.

Nejpoužívanějším zvířecím modelem pro studium aterosklerózy je myš. Díky dietě s vysokým obsahem lipidů a genetické úpravě jsme schopni pozměnit lipidové spektrum u myši a navodit aterosklerotické změny již v útlém věku. Během procesu aterogeneze dochází v cévách k patologickým změnám na imunologické, morfologické a funkční úrovni. Důležitou roli během těchto změn hraje signalizační kaskádu transformujícího růstového faktoru (TGF- β).

Hlavním tématem publikací v této disertační práci byla úloha endoglinu (pomocného TGF- β receptoru III) a jeho solubilní formy v endotelové dysfunkci u vybraných myších modelů. Zvýšená exprese endoglinu a změny hladin solubilního endoglinu byly prokázány u

mnoha kardiovaskulárních onemocnění jako je ateroskleróza, hypertenze, diabetes mellitus II a preeklampsie.

U ApoE deficientních myší jsme prokázali, že endoglin v aterosklerotických plátech cévního endotelu není exprimován společně s adhezními molekulami (ICAM-1 a P-selektin) a pravděpodobně se tak nepodílí na akumulaci leukocytů a jejich prostupu přes endotel v průběhu aterogeneze.

U myší s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu v plazmě (Sol-Eng⁺) na standardní dietě se nám nepodařilo prokázat endotelovou dysfunkci v aortě. V další studii však podání vysokotukové diety vedlo u stejných myší k aktivaci pro-zánětlivých ukazatelů (ICAM-1, P-selektin, COX-1 a pNFκB) a ukazatelů oxidačního stresu (NOX-1, NOX-2 a HO-1). Vazodilatační odpověď aorty závislá na oxidu dusnatém byla poškozena u skupiny s nízkými hladinami solubilního endoglinu v plazmě a u skupiny s vysokou hladinou solubilního endoglinu byla zachována. Tato data ukazují, že vysoké hladiny solubilního endoglinu v kombinaci s cholesterolovou dietou vedou k aktivaci zánětlivých a oxidačních ukazatelů a stejně tak k aktivaci vasoprotektivních mechanismů.

Úlohu solubilního endoglinu v endotelové dysfunkci a jeho vztah k hypercholesterolémii jsme diskutovali v přehledovém článku. Prokázali jsme pozitivní korelaci u C57BL/6J myší, apoE deficientních myší krmených standardní dietou, u apoE deficientních a apoE/LDLR deficientních myší krmených cholesterolovou dietou. Nejvyšší hladina solubilního endoglinu byla pozorována u apoE/LDLR deficientních myší krmených cholesterolovou dietou, tedy u skupiny s největší progresí aterosklerózy. V této studii jsme zároveň shrnuli současné poznatky o solubilním endoglinu a jeho vztahu k endotelové dysfunkci a aterogenezi. Přepokládáme, že solubilní endoglin je zajímavým ukazatelem progresu a léčby mnoha kardiovaskulárních onemocnění spojených s endotelovou dysfunkcí.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Msc. Katerina Blazickova

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Tissue and soluble endoglin relation to the endothelial dysfunction and possible treatment

Atherosclerosis is a complex inflammatory disease and it represents a major source of morbidity and mortality in the world as a part of cardiovascular diseases. Endothelial dysfunction represents the first step in the development of atherosclerosis and it is characterized by disruption of endothelial homeostasis. Statins are drugs of choice in the treatment of atherosclerosis and they can decrease LDL cholesterol levels and positively affect levels of HDL cholesterol. Statins, however have a wide range of other effects, which are referred to non-lipid or pleotropic effects. The most important non-lipid effects of statins are lipid-independent modulation of endothelial function, antioxidant, anti-inflammatory, antithrombogenic and antiproliferative effects.

The most widely used animal model for the study of atherosclerosis is the mouse model. Thanks to a high fat diet and genetic modification, we are able to modify lipid profile in mice and induce atherosclerotic changes even at early age of mice. During the process of atherogenesis in the arteries, pathological changes occur on the immunological, morphological and functional levels. Signaling pathway of transforming growth factor beta (TGF- β) plays an important role during these processes.

The publications presented in this thesis mainly focus on the role of endoglin (auxiliary TGF- β receptor III) and its soluble form in endothelial dysfunction in selected mouse models.

Changes of endoglin expression and increased levels of soluble endoglin were demonstrated in many cardiovascular diseases including atherosclerosis, hypertension, type II diabetes mellitus and preeclampsia.

We have demonstrated that endoglin is not expressed with adhesion molecules (ICAM-1, P-selectin) in aortic endothelium of atherosclerotic plaques in apoE deficient mice during atherogenesis and thus endoglin is probably not involved in the accumulation and transmigration of leukocytes during atherogenesis.

We could not demonstrate endothelial dysfunction in the aorta of mice with high levels of human soluble endoglin (Sol-Eng⁺) in plasma on chow diet. Administration of high fat diet to these mice resulted in activation of pro-inflammatory markers (ICAM-1, P-selectin, COX-1 and pNFκB) and induced oxidative stress (NOX-1, NOX-2 and HO-1) in aorta. The endothelium-dependent vasodilatation of aorta was more impaired in the group with low levels of soluble endoglin in plasma and preserved in group with high levels of soluble endoglin in plasma. These results suggest that high concentrations of soluble endoglin in plasma induce the activation of pro-inflammatory, pro-oxidative as well as vasoprotective mechanisms in the vessel wall. The role of soluble endoglin in endothelial dysfunction and its relationship with hypercholesterolemia were discussed in our review article. We have demonstrated a positive correlation of soluble endoglin and hypercholesterolemia in C57BL/6J mice, apoE deficient mice on chow diet, apoE deficient and apoE/LDLR deficient mice on cholesterol diet. The highest levels of soluble endoglin were observed in apoE/LDLR deficient mice fed cholesterol diet – the group with the highest progression of atherosclerosis. In this study, we also summarized current knowledge of soluble endoglin and its relation to endothelial dysfunction and atherogenesis. We suggest that soluble endoglin represents an interesting biomarker of progression and treatment of many cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALK	receptor activin-like kinázy
AMK	aminokyselina
ATV	atorvastatin
BAEC	hovězí aortální buňky
BMP	kostní morfogenetické proteiny
CO	oxid uhelnatý
EDHF	hyperpolarizační faktoru odvozený od endotelu
ENG	endoglin
eNOS	endotelová NO syntáza
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem
ET-1	endotelin 1
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor 1
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
HO-1	hemoxygenáza 1
Hsp 90	heat shock protein 90
HUVEC	lidské endotelové buňky z pupečnickové žíly
ICAM	intercellular cell adhesion molecule, intercelulární adhezní molekula
KLF6	Kruppel-like faktor 6
MAP	mitogenem aktivována proteinkináza
MMP-14	membránově vázaná metaloproteináza 14
NO	oxid dusnatý
PECAM-1	platelet endothelial cellular adhesion molecule 1, destičková endotelová adhezní molekula
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxizomů
ROS	reaktivní kyslíkový radikál
sENG	solubilní endoglin
SOD-3	superoxid dismutáza 3

SP1	specifický protein 1
TGF- β	transformující růstový faktor β
TGF- β RI	receptor I transformujícího růstového faktoru β
TGF- β RII	receptor II transformujícího růstového faktoru β
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, buněčná adhezí molekula

Obsah

1.	Úvod.....	12
2.	Teoretická část.....	14
2.1	Morfologické změny během aterogenního procesu	14
2.2	Endotelová dysfunkce.....	16
2.2.1	Význam buněčných adhezních molekul ve vztahu k endotelové dysfunkci.....	16
2.2.2	Význam eNOS a NO v patogenezi endotelové dysfunkce	19
2.3	TGF-β signální kaskáda	21
2.3.1	TGF- β cytokin.....	21
2.3.2	TGF- β 1 cytokin a jeho vztah k ateroskleróze	23
2.3.3	TGF- β receptor I a jeho vztah k ateroskleróze.....	24
2.3.4	TGF- β receptor II a jeho vztah k ateroskleróze	26
2.4	Tkáňový endoglin	28
2.4.1	Struktura tkáňového endoglinu	28
2.4.2	Exprese tkáňového endoglinu u lidí a zvířat a jeho funkce	28
2.4.3	Tkáňový endoglin a jeho vztah k endotelové dysfunkci a ateroskleróze.....	29
2.4.3	Tkáňový endoglin a statiny	30
2.5.	Solubilní endoglin	32
2.5.1	Vznik solubilního endoglinu a jeho struktura.....	32
2.5.2	Vztah solubilního endoglinu k hypercholesterolémii a endotelové dysfunkci	32
2.5.2	Solubilního endoglinu a endotelová dysfunkce v různých částech cévního řečiště ..	34
2.5.3	Solubilní endoglin a jeho vztah k TGF- β signalizaci.....	34
2.6.	Myší modely pro studium endotelové dysfunkce a aterosklerózy.....	36
2.6.1	Normocholesterolemické myší modely	36
2.6.2	Apolipoprotein E deficientní myší model.....	36
2.6.3	Apolipoprotein E – LDL receptor deficientní myší model	37

2.7. Myší modely pro studium vlivu endoglinu ve vztahu k endotelové dysfunkci...	38
2.7.1 Heterozygotní endoglin deficientní myší model	38
2.7.2 Endoglin conditional knockout myší model	38
2.7.3 Sol-Eng ⁺ transgenní myší model	39
3. Cíle práce.....	41
4. Komentáře k pracím.....	42
4.1. Endoglin is not expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in ApoE-deficient mice	43
4.2. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta	45
4.3. High levels of soluble endoglin induce pro-inflammatory and oxidative stress phenotype associated with preserved NO-dependent vasodilatation in aorta from mice fed high fat diet	46
4.4. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction	48
5. Souhrnná diskuze a shrnutí.....	49
6. Závěry.....	52
7. Podíl předkladatelky na publikovaných pracích zahrnutých v disertační práci.....	54
8. Přehled publikační činnosti	55
9. Prezentace na konferencích	58
10. Použitá literatura	58
11. Seznam příloh.....	66

1. Úvod

Ateroskleróza je podkladem většiny kardiovaskulárních onemocnění, které se stále řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí dnešní doby. Jedná se o komplexní zánětlivé onemocnění, které je ovlivněno řadou rizikových faktorů, jako je věk, pohlaví, hypercholesterolémie, kouření, stres, nadměrná konzumace alkoholu a dieta.

Prvotním dějem v rozvoji aterosklerózy je endotelová dysfunkce, která je charakterizována narušením homeostázy endotelu s vyšší vazokonstrikční a protrombotickou aktivitou. Endotelovou dysfunkci dále charakterizuje snížená produkce oxidu dusnatého (NO), endotelové NO syntázy (eNOS) a vyšší exprese adhezních molekul. Nejčastěji předepisovanými léčivými v terapii aterosklerózy jsou statiny. Jedná se o inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, klíčového enzymu v syntéze cholesterolu. Statiny prokazatelně snižují plazmatické hladiny LDL cholesterolu a riziko infarktu myokardu a cévní mozkové příhody.

Členové signální kaskády transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) hrají klíčovou úlohu v regulaci funkce endotelových buněk. Tkáňový endoglin (ENG) jako součást TGF- β receptorového komplexu má významnou úlohu v rozvoji endotelové dysfunkce a během aterogenního procesu. Zvýšené hladiny jeho solubilní formy (sENG) byly prokázány u pacientů s preeklampií a mnoha kardiovaskulárními onemocněními, jako je hypertenze, ateroskleróza či diabetes mellitus II. sENG by tedy mohl představovat ukazatel progresu a léčby kardiovaskulárních onemocnění spojených s endotelovou dysfunkcí.

Tato disertační práce byla vypracována jako součást dlouhodobého výzkumu aterosklerózy na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod vedením Doc. PharmDr. Petra Nachtigala, Ph.D. Věnuje se především roli

endoglinu a jeho solubilní formy v rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy u různých myších modelů. Práce je koncipována jako komentovaný soubor publikací.

2. Teoretická část

2.1 Morfologické změny během aterogenního procesu

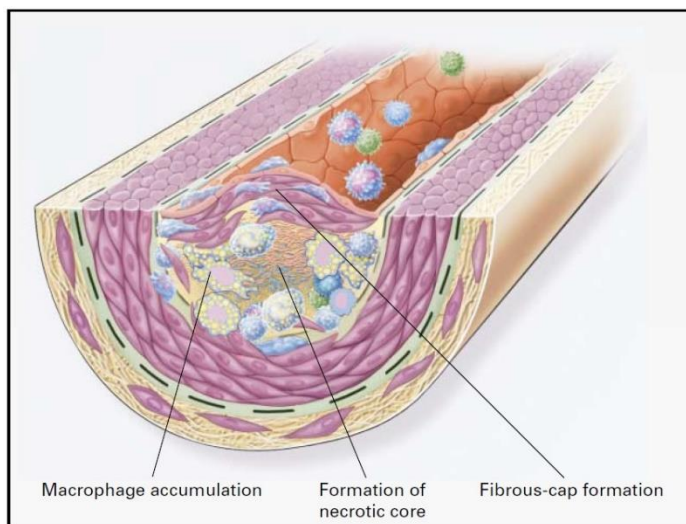
Ateroskleróza je obecně považována za zánětlivé onemocnění, při kterém dochází ke kumulaci lipidů v arteriální stěně, zejména pak LDL cholesterolu [1].

Lumen zdravé arterie vystýlá jedna vrstva těsně přiléhajících endotelových buněk ležících na bazální membráně extracelulární matrix. Endotelové buňky tvoří dynamickou bariéru mezi lumen arterie a stromatem arteriální stěny a podílí se na celé řadě funkcí, včetně krevního srážení, prostupu leukocytů do stěny cévy a regulaci cévního tonu. Narušení této dynamické bariéry může vést k rozvoji endotelové dysfunkce, která je prvotním jevem v rozvoji aterosklerózy [2].

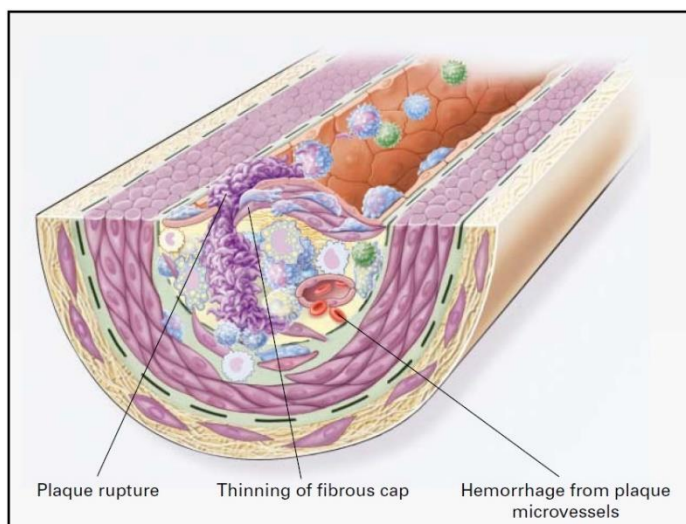
Mezi rizikové faktory vzniku endotelové dysfunkce patří zvýšený a modifikovaný LDL cholesterol, volné radikály vznikající v důsledku kouření, hypertenze, diabetes mellitus zejména II typu, genetické modifikace a infekce způsobené mikroorganismy. Dochází k rozvoji řady kompenzačních mechanismů, které ovlivňují přirozenou homeostázu cévního endotelu. Zvyšuje se přilnavost destiček a leukocytů k endotelu a zároveň jeho propustnost. Antikoagulační charakter endotelu se mění směrem k pro-koagulačnímu [1].

Pro počáteční léze je charakteristické lokální ukládání lipidů v podobě takzvaných lipidových proužků. Tyto proužky jsou reprezentovány ložisky makrofágů v intimě cévy a můžeme je u lidí pozorovat již v útlém věku [2]. Další fází aterosklerotického procesu je tvorba takzvaných fibro-lipidových lézí vznikajících primárně v predispozičních oblastech, jako jsou koronární arterie, břišní aorta a některé úseky karotid u lidí [3]. Jádro léze tvoří tukové látky a nekrotická tkáň. Migrace a proliferace buněk hladké svaloviny vede ke tvorbě fibrózní čepičky (Obr. 1), která tvoří ochrannou vrstvu mezi lumen arterie a lézí [1].

Aterosklerotické pláty lze klasifikovat dle charakteru jádra a fibrózní čepičky. Stabilní aterosklerotický plát je charakterizován malým nekrotickým jádrem a tlustou fibrózní čepičkou. Nestabilní plát je naopak tvořen velkým nekrotickým jádrem a tenkou fibrózní čepičkou, která je náchylná k prasknutí. Následný vznik trombózy je příčinou až poloviny akutních koronárních příhod a infarktů myokardu [4, 5] (Obr. 2).



Obrázek 1: Vznik pokročilé aterosklerotické léze. Fibrózní čepička tvoří ochrannou vrstvu mezi lumen a nekrotickým jádrem léze, kde se hromadí makrofágy a další buněčné elementy [1].



Obrázek 2: Nestabilní aterosklerotický plát. Makrofágy uvolňují proteolytické enzymy, které ztenčují fibrózní čepičku. Ztenčování fibrózní čepičky vede k prasknutí plátu a k následnému vzniku trombózy [1].

2.2 Endotelová dysfunkce

Cévní endotel je považován za aktivní parakrinní, endokrinní a autokrinní orgán, který se podílí na regulaci cévního tonu a udržování cévní homeostázy. Endotelová dysfunkce předchází vzniku aterosklerotických lézí a podílí se na jejich tvorbě zvýšením syntézy adhezních molekul, zvýšenou sekrecí chemokinů a adherencí leukocytů, zvýšenou cévní permeabilitou a oxidací LDL částic, aktivací destiček a proliferací a migrací buněk hladké svaloviny. Endotelovou dysfunkci dále charakterizuje snížená produkce oxidu dusnatého (NO), snížená exprese enzymu endotelové NO syntázy (eNOS) a nerovnováha mezi endotelem produkovanými relaxačními a konstričními faktory [6].

2.2.1 Význam buněčných adhezních molekul ve vztahu k endotelové dysfunkci

Adhezní molekuly zajišťují komunikaci mezi leukocyty a buňkami endotelu a hrají tak důležitou roli v časně fázi aterosklerózy. Některé adhezní molekuly se považují za ukazatele endotelové dysfunkce a za ukazatele kardiovaskulárního rizika [7, 8]. Byly popsány následující skupiny adhezních molekul: selektiny, integriny, imunoglobuliny a kadheriny [9, 10].

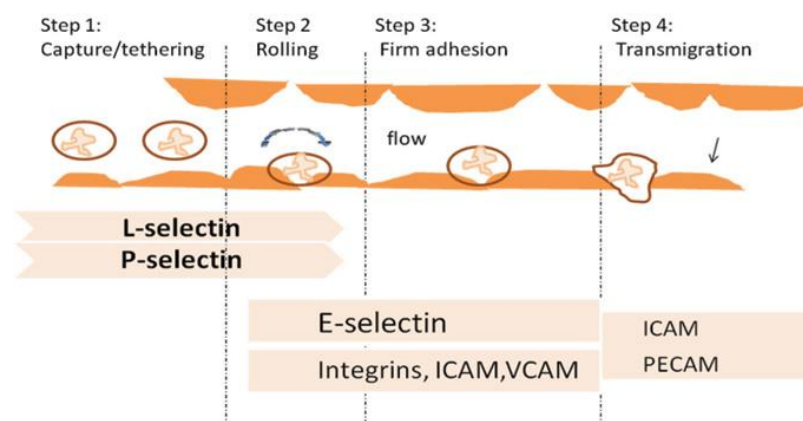
Selektiny jsou zodpovědné za počáteční stádium adheze leukocytů, kdy dochází k takzvanému kutálení leukocytů po endotelu [11] (Obr. 3). Interakcí se svými ligandy vytváří selektiny křehké vazby mezi aktivovanými endotelovými buňkami a leukocyty. Jedná se o glykoproteiny obsahující lektinovou doménu a jejich název je odvozen od místa nejčastější exprese. E-selektin je specifický pro endotelové buňky a zprostředkovává adhezi leukocytů na cévní endotel. P-selektin se nachází v alfa granulích destiček a Weibel-Paladeho tělískách endotelových buněk a je důležitý pro interakci mezi endotelem, aktivovanými destičkami a leukocyty. L-selektin je exprimován na leukocytech konstitučně a zajišťuje vazbu leukocytu na endotel v místě zánětu [9, 12].

Integriny jsou transmembránové glykoproteiny, které vznikají nekovalentní vazbou α řetězce a β řetězce. U buněk v klidovém stádiu mají integriny pouze nízkou afinitu ke svým ligandům. Během aktivace buňky dojde ke změně konformace integrinů a afinita k ligandům se mnohonásobně zvýší. Integriny jsou exprimovány většinou buněk, ale pouze některé hrají roli v endotelové dysfunkci. $\beta 1$ integriny jsou exprimovány hladkými svalovými buňkami a zprostředkovávají jejich vazbu k extracelulární matrix. $\beta 2$ integriny jsou exprimovány pouze v bílých krvinkách a interagují s molekulami z rodiny ICAM (intercellular cell adhesion molecule, intercelulární adhezní molekula) a zprostředkovávají pevnou vazbu těchto molekul na aktivované endotelové buňky. $\beta 3$ integriny jsou exprimovány destičkami. $\alpha 2\beta 3$ integrin, známý také jako (GP) IIb/IIIa, je pro destičky specifický a hraje roli v tvorbě fibrinu. Naproti tomu $\alpha V\beta 3$ je exprimován i jinými buňkami a hraje roli v přežití buňky, migraci a proliferaci. Integriny mají obvykle několik ligandů a tyto ligandy jsou společné pro více integrinů. Patří mezi ně proteiny extracelulární matrix, jako jsou lamininy, kolagen, fibronectin a jiné [9].

Imunoglobuliny jsou membránové glykoproteinové receptory obsahující různý počet extracelulárních Ig domén, které váží ligandy. ICAM-1 je široce exprimován v leukocytech a endotelových buňkách a jeho exprese roste po stimulaci pro-zánětlivými cytokiny. ICAM-2 je exprimován v leukocytech, destičkách a endotelových buňkách. Po stimulaci prozánětlivými cytokiny se jeho exprese snižuje. ICAM-3 byl detekován v endotelových buňkách a leukocytech a jako jediný je exprimován i v neutrofilech. ICAM-4 a ICAM-5 jsou exprimovány v erytroidních buňkách a v mozku. PECAM-1 (platelet endothelial cellular adhesion molecule 1, destičková endotelová adhezní molekula) je dalším členem rodiny imunoglobulinů a je exprimován leukocyty, destičkami a endotelovými buňkami. PECAM-1 byl detekován zejména v mezibuněčných spojích mezi endotelovými buňkami, účastní se prostupu buněk přes endotel a zajišťuje jeho integritu (Obr. 3) [13]. PECAM-1 podporuje funkci endotelu jako bariéry.

Během zánětu je funkce PECAM-1 narušena a zvyšuje se adheze neutrofilů a leukocytů k endotelovým buňkám, snižuje se cévní integrita a zvyšuje se prostup leukocytů přes endotel [14]. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1, buněčná adhezní molekula) je transkripčně indukován v endotelových buňkách, může však být exprimován i makrofágy, myoblasty a dendritickými buňkami [9]. VCAM-1 se účastní shlukování destiček tím, že poskytuje pevnou vazbu mezi destičkami a aktivovaným endotelem (Obr. 3). Zároveň umožňuje migraci leukocytů přes endotel [15]. Bylo prokázáno, že VCAM-1 je silně exprimován v cévách náchylných k ateroskleróze a během aterogeneze hraje významnou roli [16].

Kadheriny jsou transmembránové glykoproteiny, které tvoří adherentní mezibuněčné spoje nazývané zonula adherens [10]. Ve vztahu k endotelové dysfunkci mají největší význam epiteliální E-kadherin a vaskulární-endotelový VE-kadherin. E-kadherin byl detekován na pěnových buňkách v lidských aterosklerotických lézích a zdá se, že se podílí na jejich agregaci a na formování lipidového jádra. VE-kadherin byl rovněž detekován v lidských aterosklerotických lézích, kde se podílí na neovaskularizaci kapilár, které jsou důležité pro rozvoj lokální zánětlivé reakce [17]. VE-kadherin je nezbytný pro normální vaskulogenezi, neoangiogenezi a hraje důležitou roli při udržení endotelové integrity a permeability [18].



Obrázek 3: Adheze leukocytů a jejich prostup přes endotelovou vrstvu. Nejprve je leukocyt zachycen pomocí adhezních molekul L a P-selektinu a následně se leukocyt kutálí po endotelu. E-selektin, integriny, ICAM a VCAM zajišťují pevnou vazbu leukocytu k endotelu a PECAM zajišťuje jeho prostup mezi endotelovými buňkami [19].

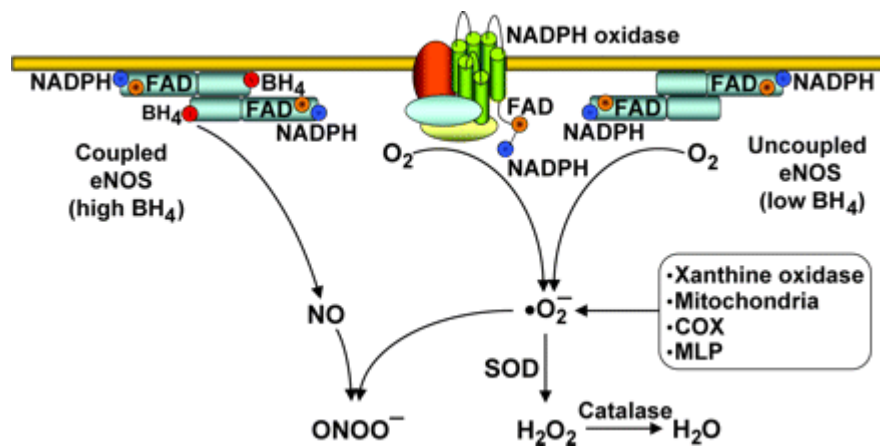
2.2.2 Význam eNOS a NO v patogenezi endotelové dysfunkce

NO je hlavním vazodilatačním mediátorem produkovaným endotelovými buňkami. Je syntetizován z L-argininu za pomoci eNOS v přítomnosti kofaktorů, zejména tetrahydrobiopterinu (BH₄) [20, 21]. NO difunduje k buňkám hladké svaloviny, kde aktivuje guanylátcyklázu. Guanylátcykláza je enzym katalyzující tvorbu cyklického guanosylmonofosfátu (cGMP), který je zodpovědný za vazodilataci. Ve zdravých cévách hraje NO klíčovou roli v udržování cévy v klidovém stavu inhibicí buněčné proliferace, trombózy a zánětu. Pomocí s-nitrosylace cysteinových zbytků nejrůznějších proteinů snižuje NO jejich biologickou aktivitu [22].

Za fyziologických podmínek je eNOS aktivován smykovým napětím. Tento enzym může být dále aktivován signálními molekulami, jako je bradykinin, adenosin, vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a serotonin, který je uvolňován během shlukování destiček [23]. Vazodilatace může být navozena i zvýšenou vodivostí draselných kanálů, která vede k hyperpolarizaci hladkých svalových buněk za pomoci hyperpolarizačního faktoru odvozeného od endotelu (EDHF). EDHF tak může kompenzovat pokles vazodilatace při snížené biodostupnosti NO, zejména pak v mikrocirkulaci [24]. Další vazoaktivní látkou, na NO nezávislou, je endotelem produkovaný prostacyklin. Jeho vliv na vazodilataci však není tak významný [21].

Za určitých okolností (např. vyčerpání kapacity antioxidantních enzymů) může zvýšená produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) přispívat k endotelové dysfunkci aktivací endotelu. Důležitým zdrojem ROS jsou mitochondrie. Během oxidační fosforylace je produkce ROS ve vzájemné rovnováze s produkcí superoxid dismutázy 3 (SOD-3) – enzymu, který superoxidový radikál přeměňuje na méně toxický peroxid vodíku [25]. Tato rovnováha může být narušena při hypoxii a u onemocnění spojených s obezitou, jako je diabetes mellitus II, který je charakterizován hyperglykemií a zvýšenou cirkulací volných mastných kyselin [26].

Superoxidový anion (ROS produkovaný endotelem a hladkými svalovými buňkami) může reagovat s NO za tvorby peroxynitritu, který dále oxiduje BH₄, což vede k tzv. rozpojení eNOS (uncoupling), produkci superoxidového aniontu a snížené biodostupnosti NO [27, 28]. Interakce mezi ROS a NO tak tvoří začarovaný kruh, který vede k aktivaci endotelu a zánětu. Vztah mezi kyslíkovými radikály, NO a endotelovou dysfunkcí schematicky zachycuje následující obrázek 4.



Obrázek 4: Schéma vztahu mezi superoxidovým radikálem a biodostupností NO. Oxidace BH₄ vede k tzv. rozpojení eNOS (uncoupling), což vede k produkci dalších kyslíkových radikálů a snížené biodostupnosti NO. Superoxid dismutáza (SOD) převádí superoxidový radikál na méně toxický peroxid vodíku.

2.3 TGF- β signalizační kaskáda

2.3.1 TGF- β cytokin

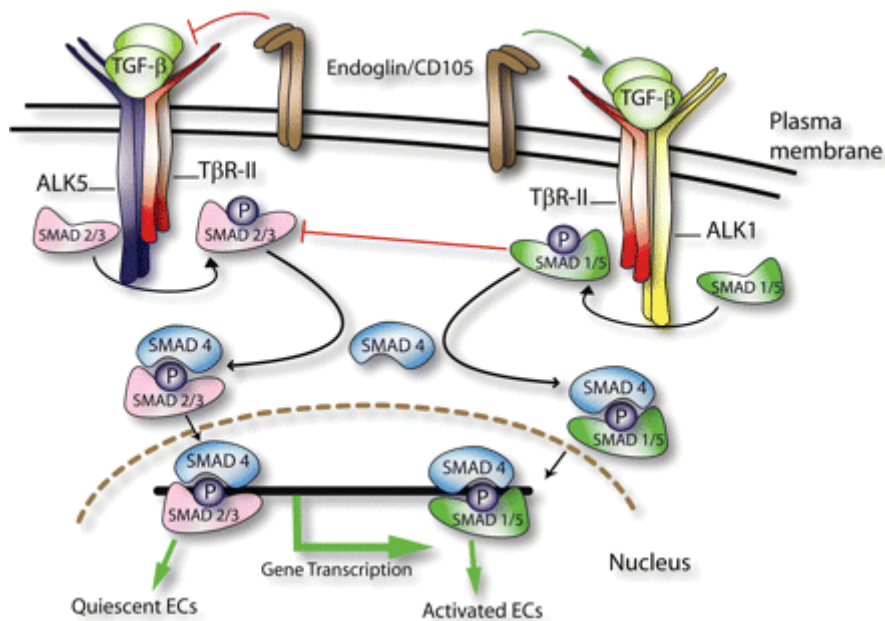
TGF- β je označení pro rodinu multifunkčních cytokinů, které jsou zapojeny do procesů diferenciace, proliferace, migrace a přežívání různých typů buněk [29]. TGF- β cytokiny jsou exprimovány zejména endotelovými buňkami, hladkými svalovými buňkami, lymfocyty a makrofágy. Hrají klíčovou roli během vývoje cévního systému a embryogeneze. Během angiogeneze TGF- β aktivuje mezenchymové buňky a podporuje jejich transformaci v hladké svalové buňky vytvářející novou cévní stěnu [30]. Významně ovlivňují i proces aterosklerózy a restenózy [31].

U savců jsou známy tři různé isoformy – TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3. Do této rodiny však patří i activiny/inhibiny, kostní morfogenetické proteiny (BMP) a růstové faktory pro diferenciaci. TGF- β cytokiny jsou vytvářeny jako neaktivní dimerní prekurzory, které musí být nejprve rozštěpeny proteázami, aby se mohly vázat ke stejnojmenným receptorům. BMP proteiny jsou vylučovány v aktivní formě.

Vazba TGF- β cytokinů na transmembránový TGF- β receptor I (TGF- β RI) a TGF- β receptor II (TGF- β RII) vede k aktivaci transkripčních faktorů, tzv. Smad proteinů. U savců bylo popsáno pět typů receptoru II a sedm typů receptoru I, také nazývaných receptor activin-like kinázy (ALK). Dále jsou známy dva pomocné receptory – ENG a betaglykan [32]. TGF- β 1 a TGF- β 3 se mohou vázat na receptor typu II přímo, kdežto TGF- β 2 vyžaduje přítomnost pomocného receptoru (betaglykanu nebo ENG) [33]. Po navázání TGF- β cytokinu receptor typu II fosforyluje receptor typu I, který následně fosforyluje Smad proteiny.

Transkripční Smad proteiny dělíme do tří skupin: regulační (Smad 1, 2, 3, 5, 8), mediátorové (Smad 4) a inhibiční (Smad 6, 7). Aktivované regulující Smad proteiny vytvářejí komplex se Smad 4, který se přesouvá do jádra buňky a reguluje expresi příslušných genů.

Inhibující Smad proteiny soutěží s regulujícími Smad proteiny o vazbu na receptor a podněcují jejich degradaci či defosforylaci [34]. Existují i další aktivační cesty pro TGF- β nezahrnující Smad proteiny. Patří mezi ně fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K), kináza regulovaná extracelulárním signálem (ERK), mitogenem aktivována proteinkináza (MAP) p38 a jiné. TGF- β signalizaci shrnuje obrázek 5.



Obrázek 5: Schéma TGF- β signální dráhy v endotelových buňkách. TGF- β může aktivovat dva typy receptoru I a jejich signální dráhy s opačným efektem – ALK-5 s následnou fosforylací Smad 2/3 nebo ALK-1 s následnou fosforylací Smad 1/5. Fosforylované Smad proteiny tvoří komplex se Smad 4, který v jádře endotelové buňky působí jako transkripční faktor a reguluje transkripci příslušných genů. Endoglin (CD105) plní v celé signalizaci roli pomocného receptoru [35].

2.3.2 TGF- β 1 cytokin a jeho vztah k ateroskleróze

TGF- β 1, první popsáný cytokin z této rodiny, se nachází ve vysokých koncentracích v cévní stěně. Isoformy TGF- β 2 a TGF- β 3 se v cévní stěně nevyskytují vůbec nebo pouze v nízkých koncentracích [36]. TGF- β 1 hraje důležitou roli během novotvorby cév a jejich remodelace. Dále hraje klíčovou roli v ateroskleróze a restenóze, reguluje endotelové buňky, hladké svalové buňky, makrofágy, T-lymfocyty a pravděpodobně i kalcifikaci cév [31].

Role TGF- β 1 v ateroskleróze je poněkud kontroverzní. Některé studie poukazují na jeho antiaterogenní vliv. Inhibice TGF- β 1 aktivity vedla k aterogenním změnám v cévní stěně u myších modelů aterosklerózy [37]. Delece jedné alely genu pro TGF- β 1, která způsobila snížení exprese tohoto proteinu o 50 %, vedla ke snížené diferenciaci hladkých svalových buněk, zvýšené aktivaci endotelových buněk a formaci lipidových lézí po podání diety bohaté na tuky [38]. Léčba s neutralizační anti-TGF- β 1 protilátkou navíc vedla k masivnějšímu zánětu v cévní stěně, rychlejší formaci lipidových lézí a k tvorbě nestabilního plátu [39]. Navíc bylo prokázáno, že TGF- β 1 zvyšuje expresi eNOS mRNA u hovězích aortálních buněk (BAEC) a u lidských endotelových buněk z pupečnickové žíly (HUVEC), což naznačuje protektivní roli tohoto cytokinu v cévním endotelu. TGF- β 1 také zvyšuje vychytávání cholesterolu makrofágy [40] a inhibuje expresi lipoproteinové lipázy [41].

Na druhou stranu existuje řada studií, které naznačují možný aterogenní vliv tohoto cytokinu. Zvýšené hladiny TGF- β 1 byly nalezeny v lézích cévní stěny [42, 43]. TGF- β 1 je možným stimulatorem biosyntézy proteoglykanu v lidských hladkých svalových buňkách. Syntéza proteoglykanů, které vychytávají lipoproteiny, může vést k jejich akumulaci v cévní stěně [44] a jejich následné chemické modifikaci [45]. Navíc TGF- β 1 stimuluje chemotaxi leukocytů, což může přispívat k časně migraci makrofágů a akumulaci lipidů [42]. Protilátky proti TGF- β 1 utlumily hyperplazii intimy u potkanů [46]. Podobně zvýšená exprese TGF- β 1 v nepoškozených cévách u potkanů vedla k vytvoření neointimy s vyšším obsahem

extracelulární matrix [47]. Všechna tato data naznačují, že by TGF- β 1 mohl mít vliv na rozvoj aterosklerózy. Zároveň však TGF- β 1 podporuje stabilitu plátu, a tím předchází akutním ischemickým stavům, jako je infarkt myokardu.

2.3.3 TGF- β receptor I a jeho vztah k ateroskleróze

Jak bylo zmíněné dříve, v savcích buňkách bylo popsáno 7 typů receptoru I (ALK-1 až ALK-7) [48, 49]. V endotelových buňkách je TGF- β 1 cytokin, po vazbě na TGF- β RII, schopen aktivovat dva různé typy receptoru I, konkrétně ALK-5 a pro endotel specifický ALK-1 [36].

U většiny typů buněk vazba TGF- β cytokinu na ALK-5 aktivuje jaderné Smad 2 a Smad 3 proteiny [50]. U endotelových buněk a buněk mesenchymu se TGF- β cytokin váže na ALK-1, což vede k fosforylaci Smad 1, Smad 5 a Smad 8 proteinů, jak už bylo uvedeno výše (Obr. 5).

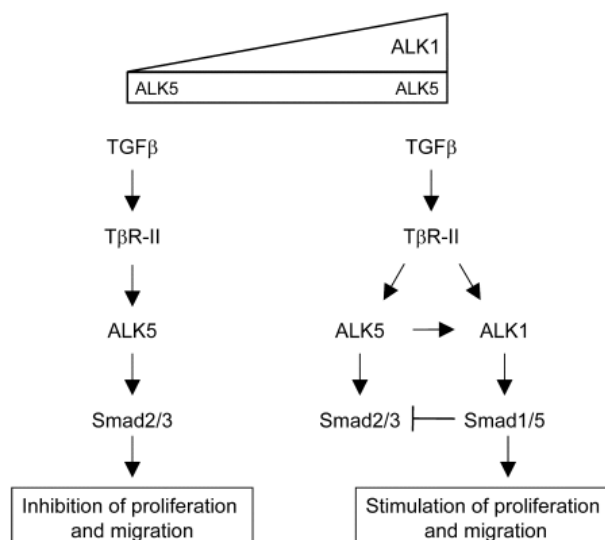
Aktivace TGF- β /ALK-1 signalizace se podílí na stimulaci proliferace a migrace endotelových buněk [51], zatímco TGF- β /ALK-5 tyto procesy tlumí [52]. Studie signalizačních mechanismů mezi oběma receptory však naznačují, že mezi ALK-1 a ALK-5 existuje určitá forma interakce a vzájemného přepínání [31]. ALK-5 deficientní endotelové buňky nemají narušenou jen TGF- β /ALK-5 signalizaci, ale i TGF- β /ALK-1 signalizaci. Dále bylo prokázáno, že kinázová aktivita ALK-5 je nezbytná pro aktivaci ALK-1. ALK-5 je také důležitý pro vazbu ALK-1 na TGF- β receptorový komplex. ALK-1 a ALK-5 mají opačné účinky na chování endotelových buněk, působí jako antagonisté na úrovni Smad proteinů, tj. na úrovni transkripce [53].

Bylo prokázáno, že ALK-1 je minimálně exprimován v lidských koronárních arteriích, které nejsou postiženy aterosklerózou. Naopak v aterosklerotických lézích byla jeho exprese zvýšena. Exprese byla pozorována v neointimě, endotelu koronárních arterií a v místech, kde

probíhala neoangiogeneze [54]. Autoři se domnívají, že ALK-1 signalizace v endotelu hraje důležitou roli při vzniku aterosklerotické léze. Navíc může ALK-1 v aterosklerotických lézích přispívat k regulaci proliferace a diferenciaci hladkých svalových buněk [54]. Další studie prokázala, že ALK-1 může stimulovat expresi VEGF v endotelových buňkách [55], což naznačuje protektivní efekt na cévní endotel při rozvoji endotelové dysfunkce [56]. Zvýšená exprese ALK-1 byla pozorována spolu se sníženou velikostí plátů u apoE/LDLR deficientních myší po léčbě atorvastatinem [57]. Zároveň byla pozorována snížená exprese ALK-1 u těchto myší po podání cholesterolové diety [58].

ALK-5 je pouze slabě exprimován v intimě zdravých lidských cév. Vysoká exprese ALK-5 byla pozorována jak u lipidových proužků, tak ve fibro-lipidových lézích. U fibrózních plátů byla exprese ALK-5 naopak snížena [59], což naznačuje, že ALK-5 podporuje TGF- β 1 aktivitu během zadržování lipoproteinů a aktivace proteolytického systému u makrofágů a zároveň omezení proliferace hladkých svalových buněk v lipidových lézích [59]. Na druhou stranu, ALK-5 signální dráha hraje významnou roli při udržení endotelu v klidovém stádiu inhibicí proliferace endotelových buněk a angiogeneze [60].

Výsledný efekt TGF- β cytokinu na endotelové buňky je pravděpodobně dán poměrem mezi expresí ALK-1 a ALK-5. Vyšší exprese ALK-1 vede ke stimulaci proliferace a migrace endotelových buněk, naopak vyšší exprese ALK-5 tyto procesy inhibuje a udržuje tak endotel v klidovém stádiu [53] (Obr. 6).



Obrázek 6: Schéma účinků ALK-5 a ALK-1 na endotelové buňky. Vyšší exprese ALK-1 vede ke stimulaci proliferace a migrace. Vyšší exprese ALK-5 tyto procesy inhibuje [53].

2.3.4 TGF-β receptor II a jeho vztah k ateroskleróze

TGF-βRII reaguje s různými typy TGF-βRI, včetně ALK-1 a ALK-5. Některé studie se však zaměřují na samostatný TGF-βRII a jeho roli v ateroskleróze.

Vysoká exprese TGF-βRII byla pozorována ve většině buněk zdravých cév v intimě a médiu. Snížená exprese byla pozorována u fibrózních plátů. Tato data naznačují silnou aktivitu TGF-β1/TGF-βRII komplexu v lipidových prouzcích a fibro-lipidových lézích. Zvýšená exprese TGF-βRII byla také pozorována v lidských aterosklerotických lézích (zejména v intimě, hladkých svalových buňkách, makrofázích a endotelových buňkách) v porovnání se zdravými cévami [61].

Mutace TGF-βRII u lidí vedla k narušené TGF-β signalizaci, což způsobilo rezistenci k apoptóze, která je rovněž spojována s progresí aterosklerózy [62, 63]. Hladké svalové buňky v aterosklerotických lézích mají sníženou expresi TGF-βRII bez výrazné změny exprese TGF-βRI v porovnání se zdravými cévami. Rovněž bylo popsáno, že v plátech lidských cév je exprese TGF-βRII mnohem variabilnější, oproti relativně konstantní expresi TGF-βRI. Navíc,

exprese TGF- β RII často zcela chybí v lézích koronárních a karotických arterií. Transfekce TGF- β RII do takto postižených buněk pak dokáže částečně odpověď na TGF- β cytokin obnovit, což naznačuje, že signalizace jinak zůstává nenarušena [63]. Tato data poukazují na možnou protektivní roli TGF- β RII v ateroskleróze, jeho přesná úloha však dosud není objasněna.

2.4 Tkáňový endoglin

2.4.1 Struktura tkáňového endoglinu

Endoglin (CD105, TGF- β receptor III, ENG) je transmembránový homodimerní glykoprotein tvořený dvěma 95 kDa podjednotkami spojenými disulfidickou vazbou [64, 65]. Rozlišujeme extracelulární doménu tvořenou 561 aminokyselinami (AMK), transmembránovou doménu tvořenou 25 AMK a intracelulární doménou tvořenou 47 AMK, která již není součástí signalizační dráhy [66].

Rozlišujeme dvě isoformy ENG – predominantní L-isoformu a minoritní S-isoformu. Tyto isoformy se od sebe liší v aminokyselinové sekvenci svých cytosolických domén. U L-isoformy je doména tvořena 47 AMK, u S-isoformy pouze 14 AMK [67]. Obě isoformy se vzájemně liší na úrovni fosforylace [68] a ve schopnosti regulace TGF- β signalizace [69].

2.4.2 Exprese tkáňového endoglinu u lidí a zvířat a jeho funkce

Exprese ENG je omezena především na buňky cévní stěny, jako jsou endotelové buňky, monocyty, makrofágy a různé mesenchymální buňky, včetně fibroblastů a hladkých svalových buněk [70]. Exprese ENG se v cévách zvyšuje během různých patologických stavů, jako je hypoxie nebo poškození cévy. Zvýšená exprese ENG navozená hypoxií se projevuje současnou stimulací a formací transkripčního komplexu, zahrnujícího Smad 3/Smad 4, specifický protein 1 (SP1) a hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF-1) [71]. Bylo prokázáno, že vzájemná interakce mezi transkripčními faktory SP1 a Kruppel-like faktorem 6 (KLF6) je nezbytná pro transkripci endoglinu během poškození cévy [72]. Exprese KLF6 se zvyšuje po poškození cévy, zatímco SP1 je exprimován ve zdravé tkáni, kde je nezbytný pro bazální expresi ENG [73]. Exprese ENG může být rovněž stimulována pomocí TGF- β signalizační dráhy a Smad transkripčních faktorů [69]. Naopak tumor nekrotizující faktor α (TNF α) snižuje expresi ENG v endotelových buňkách [74].

Obecně je exprese ENG spojována s vývojem kardiovaskulárního systému, vývojem cévního řečiště, angiogenezí a cévní homeostázou [75].

ENG je nezbytný pro vývoj hladkých svalových buněk. Ukázalo se, že ENG deficientní myši homozygoti umírají již během intrauterinního vývoje. Abnormální vývoj hladkých svalových buněk vede k závažným defektům při angiogenezi a vývoji kardiovaskulárního systému [76]. Exprese ENG v hladkých svalových buňkách také hraje důležitou roli v regulaci inhibice migrace navozené TGF- β [77].

2.4.3 Tkáňový endoglin a jeho vztah k endotelové dysfunkci a ateroskleróze

Exprese ENG v endotelových buňkách, hladkých svalových buňkách a makrofázích naznačuje jeho možnou roli v aterogenezi. Ve zdravých cévách je exprese ENG v endotelových a hladkých svalových buňkách velmi slabá. Silnější exprese ENG a jeho koexprese s TGF- β RI a TGF- β RII byla pozorována v aterosklerotických lézích lidské aorty. Vyšší exprese ENG byla pozorována v makrofázích, hladkých svalových buňkách a endotelových buňkách u počínajících lézí, v porovnání s pokročilejšími lézemi [61].

V endotelových buňkách hraje ENG roli především jako stimulátor proliferace [78] a může ovlivňovat expresi eNOS. Pokles exprese eNOS byl pozorován u heterozygotních ENG deficientních myši, což vedlo k narušené vazodilataci závislé na endotelu. Navíc NO produkovaný pomocí eNOS hraje pravděpodobně klíčovou roli v angiogenezi, která je na ENG závislá [79]. ENG je také nezbytný pro eNOS aktivační komplex, stabilizuje eNOS protein a napomáhá asociaci eNOS s heat shock proteinem 90 (Hsp90), což naznačuje důležitou roli ENG ve správné funkci endotelu a regulaci cévního tonu [80]. ENG zvyšuje hladinu Smad 2 a zároveň jeho fosforylaci a stabilizaci, což vede ke zvýšení exprese eNOS v endotelových buňkách. Studie na myších modelech aterosklerózy prokázaly silnou koexpresi ENG a eNOS v cévním endotelu pokrývajícím aterosklerotické pláty [81]. Všechny tyto studie poukazují na

silnou vazbu mezi ENG a eNOS a na možný protektivní vliv ENG během rozvoje endotelové dysfunkce.

2.4.3 Tkáňový endoglin a statiny

Statiny jsou široce používanými léčivy v terapii hypercholesterolemie. Jedná se o inhibitory HMG-CoA reductázy, klíčového enzymu v syntéze cholesterolu. Díky inhibici endogenní syntézy cholesterolu dochází ke zvýšené expresi LDL receptorů a zvýšenému vychytávání LDL částic v játrech [82, 83]. Statiny dále inhibují syntézu apolipoproteinu B-100 v hepatocytech a snižují tak produkci a sekreci lipoproteinů bohatých na triglyceridy [84].

Obecně jde o látky dobře tolerované a bezpečné [85]. Klinické studie prokázaly, že statiny snižují relativní riziko koronární příhody a přináší prospěch pro pacienty s vysokým rizikem komplikací u ischemické choroby srdeční. Hlavním nežádoucím účinkem statinů je toxické působení na játra a svaly, tzv. rhabdomyolýza. Výskyt těchto nežádoucích účinků je však vzácný a souvisí s dávkou statinů a je ovlivněn i dalšími lékovými interakcemi [84].

Kromě účinků na plazmatické proteiny byly u této skupiny léčiv prokázány tzv. pleiotropní účinky, které jsou na hladinách cholesterolu nezávislé. Mezi nejdůležitější nelipidové účinky statinů bývá řazena na lipidech nezávislá modulace endotelové funkce, dále antioxidační, antiinflamatorní, antitrombogenní a antiproliferační účinky. Statiny blokují syntézu L-mevalonátu, což vede ke snížené tvorbě cholesterolu a zároveň i signálních molekul, které jsou klíčové u zánětlivých a imunitních dějů. Největší význam má zřejmě působení statinů na Rho/Rho kinázy (enzym vápníkové senzitivace v buňkách hladké svaloviny cév), kde díky inhibici syntézy mevalonátu nedochází k posttranslační modifikaci pomocí isoprenylace, která je důležitým krokem pro aktivaci těchto proteinů. Významné je i ovlivnění Rac (G-protein důležitý pro remodelaci cytoskeletonu a produkci ROS) a aktivace receptorů aktivovaných

proliferátory peroxizomů (PPAR), jaderných receptorů s řadou významných metabolických účinků [82, 86, 87].

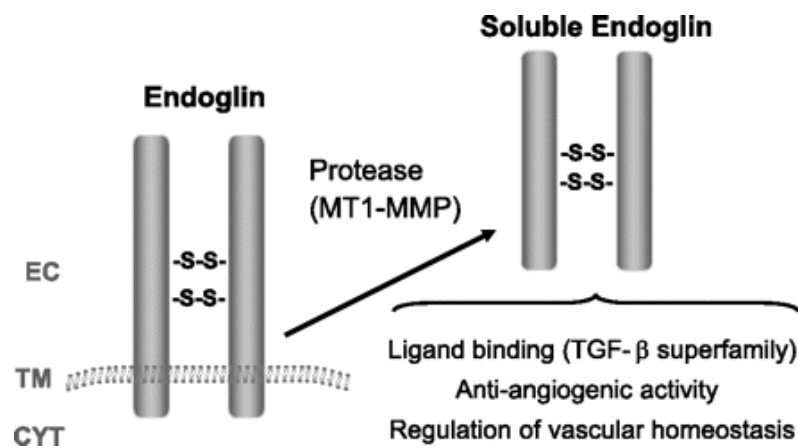
Statiny jsou schopné svými nelipidovými účinky ovlivňovat cévní endotel a stimulovat produkci eNOS [88]. Zvýšený LDL cholesterol vede ke zvýšení exprese proteinu kaveolin 1, který vytváří komplex s eNOS a tím inhibuje uvolňování NO. Atorvastatin (ATV) je schopný expresi tohoto proteinu snižovat a tím zlepšovat endotelovou dysfunkci [89]. Statiny dále mohou zvyšovat aktivitu eNOS prostřednictvím aktivace PI3-kinázy a Akt signalizace interakcí s Hsp90 proteinem, což vede k fosforylaci eNOS na Ser1177 a jeho aktivaci [90, 91]. Statiny snižují expresi adhezních molekul [92], což opět vede ke zlepšení endotelové dysfunkce.

Důležitým regulačním proteinem pro účinek statinů na cévní endotel je tkáňový ENG. Podání ATV společně s cholesterolovou dietou u apoE/LDLR deficientního myšního modelu vedlo k signifikantnímu snížení celkového, VLDL i LDL cholesterolu, redukci hladin sENG a výraznému zmenšení velikosti plátů. Současně vedlo podávání ATV k nárůstu exprese tkáňového ENG, ALK-1, p-Smad 1 a VEGF oproti skupině bez statinů [57]. V navazující studii byla prokázána aktivace ateroprotektivní ENG/ALK-5/Smad 2/eNOS signalizační kaskády za současného snížení velikosti plátů. Současně byla prokázána koexprese těchto protektivních markerů s ENG [81]. Další studie prokázala, že ATV zabraňuje poklesu exprese ENG a eNOS u endotelových buněk vystavených zánětu. Zvýšená exprese eNOS po podání ATV je navíc u těchto buněk závislá na expresi ENG [93]. Výsledky těchto studií dokazují, že ENG hraje důležitou regulační roli během působení statinů v cévním endotelu.

2.5 Solubilní endoglin

2.5.1 Vznik solubilního endoglinu a jeho struktura

Solubilní endoglin (sENG) představuje extracelulární doménu tkáňové formy ENG uvolněnou do cirkulace za pomoci membránově vázané metaloproteinázy (MMP-14) (Obr. 7). Studie na endotelových buňkách prokázaly, že MMP-14 se účastní štěpení ENG v pozici 586 uvolňující téměř celou extracelulární doménu ENG. Zároveň je MMP-14 nejvíce exprimovanou metaloproteinázou v endotelových buňkách [94]. Vysoké hladiny sENG byly pozorovány u myši se zvýšenou expresí MMP-14 [95].



Obrázek 7: Vznik sENG proteolytickým štěpením extracelulární domény tkáňového ENG pomocí proteinázy MMP-14 (MT1-MMP) [75].

2.5.2 Vztah solubilního endoglinu k hypercholesterolémii a endotelové dysfunkci

Hypercholesterolémie je jedním z nejvíce studovaných rizikových faktorů ve vztahu k endotelové dysfunkci a ateroskleróze. Zvýšené hladiny sENG v séru byly pozorovány u pacientů s aterosklerózou. Tyto hladiny korelovaly s vysokými hladinami celkového cholesterolu, nebyla však pozorována spojitost s dalšími ukazateli endotelové dysfunkce, jako je např. exprese E-selektinu [96]. Jiná studie ukázala, že se hladiny sENG zvyšují v počátečním stádiu aterosklerózy jako následek poškození endotelových buněk a v pozdějším stádiu

aterosklerózy tyto hladiny klesají díky asociaci ENG s TGF- β 1 [97]. Vysoká hladina sENG byla pozorována u pacientů s familiární hypercholesterolémií a jeho hladina se snižovala společně s celkovým cholesterolem během LDL-afézy [98].

Byla také pozorována souvislost mezi sENG a dalšími rizikovými faktory endotelové dysfunkce, jako je zánět a oxidační stres. Vysoké hladiny sENG byly pozorovány u endotelových buněk po podání TNF- α a po navození oxidačního stresu pomocí peroxidu vodíku [99]. Na druhou stranu, antioxidační enzym hemoxygenáza 1 (HO-1) inhibovala uvolňování sENG z endotelových buněk a placenty [100].

Hladina sENG je považována za možný ukazatel hypertenze a cévních patologií spojených s diabetem. Zvýšené hladiny sENG byly pozorovány u pacientů s retinopatií, diabetem a hypertenzí v porovnání se zdravými jedinci [101].

sENG je také považován za indikátor stárnutí endotelových buněk, zánětu a oxidačního stresu v srdečních cévách [99]. Zvýšená hladina sENG je rovněž spojována s morfologií aterosklerotického plátu a byla prokázána korelace s nestabilní anginou pectoris, akutním infarktem myokardu a remodelací srdce po infarktu [102].

Studie na myším modelu aterosklerózy prokázala, že hladiny sENG byly zvýšené společně s celkovým cholesterolem a velikostí plátů po podání cholesterolové diety. Zároveň byla pozorována snížená exprese tkáňového ENG v aortě. Podání ATV u tohoto modelu vedlo nejen ke zmenšení velikosti plátů a hladin celkového cholesterolu, ale i ke snížení hladin sENG za současného zvýšení exprese tkáňového ENG v aortě [57]. V další studii byla rovněž prokázána korelace mezi hladinami celkového cholesterolu a hladinami sENG u několika myších modelů (C57BL/6J, apoE/LDLR a apoE deficientní myši) [103]. Z výše uvedených poznatků tedy vyplývá, že by sENG mohl sloužit jako dobrý ukazatel endotelové dysfunkce a

kardiovaskulárních onemocnění. Jeho role v patogenezi endotelové dysfunkce však stále není objasněna.

2.5.2 Solubilního endoglin a endotelová dysfunkce v různých částech cévního řečiště

Jak už bylo zmíněno, sENG představuje možný ukazatel endotelové dysfunkce. Otázkou je, zda se může přímo podílet i na jejím vzniku. sENG je schopen inhibovat angiogenezi. Studie u myši, kterým byl podáván adenovirus uvolňující sENG, prokázala zvýšenou cévní permeabilitu v plicích, játrech a ledvinách. Další součástí téže studie bylo podávání rekombinantního sENG potkanům, které vedlo k narušení vazby TGF- β 1 cytokinu na TGF- β RII a narušení Smad 2/3 signalizace, což vedlo k inhibici na eNOS závislé vazodilataci u izolovaných potkaních renálních a mezenterických cév. Závěrem obou výsledků studie byl předpoklad, že sENG může mít hypertenzní efekt [104]. Hypertenze a endotelová dysfunkce je hlavním podkladem preeklampsie, kde je sENG považován za ukazatel závažnosti tohoto onemocnění [104, 105].

V další studii bylo prokázáno poškození endotelu v mezenterických cévách po použití adenoviru uvolňujícího sENG. Došlo k neutralizaci efektu TGF- β a VEGF za současného zvýšení exprese P-selektinu a kutálení leukocytů po endotelu, ke zvýšení hladin solubilního VCAM-1 a E-selektinu a k poškození vazodilatace [56].

Navzdory výše uvedeným poznatkům, přesný mechanismus působení sENG ve smyslu indukce endotelové dysfunkce dosud není znám.

2.5.3 Solubilní endoglin a jeho vztah k TGF- β signalizaci

Několik studií prokázalo, že sENG je schopen ovlivňovat TGF- β signalizaci a pravděpodobně působí jako antagonist TGF- β . První studie zabývající se interakcí sENG a TGF- β prokázala, že zvýšené hladiny sENG vedly ke snížené TGF- β aktivaci a

proaterogennímu efektu [97, 106]. sENG je schopen snižovat množství aktivního nevázaného TGF- β [107].

sENG soutěží s TGF- β 1 cytokinem o vazbu na receptor a oslabuje eNOS aktivaci v endotelových buňkách [104]. Snižená exprese eNOS je přitom spojována se zvýšenou expresí adhezních molekul v endotelových buňkách, zvýšenou cévní permeabilitou, poškozenou vazodilatací, rozvojem endotelové dysfunkce, arteriální hypertenzí a aterosklerózou [108], což opět poukazuje na možné proaterogenní účinky sENG.

Několik studií předpokládalo přímou vazbu TGF- β 1 a sENG v cirkulaci. Avšak afinita TGF- β 1 k TGF- β RII je mnohem vyšší než afinita TGF- β 1 k sENG [109, 110], z čehož vyplývá, že sENG s největší pravděpodobností není schopen přímé vazby TGF- β 1 cytokinu bez předchozího vzniku komplexu sENG s TGF- β RII [111]. Současná studie dokonce vyvrací přímou vazbu TGF- β 1 a sENG a předpokládá vazbu sENG spíše k dalším biologicky aktivním molekulám, jako je BMP-9. Ve zmiňované studii dále prokázali, že TGF- β RII dokáže jednoduše vázat TGF- β 1 cytokin a zabránit tak Smad 1, 5, 8 fosforylaci, zatímco sENG tuto schopnost nemá. sENG je ale schopný vázat BMP-9 a následně zabránit Smad 1, 5, 8 fosforylaci, kterou BMP-9 aktivuje [109]. Vazbu sENG a BMP-9 potvrzuje i další studie [112]. Vliv BMP-9 na cévní patologii však nebyl dosud objasněn. Jediná dostupná studie prokazuje, že BMP-9 pomocí signalizační dráhy, zahrnující BMP receptor II, ALK-1 a p38, zvyšuje produkci endotelinu 1 (ET-1) [113], který je důležitý pro cévní stabilitu a regulaci krevního tlaku [109].

2.6 Myší modely pro studium endotelové dysfunkce a aterosklerózy

2.6.1 Normocholesterolemické myší modely

U myší tvoří hlavní lipoproteinovou složku cholesterolu HDL, jsou tedy vůči ateroskleróze rezistentní. Existují však kmeny, u kterých je hladina HDL nižší [114]. C57BL/6J (B6) a C3H/HeJ (C3H) jsou dva nejčastěji užívané normocholesterolemické myší kmeny, které jsou k ateroskleróze různě citlivé. U kmene B6 můžeme v oblasti aorty pozorovat tuková depozita po podání aterogenní diety, zatímco kmen C3H zůstává k tvorbě lipidových proužků rezistentní [115, 116]. Aterogenní dieta u kmene B6 způsobuje významnou redukci hladiny HDL cholesterolu a zároveň dramatickou indukci exprese prozánětlivých genů v játrech [117]. U kmene C3H k tomuto jevu nedochází a kmeny se od sebe liší i rozdílnou expresí proteinů oxidačního stresu a lipidového metabolismu [118]. Další studie prokázaly, že za hlavní rozdíly mezi oběma kmeny jsou zodpovědné zejména endotelové buňky [116], makrofágy [119] a hladké svalové buňky [120]. Přestože je tedy kmen B6 oproti C3H k ateroskleróze výrazně citlivější, vytvářejí se u něj pouze malé léze v oblasti kořene aorty a celkový rozvoj aterosklerózy není blízký lidskému [121]. Proto bylo potřeba ke studiu aterosklerózy hledat vhodnější model.

2.6.2 Apolipoprotein E deficientní myší model

Apolipoprotein E (apoE) deficientní model patří k nejčastěji užívaným modelům pro studium aterosklerózy. apoE je syntetizován v makrofázích a játrech a jako součást plazmatických proteinů slouží k vazbě na buněčné povrchové receptory, kde vycytává aterogenní částice z cirkulace [122]. Díky cílenému vypnutí genu pro apoE se u myší vyvíjí závažná hypercholesterolemie a spontánní ateroskleróza již na standardní dietě [123, 124]. Následkem snížené clearance lipoproteinů z cirkulace jsou pro tento myší model typické vysoké hladiny LDL a VLDL cholesterolu a dochází k rozvoji plátů [123]. ApoE má však v organismu i antioxidační, antiproliferativní, antiagregační a protizánětlivou funkci, následky vypnutí genu

pro apoE u tohoto modelu jsou tedy komplexnější. Navíc jsou hladiny VLDL cholesterolu velmi vysoké oproti hladinám VLDL u lidí. Patologie plátů je u těchto myší také odlišná od lidských, což znesnadňuje extrapolaci výsledků získaných na těchto myších do humánní oblasti [125-129].

2.6.3 Apolipoprotein E – LDL receptor deficientní myší model

U tohoto modelu je kromě apoE vypnut i gen pro LDL receptor, což vede k dramatickému rozvoji hyperlipidémie a aterosklerózy. K vývoji významných aterosklerotických plátů dochází již na standardní laboratorní dietě a dynamika rozvoje aterosklerózy je rychlejší, než u výše zmíněných kmenů [130]. Tento model lze s výhodou využít pro sledování antiaterogenních účinků některých léčiv [131-133].

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

2.7.1 Heterozygotní endoglin deficientní myší model

Onemocnění HHT, také známé jako Rendu-Osler-Weber syndrom, je autozomálně dědičná vaskulární porucha s prevalencí 1:8000. Pro toto onemocnění je charakteristické krvácení z nosu, které je způsobeno teleangiektázií nosní sliznice [134]. Teleangiektázie je charakterizována rozšířenými krevními cévy, kdy se postkapilární venuly spojí přímo s rozšířenými arteriolami a obejdou tak kapilární síť [135]. Dilatace větších cév může u pacientů způsobit arteriovenózní malformace v plicích, mozku a játrech [136].

Jsou známy dvě formy tohoto onemocnění – HHT-1 způsobené mutací ENG [137] a HHT-2 způsobené mutací ALK-1 [138].

Vypnutí obou alel pro ENG je pro myši letální [76]. Heterozygotní model myší s vypnutím jedné alely pro ENG byl vytvořen zpětným křížením kmenů 129/Ola a B6. U těchto myší byla pozorována teleangiektázie zejména na ušních boltcích a na ocase, která někdy vedla až ke ztrátě jeho části. Závažnost onemocnění se zvyšovala s věkem, u myší starších osmi měsíců se projevovала ztrátou hmotnosti, závažným krvácením a omezenou mobilitou. Jsou známy i další heterozygotní ENG deficientní myší modely založené na různých myších kmenech (B6 a CD1), avšak u modelu 129/Ola jsou projevy onemocnění nejzávažnější [76].

2.7.2 Endoglin conditional knockout myší model

Jak již bylo zmíněno, ENG deficientní myší homozygoti umírají během intrauterinního vývoje [76]. Tento model tedy nelze využít pro studium ENG u dospělých myší. V roce 2007 byl vyvinut myší model, kde je gen pro ENG inaktivován, tzv. conditional knockout. Za použití enzymu Cre-rekombinázy jsou z genu pro ENG vystřiženy exony 5 a 6, a tak se gen pro ENG stává nefunkčním, dochází k tzv. frameshift mutaci (Obr. 8). V případě inducibilního modelu

je použita inducibilní forma Cre-rekombinázy (CreERT2), která se aktivuje pomocí tamoxifenu. Existují dvě linie inducibilní formy Cre-rekombinázy – pro endotel specifická *Cdh5(PAC)-CreERT2* a linie exprimována všemi buňkami *Rosa26-CreERT2* [139]. Pro studium endotelových buněk a funkce jejich genů byl speciálně vyvinut model transgenních myší *Tie2-Cre*, kde je exprese Cre-rekombinázy řízena *Tie2* promotorem [140].

Obdobný model představuje conditional knockout pro gen *ALK-1* (známý také jako *Acvrl1*), kde dochází k vystřížení exonů 4, 5 a 6 a následné frameshift mutaci [141]. Společně s conditional knockout modelem pro *ENG* lze tento model využít pro studium léčby arteriovenózních malformací [142].



Obrázek 8: Conditional knockout model pro *ENG* a *ALK-1* (*Acvrl1*). Pomocí Cre-rekombinázy dochází k delecí exonů 5 a 6 u genu pro *ENG* (A) a k delecí exonů 4-6 u genu pro *ALK-1* (B). Díky následné frameshift mutaci dochází k vytvoření nefunkčního proteinu [141].

2.7.3 Sol-Eng⁺ transgenní myší model

Pro studium účinků sENG na endotel byl vyvinut transgenní myší model s vysokou hladinou lidského sENG v plazmě (Sol-Eng⁺). *ENG* konstrukt obsahující AMK 26-437 řízený aktinovým promotorem byl injikován do oplodněných vajíček kmene CBAx57BL/6J. Tento model byl vytvořen zejména za účelem studia preeklampsie. Vyznačuje se hypertenzí, malou velikostí mláďat, proteinurií a poškozením ledvin [95]. Díky vysoké homologii lidského a myšího *ENG* (z 99 % se sekvence překrývají a z 69 % jsou identické) lze model s výhodou

využít pro studium účinků sENG u myší, z hlediska funkce je lidský a myší ENG ekvivalentní [66, 143]. Model s vysokými hladinami myšího sENG není v současné době dostupný.

Hladiny sENG se u Sol-Eng⁺ modelu pohybují kolem 2000 ng/ml plazmy, jsou tedy mnohonásobně vyšší než u běžných wild type myší. Zároveň jsou tyto hladiny vyšší než u preeklamptických pacientek, kde se tyto hodnoty pohybují kolem 70 ng/ml plazmy [144]. I přes tuto limitu by Sol-Eng⁺ model mohl představovat vhodný myší model pro studium endotelové dysfunkce.

3. Cíle práce

- Analýza současné literatury zabývající se problematikou tkáňového a solubilního endoglinu a jejich vztahu k endotelové dysfunkci a ateroskleróze.
- Sledování změn exprese endoglinu v aortě myšího modelu aterosklerózy a sledování jeho možné koexprese s adhezními molekulami a molekulou eNOS.
- Studium endotelové dysfunkce u myšího modelu s vysokou expresí lidského solubilního endoglinu v plazmě po podání standardní (chow) diety.
- Studium endotelové dysfunkce u myšího modelu s vysokou expresí lidského solubilního endoglinu v plazmě po podání vysokotukové diety.

4. Komentáře k pracím

Tato disertační práce je předkládána jako soubor komentovaných prací. Tři práce jsou otištěny v odborných časopisech s impaktním faktorem. Jedna z těchto prací je zpracována jako přehledový článek shrnující současné poznatky (review) a zbylé tři práce jsou původní (experimentální). Autorka je ve všech pracích uvedena pod rodným příjmením Ježková.

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

4.2. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta

4.3. High levels of soluble endoglin induce pro-inflammatory and oxidative stress phenotype associated with preserved NO-dependent vasodilatation in aorta from mice fed high fat diet

4.4. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction

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

Rathouska J.*, Jezkova K.*, Nemeckova I., Zemankova L., Varejckova M., Nachtigal P., *Histol Histopathol (2015) 30: 233-244; (IF= 2.281)* * These authors contributed equally to this work.

V této histologické studii jsme se snažili objasnit změny exprese tkáňového ENG během atherogeneze a zjistit, zda jsou rozdíly v expresi ve dvou odlišných úsecích aorty (kořen aorty a ascendentní aorta) u apoE deficientních myší. V našich předchozích studiích byla exprese ENG u apoE/LDLR myší prokázána výhradně v endotelových buňkách kořene aorty [57, 58, 81]. Nedávná studie prokázala, že se ENG podílí na adhezi a transmigraci leukocytů ve venulách a působí tak obdobně jako adhezní molekuly během zánětu [145]. Zajímalo nás tedy, zda podobnou situaci můžeme pozorovat i v aortě a zda je ENG v aortě exprimován společně s adhezními molekulami.

Ve studii byly použity tři skupiny apoE deficientních myší, kterým byla podávána standardní dieta a dieta s vysokým obsahem tuku (tzv. Western type dieta) ve snaze dosáhnout různého stádia atherogeneze. Pomocí systematického náhodného výběru řezů myší aorty a imunohistochemického barvení byla zhodnocena exprese ENG a adhezních molekul P-selektinu a VCAM-1.

Histologická studie prokázala expresi ENG v endotelových buňkách kořene aorty a endotelových buňkách ascendentní aorty u apoE deficientních myší. V oblasti ascendentní aorty byla exprese ENG v průběhu atherogeneze variabilní, nikoliv však v kořenu aorty. Exprese ENG byla detekována výhradně na endotelu pokrývajícím aterosklerotický plát, bez ohledu na velikost plátu. Nebyla prokázána koexprese ENG s P-selektinem ani s molekulou VCAM-1,

což naznačuje, že se ENG pravděpodobně nepodílí na akumulaci leukocytů v aortě u apoE deficientních myší v průběhu aterogeneze.

4.2. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta

Nemeckova I.*, Serwaczak A.*, Oujo B.*, Jezkova K., Rathouska J., Fikrova P., Varejckova M., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P.; *PLoS ONE* (2015), 10(3): e0119665; (IF= 3.534) * These authors contributed equally to this work.

V této práci jsme se zaměřili na studium endotelové dysfunkce u myšního modelu s vysokou expresí lidského sENG v plazmě. Vysoké hladiny sENG byly detekovány u nejrozličnějších kardiovaskulárních onemocnění [96, 98, 99, 101] a podílí se rovněž na patogenezi preklampsie [104]. Zdá se tedy, že by se sENG mohl podílet na rozvoji endotelové dysfunkce. Dosud však neexistuje studie, která by tuto hypotézu potvrdila nebo vyvrátila.

V této studii byly použity transgenní myši kmene CBAxC57BL/6J s vysokou hladinou sENG v plazmě (Sol-Eng⁺, sledovaná skupina) a jejich sourozenci s nízkou hladinou sENG (kontrolní skupina) ve věku 4-6 měsíců na standardní dietě.

Sledovaná skupina vykazovala vyšší hladiny sENG v plazmě a vyšší krevní tlak v porovnání se skupinou kontrolní. Analýza aorty *ex vivo* pomocí myografu však neprokázala zhoršenou odpověď endotelu Sol-Eng⁺ myši na podání acetylcholinu, mezi sledovanou a kontrolní skupinou nebyl ve vazodilataci pozorován signifikantní rozdíl. Stejně tak nebyly pozorovány rozdíly v expresi markerů endotelové funkce/dysfunkce v aortě (eNOS, VCAM-1, ICAM-1). Výsledky této studie naznačují, že vysoké hladiny sENG nemají u těchto myši po podání standardní diety vliv na funkci endotelu.

4.3. High levels of soluble endoglin induce pro-inflammatory and oxidative stress phenotype associated with preserved NO-dependent vasodilatation in aorta from mice fed high fat diet

Jezkova K.*, Rathouska J.*, Nemeckova I., Fikrova P., Dolezelova E., Varejckova M., Vitverova B., Tysonova K., Serwaczak A., Buczek E., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P. *Práce je přijata časopisem J Vasc Res (2016); (IF= 2.186)*

* These authors contributed equally to this work.

V předchozí studii se nám nepodařilo prokázat endotelovou dysfunkci v aortě u Sol-Eng⁺ myši krmených standardní dietou. Většina patologií, jako je hypertenze, diabetes mellitus II nebo ateroskleróza, je však doprovázena hypercholesterolémií. Proto jsme se v této studii zaměřili na studium endotelové dysfunkce u Sol-Eng⁺ myši po podání vysokotukové diety.

Použili jsme Sol-Eng⁺ myši s vysokými hladinami lidského sENG v plazmě (Sol-Eng⁺, sledovaná skupina) a jejich sourozence s nízkými hladinami sENG v plazmě (kontrolní skupina) ve věku šesti měsíců, které jsme krmili vysokotukovou dietou (1,25 % cholesterolu a 40 % tuku) po dobu třech měsíců.

Podání vysokotukové diety vedlo v obou skupinách myši k rozvoji mírné hypercholesterolémie. Western blot analýza aorty prokázala zvýšenou expresi pro-zánětlivých ukazatelů (P-selektin, ICAM-1, pNFκB, COX-2) a ukazatelů oxidačního stresu (HO-1, NOX-1, NOX-2) u sledované skupiny v porovnání s kontrolní skupinou. Analýza aorty *ex vivo* překvapivě prokázala zhoršenou vazodilataci u kontrolní skupiny, u sledované skupiny byla vazodilatace po podání acetylcholinu zachována. V expresi eNOS a jeho fosforylovaných forem (peNOS Ser1177, peNOS Ser632) se však obě skupiny nelišily.

Výsledky této studie prokázaly, že kombinace vysokých hladin sENG a hypercholesterolémie způsobila aktivaci pro-zánětlivých ukazatelů a ukazatelů oxidačního stresu v myší aortě. Zároveň jsme pozorovali poškozenou vazodilatační odpověď cévy závislou na NO u kontrolní skupiny. U sledované skupiny byla tato odpověď překvapivě zachována, což může naznačovat kompenzační odpověď aorty v reakci na její poškození. Mechanismus této možné kompenzační odpovědi se nám prozatím nepodařilo objasnit a je součástí pokračujících studií.

4.4. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction

Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Nachtigal P.; *Atherosclerosis* 243 (2015) 383-388; (IF= 3.994)

Hlavním cílem tohoto přehledového článku bylo souhrnně zhodnotit význam sENG u kardiovaskulárních onemocnění se zaměřením na endotelovou dysfunkci a hladiny cholesterolu. Hypercholesterolemie je jedním z nejvíce studovaných rizikových faktorů ve spojitosti s aterosklerózou a endotelovou dysfunkcí. Zvýšené hladiny sENG byly pozorovány u pacientů s aterosklerózou a jeho hladiny korelovaly s hladinami celkového cholesterolu [96]. V tomto článku jsme diskutovali sENG jako možný biomarker progresu a léčby kardiovaskulárních onemocnění a endotelové dysfunkce. Dále se zabýváme možnou interakcí sENG s TGF- β /eNOS a BMP-9 signální dráhou.

Součástí této přehledové práce byl rovněž souhrn výsledků našich dlouhodobých studií na několika myších modelech aterosklerózy [57, 58, 146] popisující různá stadia aterogeneze ve vztahu ke konkrétním hladinám cholesterolu. Tyto výsledky jsme dali do souvislosti s hladinami sENG. Prokázali jsme pozitivní korelaci mezi hladinami sENG a celkového cholesterolu u C57BL/6J myši, apoE deficientních myši krměných standardní dietou a u apoE deficientních a apoE/LDLR deficientních myši krměných cholesterolovou dietou. Zároveň jsme prokázali, že nejvyšší hladina sENG byla v porovnání s ostatními skupinami pozorována u apoE/LDLR deficientních myši krměných cholesterolovou dietou, tedy u skupiny s největší progresí aterosklerózy. Překvapivě se nám nepodařilo prokázat pozitivní korelaci mezi hladinami cholesterolu, případně sENG, a velikostí aterosklerotických plátů.

V závěru článku jsme diskutovali roli sENG jako potenciálního induktoru endotelové dysfunkce.

5. Souhrnná diskuze a shrnutí

Hlavním tématem této disertační práce bylo studium tkáňového ENG a sENG ve vztahu k ateroskleróze a endotelové dysfunkci u různých myších modelů. Mnoho přehledových studií diskutuje roli tkáňového ENG u kardiovaskulárních onemocnění, jako je hereditární hemoragická teleangiektázie [134], preeklampsie [104] a ateroskleróza [147]. Několik studií prokázalo změnu exprese tkáňového ENG během různých stádií aterogeneze. Narušená exprese ENG vedla ke snížení aktivity eNOS a k narušení vazodilatace závislé na NO [148]. Bylo rovněž prokázáno, že ENG je schopen zvyšovat eNOS ovlivněním Smad 2 signalizační dráhy [149]. Exprese ENG byla také zvýšena při poškození cévy, což naznačuje, že by ENG mohl hrát roli během reparačních procesů [70]. Byla rovněž popsána souvislost mezi expresí ENG a zvýšenou fibrózou a stabilitou aterosklerotického plátu [150]. Výsledky těchto studií předpokládají, že by tkáňový ENG mohl hrát protektivní roli v rozvoji endotelové dysfunkce a během aterogeneze. Na druhou stranu, existují také studie, kde exprese ENG koreluje s progresí aterosklerózy. Kontroverzní role tkáňového ENG v ateroskleróze byla nedávno shrnuta v přehledovém článku [151].

Bylo prokázáno, že se tkáňový ENG účastní adheze a prostupu leukocytů během zánětu ve venulách [145]. V naší histologické studii jsme se zabývali možnou koexpresí ENG s adhezními molekulami (ICAM-1 a P-selektin) a molekulou eNOS v aterosklerotických plátech aorty u apoE deficientních myší. Výsledky této studie prokázaly, že ENG není exprimován společně s adhezními molekulami a pravděpodobně se tak nepodílí na akumulaci leukocytů v myší aortě v průběhu aterogeneze. Jeho role z hlediska zánětu může souviset s tím, v jaké cévě je jeho exprese studována a musíme tedy rozlišovat mezi mikro a makrocirkulací. [152].

Zvýšené hladiny sENG byly, kromě preeklampsie, pozorovány u pacientů aterosklerózou [96], hypertenzí [101], hypercholesterolémií [98] a u pacientů

s diabetes mellitus typu II [101]. Hladiny sENG jsou dávány do souvislosti s preeklampií a nádorovými onemocněními [35, 153]. Zvýšené hladiny sENG rovněž souvisí s morfologií aterosklerotického plátu a korelují s nestabilní anginou pectoris, akutním infarktem myokardu a remodelací srdce po infarktu [102]. V další studii byla prokázána poškozená vazodilatace mesenterických cév po podání sENG prostřednictvím adenoviru. Zároveň byla pozorována zvýšená exprese adhezních molekul a zvýšené zachytávání a prostup leukocytů [56]. sENG by se tedy mohl spolupodílet na vzniku či rozvoji endotelové dysfunkce.

Pro studium vlivu sENG na endotel byl před nedávnem vyvinut myší kmen CBAxC57BL/6J s vysokou hladinou lidského sENG v plazmě (Sol-Eng⁺). Tento kmen se vyznačuje hypertenzí, malou velikostí mláďat, proteinurií a poškozením ledvin – fenotypově tedy připomíná preeklampsii [95]. My jsme tento kmen využili v naší studii, kde jsme sledovali vliv vysokých hladin lidského sENG na rozvoj endotelové dysfunkce. Nepozorovali jsme žádné změny u vazodilatace a produkce NO mezi skupinou myší s vysokými hladinami sENG (Sol-Eng⁺, sledovaná skupina) a skupinou myší s nízkými hladinami sENG (kontrolní skupina) na standardní dietě. Žádné změny jsme nepozorovali ani v expresi adhezních molekul. Vliv sENG na rozvoj endotelové dysfunkce se nám v této studii prokázat nepodařilo [154].

Hypertenze, ateroskleróza a diabetes mellitus typu II jsou současně doprovázeny hypercholesterolémií nebo dyslipidémií. Proto jsme v další studii použili stejný kmen myší (Sol-Eng⁺) a podávali jsme jim vysokotukovou dietu (1,25 % cholesterolu, 40 % tuku) po dobu třech měsíců. Výsledky této studie prokázaly, že vysoké hladiny sENG společně s hypercholesterolémií u sledované skupiny způsobily aktivaci pro-zánětlivých ukazatelů a ukazatelů oxidačního stresu v myší aortě. Poměrně překvapivě však vazodilatační odpověď závislá na NO byla poškozena u skupiny s nízkými hladinami sENG a u skupiny s vysokými hladinami sENG byla odpověď zachována. Toto může naznačovat jistou kompenzační odpověď aorty na její poškození u sledované skupiny myší. Exprese VEGF, eNOS a jeho

fosforylovaných forem, které by se na této kompenzační odpovědi mohly podílet, však neprokázala žádné rozdíly mezi sledovanou a kontrolní skupinou. Sledovali jsme i expresi SOD-3 a katalázy, které za určitých okolností mohou zlepšovat vazodilataci díky svému antioxidačnímu působení [155-157]. I v tomto případě nebyl mezi skupinami v expresi rozdíl. Pozorovali jsme však zvýšenou expresi HO-1 u skupiny s vysokými hladinami sENG. HO-1 je inducibilní enzym, jehož exprese se zvyšuje během oxidačního stresu a zánětu [158]. Katalytická aktivita HO-1 je schopna z hemové skupiny uvolňovat oxid uhelnatý (CO), který může aktivovat guanylátcyklázu podobně jako NO [159]. Několik studií prokázalo souvislost mezi CO a NO. CO je schopen aktivovat guanylátcyklázu, pokud jsou hladiny NO nízké [160]. V této chvíli předpokládáme, že by zvýšená exprese HO-1 a následné uvolnění CO mohlo představovat možný kompenzační mechanismus a vysvětlit tak zachovalou vazodilatační odpověď u sledované skupiny (i přes detekci zánětu a oxidačního stresu), nicméně pro potvrzení této hypotézy jsou nutné další studie.

Souvislostem mezi hypercholesterolémií a sENG jsme se věnovali i v našem přehledovém článku, kde jsme shrnuli výsledky našich dlouhodobých studií na myších modelech aterosklerózy. Prokázali jsme pozitivní korelaci mezi hladinami sEng a celkového cholesterolu u C57BL/6J myši, apoE deficientních myši krmených standardní dietou a u apoE deficientních a apoE/LDLR deficientních myši krmených cholesterolovou dietou. Zároveň se nám podařilo prokázat, že nejvyšší hladina sENG byla, v porovnání s ostatními skupinami, pozorována u apoE/LDLR deficientních myši krmených cholesterolovou dietou, tedy u skupiny s největší progresí aterosklerózy.

Celkově lze tedy konstatovat, že sENG by mohl být zajímavým ukazatelem progresu a léčby mnoha kardiovaskulárních onemocnění spojených s endotelovou dysfunkcí a hypercholesterolémií. Mechanismus jeho působení na endotel však zůstává stále nejasný, zejména s ohledem na cévy, ve kterých může probíhat aterogeneze.

6. Závěry

- Bylo prokázáno, že ENG u ApoE deficientních myší není exprimován společně s adhezními molekulami (ICAM-1 a P-selektin) v myší aortě a pravděpodobně se tak nepodílí na akumulaci leu kocytů a jejich přestupu přes endotel v průběhu aterosklerotického procesu u myší. Zároveň byl extrakardiální úsek aorty označen za relevantnější pro studium změn exprese ENG v průběhu aterosklerogeneze, oproti oblasti aortálního sinu, kde se jeho exprese během procesu aterosklerogeneze neměnila.
- U myší s vysokou hladinou lidského sENG v plazmě (Sol-Eng⁺) na standardní dietě se nám nepodařilo prokázat indukci endotelové dysfunkce v aortě. Vazodilatační odpověď aorty závislá na NO a exprese adhezních molekul se u myší s nízkou a vysokou hladinou sENG nelišila.
- Prokázali jsme, že vysoké hladiny sENG společně s hypercholesterolémií způsobují aktivaci pro-zánětlivých ukazatelů (ICAM-1, P-selektin, COX-1, pNFκB) a ukazatelů oxidačního stresu (NOX-1, NOX-2, HO-1) v aortě myší s vysokou hladinou lidského sENG (Sol-Eng⁺). Vazodilatační odpověď závislá na NO však byla poškozena u skupiny s nízkou hladinou sENG a u skupiny s vysokou hladinou sENG byla tato odpověď zachována. Mechanismus této odpovědi je součástí dalších studií.
- V přehledové studii jsme prokázali pozitivní korelaci hladin sENG a celkového cholesterolu u C57BL/6J myší, apoE deficientních myší krměných standardní dietou a

u apoE deficientních a apoE/LDLR deficientních myší krmených cholesterolovou dietou. Nejvyšší hladina sENG byla, v porovnání s ostatními skupinami, pozorována u apoE/LDLR deficientních myší krmených cholesterolovou dietou, tedy u skupiny s největší progresí aterosklerózy. V této studii jsme zároveň shrnuli současné poznatky o sENG a jeho vztahu k endotelové dysfunkci a aterogenezi.

7. Podíl předkladatelky na publikovaných pracích zahrnutých v disertační práci

Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Zemankova L., Varejckova M., Nachtigal P. 2015. Endoglin is not expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice. *Histol Histopathol* 30:233-244; (IF= 2.281)

- Imunohistochemické barvení pro stanovení exprese endoglinu, P-selektinu a VCAM-1
- Podíl na sepisování manuskriptu

Nemeckova I., Serwaczak A., Oujo B., Jezkova K., Rathouska J., Fikrova P., Varejckova M., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P. 2015. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One* 10:e0119665; (IF= 3.534)

- Práce se zvířaty, množení a příprava zvířat ke studii
- Western blot analýza
- ELISA analýza
- Podíl na sepisování manuskriptu

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

- Práce se zvířaty, množení a příprava zvířat ke studii
- Western blot analýza

- ELISA analýza
- Funkční analýza cév pomocí myografu
- Hlavní podíl na analýze dat a textu publikace

Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Nachtigal P. 2015. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 243:383-388; (IF= 3.994)

- Podíl na sepisování manuskriptu

8. Přehled publikační činnosti

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

Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Nachtigal P. 2015. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis 243:383-388; (IF=3,994).*

Kostogrysb RB., Johann C., Czyzyska I., Franczyk-Zarow M., Drahun A., Maslak E., Jaształ A., Gajda M., Mateuszuk L., Wrobel TP., Baranska M., Wybranska I., Jezkova K., Nachtigal P., Chlopicki S. 2015. Characterisation of Atherogenic Effects of Low Carbohydrate, High Protein Diet (LCHP) in ApoE/LDLR^{-/-} Mice. *J Nutr Health Aging 19:710-718; (IF=2.996).*

Zemankova L., Varejckova M., Dolezalova E., Fikrova P., Jezkova K., Rathouska J., Cerveny L., Botella LM., Bernabeu C., Nemeckova I., Nachtigal P. 2015. Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin. *J Physiol Pharmacol 66:403-413; (IF=2.804).*

Nemeckova I., Serwaczak A., Oujo B., Jezkova K., Rathouska J., Fikrova P., Varejckova M., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P. 2015. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One 10:e0119665; (IF=3.057).*

Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Zemankova L., Varejckova M., Nachtigal P. 2015. Endoglin is not expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice. *Histol Histopathol* 30:233-244; (IF=2.281).

Vlckova H., Jezkova K., Stetkova K., Tomsikova H., Solich P., Novakova L. 2014. Study of the retention behavior of small polar molecules on different types of stationary phases used in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 37:1297-1307; (IF=2.947).

Rathouska J., Nemeckova I., Zemankova L., Strasky Z., Jezkova K., Varejckova M., Nachtigal P. 2015. Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis. *Heart Vessels* 30:241-248; (IF=2.126).

9. Prezentace na konferencích

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Serwaczak A., Chlopicki P., Nachtigal P.; Experimental mouse model with high levels of human soluble endoglin – a pilot study. XVII. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn (2013)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Nachtigal P.; Experimental mouse model with high levels of human soluble endoglin – a pilot study. 4. Postgraduální a 2. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (2014)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Serwaczak A., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P.; Soluble endoglin and markers of endothelial function/dysfunction in mouse aorta – a pilot study. 82nd European Atherosclerosis Society Congress, Madrid, Španělsko (2014)

Jezkova K., Nemeckova I., Serwaczak A., Rathouska J., Fikrova P., Chlopicki S., Nachtigal P.; Increased Levels of Human Soluble Endoglin does not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, Smolenice, Slovensko (2014)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Serwaczak A., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P., A possible protection against high-fat diet induced endothelial dysfunction by soluble endoglin. XVIII. kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn (2014)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Serwaczak A, Chlopicki S., Nachtigal P.; Characterization of endothelial function in aorta of transgenic mice overexpressing human soluble endoglin. 5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (2015)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Serwaczak A., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P., Effect of high soluble endoglin levels in combination with high fat diet on aortic endothelium. 11th International HHT Scientific Conference, Florida, USA (2015)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Fikrova P., Dolezelova E., Varejckova M., Vitverova B., Tysonova K., Serwaczak A., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P.; soluble endoglin effects in aorta from mice fed high fat diet. 6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (2016)

Jezkova K., Rathouska J., Nemeckova I., Serwaczak A., Vitverova B., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P.; Effect of high fat diet on aorta from mice overexpressing soluble endoglin. 84nd European Atherosclerosis Society Congress, Innsbruck, Rakousko (2016)

10. Použitá literatura

1. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
2. Keaney, J.F., Jr., *Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction*. Mol Aspects Med, 2000. **21**(4-5): p. 99-166.
3. Goubergrits, L., et al., *Atherosclerosis and flow in carotid arteries with authentic geometries*. Biorheology, 2002. **39**(3-4): p. 519-24.
4. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 840-56.
5. Stary, H.C., et al., *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, 1995. **15**(9): p. 1512-31.
6. Hadi, H.A.R., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-98.
7. Endemann, D.H. and E.L. Schiffrin, *Endothelial Dysfunction*. Journal of the American Society of Nephrology, 2004. **15**(8): p. 1983-1992.
8. Hwang, S.-J., et al., *Circulating Adhesion Molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in Carotid Atherosclerosis and Incident Coronary Heart Disease Cases. The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study*, 1997. **96**(12): p. 4219-4225.
9. Blankenberg, S., S. Barbaux, and L. Tiret, *Adhesion molecules and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2003. **170**(2): p. 191-203.

10. Dejana, E., et al., *Intercellular junctions in the endothelium and the control of vascular permeability*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 36-43; discussion 43-4.
11. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
12. Tedder, T.F., et al., *The selectins: vascular adhesion molecules*. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 866-73.
13. Davies, M.J., et al., *The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis*. The Journal of Pathology, 1993. **171**(3): p. 223-229.
14. Chistiakov, D.A., A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, *Endothelial PECAM-1 and its function in vascular physiology and atherogenic pathology*. Exp Mol Pathol, 2016. **100**(3): p. 409-15.
15. Matheny, H.E., T.L. Deem, and J.M. Cook-Mills, *Lymphocyte Migration Through Monolayers of Endothelial Cell Lines Involves VCAM-1 Signaling Via Endothelial Cell NADPH Oxidase*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(12): p. 6550-6559.
16. Nakashima, Y., et al., *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 842-51.
17. Bobryshev, Y.V., et al., *The cell adhesion molecule E-cadherin is widely expressed in human atherosclerotic lesions*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(1): p. 191-205.
18. Dejana, E., G. Bazzoni, and M.G. Lampugnani, *Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue?* Exp Cell Res, 1999. **252**(1): p. 13-9.
19. Fotis, L., et al., *Intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in children. Do they play a role in the progression of atherosclerosis?* Hormones (Athens), 2012. **11**(2): p. 140-6.

20. Vanhoutte, P.M., [*Endothelial dysfunction and atherosclerosis*]. Arch Mal Coeur Vaiss, 1997. **90 Spec No 6**: p. 9-19.
21. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial Function and Dysfunction. Testing and Clinical Relevance*, 2007. **115**(10): p. 1285-1295.
22. Stamler, J.S., S. Lamas, and F.C. Fang, *Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism*. Cell, 2001. **106**(6): p. 675-683.
23. Govers, R. and T.J. Rabelink, *Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2001. **280**(2): p. F193-F206.
24. Halcox, J.P.J., et al., *Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2001. **280**(6): p. H2470-H2477.
25. Li, Y., et al., *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 376-381.
26. Evans, J.L., et al., *Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes*. Endocrine Reviews, 2002. **23**(5): p. 599-622.
27. Kuzkaya, N., et al., *Interactions of Peroxynitrite, Tetrahydrobiopterin, Ascorbic Acid, and Thiols: IMPLICATIONS FOR UNCOUPLING ENDOTHELIAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(25): p. 22546-22554.
28. Laursen, J.B., et al., *Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-Deficient Mice. Implications for Interactions Between Peroxynitrite and Tetrahydrobiopterin*, 2001. **103**(9): p. 1282-1288.
29. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)*. Growth Factors, 1993. **8**(1): p. 1-9.

30. Hirschi, K.K., S.A. Rohovsky, and P.A. D'Amore, *PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate*. J Cell Biol, 1998. **141**(3): p. 805-14.
31. Bobik, A., *Transforming growth factor-betas and vascular disorders*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1712-20.
32. Wieser, R., J.L. Wrana, and J. Massague, *GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex*. EMBO J, 1995. **14**(10): p. 2199-208.
33. Lavery, H.G., et al., *TGF-beta3 and cancer: a review*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(4): p. 305-17.
34. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
35. Fonsatti, E., et al., *Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours*. Cardiovascular Research, 2010. **86**(1): p. 12-19.
36. Lebrin, F., et al., *TGF-beta receptor function in the endothelium*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 599-608.
37. Singh, N.N. and D.P. Ramji, *The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(6): p. 487-99.
38. Grainger, D.J., et al., *Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 13): p. 2355-61.
39. Mallat, Z., et al., *Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice*. Circ Res, 2001. **89**(10): p. 930-4.

40. Panousis, C.G., G. Evans, and S.H. Zuckerman, *TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma*. J Lipid Res, 2001. **42**(5): p. 856-63.
41. Irvine, S.A., et al., *A critical role for the Sp1-binding sites in the transforming growth factor-beta-mediated inhibition of lipoprotein lipase gene expression in macrophages*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(5): p. 1423-34.
42. Majesky, M.W., et al., *Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 904-10.
43. Nikol, S., et al., *Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions*. J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1582-92.
44. O'Brien, K.D., et al., *Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins*. Circulation, 1998. **98**(6): p. 519-27.
45. Grainger, D.J., et al., *The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 74-9.
46. Wolf, Y.G., L.M. Rasmussen, and E. Ruoslahti, *Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1172-8.
47. Schulick, A.H., et al., *Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6983-8.
48. de Caestecker, M., *The transforming growth factor-beta superfamily of receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(1): p. 1-11.
49. Miyazono, K., P. ten Dijke, and C.H. Heldin, *TGF-beta signaling by Smad proteins*. Adv Immunol, 2000. **75**: p. 115-57.

50. Massague, J. and R.R. Gomis, *The logic of TGFbeta signaling*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2811-20.
51. Valdimarsdottir, G., et al., *Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells*. Circulation, 2002. **106**(17): p. 2263-70.
52. Watabe, T., et al., *TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells*. J Cell Biol, 2003. **163**(6): p. 1303-11.
53. Goumans, M.J., et al., *Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 817-28.
54. Yao, Y., et al., *Activin-like kinase receptor 1 (ALK1) in atherosclerotic lesions and vascular mesenchymal cells*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 279-89.
55. Yao, Y., et al., *High-density lipoproteins affect endothelial BMP-signaling by modulating expression of the activin-like kinase receptor 1 and 2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(12): p. 2266-74.
56. Walshe, T.E., et al., *Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(8): p. 1185-92.
57. Rathouska, J., et al., *Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis*. Pharmacol Res, 2011. **64**(1): p. 53-9.
58. Strasky, Z., et al., *Cholesterol Effects on Endoglin and Its Downstream Pathways in ApoE/LDLR Double Knockout Mice*. Circ J, 2011. **75**(7): p. 1747-55.
59. Bobik, A., et al., *Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development*. Circulation, 1999. **99**(22): p. 2883-91.

60. Goumans, M.J., et al., *Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1743-53.
61. Piao, M. and O. Tokunaga, *Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study*. J Atheroscler Thromb, 2006. **13**(2): p. 82-9.
62. McCaffrey, T.A., et al., *Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2182-8.
63. McCaffrey, T.A., *TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 103-14.
64. Cheifetz, S., et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.
65. Zhang, H., et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 564-73.
66. Gougos, A. and M. Letarte, *Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8361-4.
67. Bellon, T., et al., *Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2340-5.
68. Kreisberg, J.I., R.A. Radnik, and S.H. Kreisberg, *Phosphorylation of cAMP responsive element binding protein after treatment of mesangial cells with high glucose plus TGF beta or PMA*. Kidney Int, 1996. **50**(3): p. 805-10.
69. Lastres, P., et al., *Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1*. J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1109-21.

70. Conley, B.A., et al., *Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques*. *Atherosclerosis*, 2000. **153**(2): p. 323-35.
71. Sanchez-Elsner, T., et al., *Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 43799-808.
72. Rius, C., et al., *Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1*. *Blood*, 1998. **92**(12): p. 4677-90.
73. Botella, L.M., et al., *Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury*. *Blood*, 2002. **100**(12): p. 4001-10.
74. Li, C., et al., *TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1*. *Anticancer Res*, 2003. **23**(2B): p. 1189-96.
75. Lopez-Novoa, J.M. and C. Bernabeu, *The physiological role of endoglin in the cardiovascular system*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(4): p. H959-74.
76. Bourdeau, A., D.J. Dumont, and M. Letarte, *A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(10): p. 1343-51.
77. Ma, X., et al., *Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(12): p. 2546-52.
78. Burrows, F.J., et al., *Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy*. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(12): p. 1623-34.

79. Jerkic, M., et al., *Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(4): p. 845-54.
80. Toporsian, M., et al., *A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Circ Res, 2005. **96**(6): p. 684-92.
81. Vecerova, L., et al., *Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice*. J Atheroscler Thromb, 2012. **19**(2): p. 115-26.
82. Zhou, Q. and J.K. Liao, *Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives*. Circ J, 2010. **74**(5): p. 818-26.
83. Miida, T., S. Hirayama, and Y. Nakamura, *Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia*. J Atheroscler Thromb, 2004. **11**(5): p. 253-64.
84. Maron, D.J., S. Fazio, and M.F. Linton, *Current perspectives on statins*. Circulation, 2000. **101**(2): p. 207-13.
85. Collins, R., et al., *Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy*. Lancet, 2016.
86. Mori-Kawabe, M., et al., *Role of Rho/Rho-kinase and NO/cGMP signaling pathways in vascular function prior to atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2009. **16**(6): p. 722-32.
87. Ravingerova, T., et al., *Changes in PPAR gene expression and myocardial tolerance to ischaemia: relevance to pleiotropic effects of statins*. Can J Physiol Pharmacol, 2009. **87**(12): p. 1028-36.

88. Harris, M.B., et al., *Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(2): p. H560-6.
89. Feron, O., et al., *Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance*. *Circulation*, 2001. **103**(1): p. 113-8.
90. Brouet, A., et al., *Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins*. *Circ Res*, 2001. **89**(10): p. 866-73.
91. Wolfrum, S., K.S. Jensen, and J.K. Liao, *Endothelium-dependent effects of statins*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 729-36.
92. Sukhova, G.K., J.K. Williams, and P. Libby, *Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(9): p. 1452-8.
93. Zemankova, L., et al., *Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin*. *J Physiol Pharmacol*, 2015. **66**(3): p. 403-13.
94. Hawinkels, L.J., et al., *Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(10): p. 4141-50.
95. Valbuena-Diez, A.C., et al., *Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension*. *Circulation*, 2012. **126**(22): p. 2612-24.
96. Blann, A.D., et al., *Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1996. **120**(1-2): p. 221-6.
97. Li, C.G., et al., *The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 2000. **152**(1): p. 249-56.

98. Blaha, M., et al., *Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia*. *Atherosclerosis*, 2008. **197**(1): p. 264-70.
99. Ikemoto, T., et al., *Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases*. *Heart Vessels*, 2011.
100. Cudmore, M., et al., *Negative Regulation of Soluble Flt-1 and Soluble Endoglin Release by Heme Oxygenase-1*. *Circulation*, 2007. **115**(13): p. 1789-1797.
101. Blazquez-Medela, A.M., et al., *Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients*. *BMC Med*, 2010. **8**: p. 86.
102. Cui, S., et al., *Relationship among soluble CD105, hypersensitive C-reactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study*. *Chin Med J (Engl)*, 2008. **121**(2): p. 128-32.
103. Rathouska, J., et al., *Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction*. *Atherosclerosis*, 2015. **243**(2): p. 383-8.
104. Venkatesha, S., et al., *Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia*. *Nat Med*, 2006. **12**(6): p. 642-9.
105. Levine, R.J., et al., *Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(10): p. 992-1005.
106. Stefoni, S., et al., *Low TGF-beta1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients*. *Kidney Int*, 2002. **61**(1): p. 324-35.
107. Li, C., et al., *CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells*. *Faseb J*, 2000. **14**(1): p. 55-64.
108. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.

109. Gregory, A.L., et al., *Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta*. *Placenta*, 2014. **35 Suppl**: p. S93-9.
110. De Crescenzo, G., et al., *Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding*. *J Mol Biol*, 2003. **328**(5): p. 1173-83.
111. Van Le, B., et al., *Structural and functional characterization of soluble endoglin receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **383**(4): p. 386-91.
112. Castonguay, R., et al., *Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(34): p. 30034-46.
113. Star, G.P., M. Giovinazzo, and D. Langleben, *Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: a potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension*. *Microvasc Res*, 2010. **80**(3): p. 349-54.
114. Paigen, B., et al., *Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H*. *Atherosclerosis*, 1987. **64**(2-3): p. 215-21.
115. Paigen, B., et al., *Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice*. *Atherosclerosis*, 1987. **68**(3): p. 231-40.
116. Shi, W., et al., *Determinants of atherosclerosis susceptibility in the C3H and C57BL/6 mouse model: evidence for involvement of endothelial cells but not blood cells or cholesterol metabolism*. *Circ Res*, 2000. **86**(10): p. 1078-84.

117. Liao, F., et al., *Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2572-9.
118. Park, J.Y., J.K. Seong, and Y.K. Paik, *Proteomic analysis of diet-induced hypercholesterolemic mice*. Proteomics, 2004. **4**(2): p. 514-23.
119. Shi, W., et al., *Neointimal formation in two apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility*. J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 2008-14.
120. Miyoshi, T., et al., *Differential response of vascular smooth muscle cells to oxidized LDL in mouse strains with different atherosclerosis susceptibility*. Atherosclerosis, 2006. **189**(1): p. 99-105.
121. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, *Mouse models of experimental atherosclerosis*. J Physiol Pharmacol, 2004. **55**(3): p. 503-17.
122. Knowles, J.W. and N. Maeda, *Genetic modifiers of atherosclerosis in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(11): p. 2336-45.
123. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. Arteriosclerosis and Thrombosis, 1994. **14**(1): p. 133-40.
124. Reddick, R.L., S.H. Zhang, and N. Maeda, *Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression*. Arteriosclerosis and Thrombosis, 1994. **14**(1): p. 141-7.
125. Ali, K., et al., *Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo*. Circ Res, 2005. **97**(9): p. 922-7.
126. Davignon, J., *Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 267-9.

127. Grainger, D.J., J. Reckless, and E. McKilligin, *Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 6366-75.
128. Raffai, R.L., S.M. Loeb, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 436-41.
129. Meir, K.S. and E. Leitersdorf, *Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1006-14.
130. Witting, P.K., et al., *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, 1999. **13**(6): p. 667-75.
131. Kampschulte, M., et al., *Thalidomide influences atherogenesis in aortas of ApoE(-/-)/LDLR (-/-) double knockout mice: a nano-CT study*. Int J Cardiovasc Imaging, 2014. **30**(4): p. 795-802.
132. Yamamoto, Y., et al., *The effect of the long term aspirin administration on the progress of atherosclerosis in apoE-/- LDLR-/- double knockout mouse*. Thromb Res, 2010. **125**(3): p. 246-52.
133. Nachtigal, P., et al., *Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice*. Life Sci, 2008. **82**(13-14): p. 708-17.
134. Shovlin, C.L. and M. Letarte, *Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms*. Thorax, 1999. **54**(8): p. 714-729.
135. Braverman, I.M., A. Keh, and B.S. Jacobson, *Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia*. J Invest Dermatol, 1990. **95**(4): p. 422-7.

136. Bourdeau, A., M.E. Faughnan, and M. Letarte, *Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(7): p. 279-85.
137. McAllister, K.A., et al., *Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1*. Nat Genet, 1994. **8**(4): p. 345-51.
138. Johnson, D.W., et al., *Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2*. Nat Genet, 1996. **13**(2): p. 189-95.
139. Allinson, K.R., et al., *Generation of a floxed allele of the mouse Endoglin gene*. Genesis, 2007. **45**(6): p. 391-5.
140. Li, W.L., et al., *Endothelial cell-specific expression of Cre recombinase in transgenic mice*. Yi Chuan Xue Bao, 2005. **32**(9): p. 909-15.
141. Tual-Chalot, S., S.P. Oh, and H.M. Arthur, *Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia: recent advances and future challenges*. Front Genet, 2015. **6**: p. 25.
142. Lebrin, F., et al., *Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 420-8.
143. St-Jacques, S., et al., *Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells*. Endocrinology, 1994. **134**(6): p. 2645-57.
144. Chaiworapongsa, T., et al., *Plasma soluble endoglin concentration in pre-eclampsia is associated with an increased impedance to flow in the maternal and fetal circulations*. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 2010. **35**(2): p. 155-162.
145. Rossi, E., et al., *Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration*. Blood, 2013. **121**(2): p. 403-15.

146. Rathouska, J., et al., *Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis*. Heart Vessels, 2015. **30**(2): p. 241-8.
147. Nachtigal, P., et al., *The role of endoglin in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2012. **224**(1): p. 4-11.
148. Jerkic, M., et al., *Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation*. Faseb J, 2004. **18**(3): p. 609-11.
149. Santibanez, J.F., et al., *Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling*. J Cell Physiol, 2007. **210**(2): p. 456-68.
150. Bot, P.T., et al., *Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques*. Stroke, 2009. **40**(2): p. 439-47.
151. Jang, Y.S. and I.H. Choi, *Contrasting roles of different endoglin forms in atherosclerosis*. Immune Netw, 2014. **14**(5): p. 237-40.
152. Rathouska, J., et al., *Endoglin is not expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice*. Histol Histopathol, 2015. **30**(2): p. 233-44.
153. Oujo, B., et al., *Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia*. Curr Mol Med, 2013. **13**(8): p. 1345-57.
154. Nemeckova, I., et al., *High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119665.
155. Lund, D.D., et al., *Gene transfer of extracellular superoxide dismutase improves relaxation of aorta after treatment with endotoxin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H805-11.

156. Chu, Y., et al., *Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain*. *Circ Res*, 2003. **92**(4): p. 461-8.
157. Foresman, E.L. and F.J. Miller, Jr., *Extracellular but not cytosolic superoxide dismutase protects against oxidant-mediated endothelial dysfunction*. *Redox Biol*, 2013. **1**: p. 292-6.
158. Araujo, J.A., M. Zhang, and F. Yin, *Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis*. *Front Pharmacol*, 2012. **3**: p. 119.
159. Duckers, H.J., et al., *Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation*. *Nat Med*, 2001. **7**(6): p. 693-8.
160. Kajimura, M., et al., *Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in the rat retina*. *FASEB J*, 2003. **17**(3): p. 506-8.

11. Seznam příloh

- I. **Endoglin is not expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice.** Rathouska J.*, Jezkova K.*, Nemeckova I., Zemankova L., Varejckova M., Nachtigal P., *Histol Histopathol* (2015) 30: 233-244; (IF= 2.281) * These authors contributed equally to this work.

- II. **High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta.** Nemeckova I.*, Serwaczak A.*, Oujo B.*, Jezkova K., Rathouska J., Fikrova P., Varejckova M., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P.; *PLoS ONE* (2015), 10(3): e0119665; (IF= 3.534) * These authors contributed equally to this work.

- III. **High levels of soluble endoglin induce pro-inflammatory and oxidative stress phenotype associated with preserved NO-dependent vasodilatation in aorta from mice fed high fat diet.** Jezkova K.*, Rathouska J.*, Nemeckova I., Fikrova P., Dolezelova E., Varejckova M., Vitverova B., Tysonova K., Serwaczak A., Buczek E., Bernabeu C., Lopez-Novoa JM., Chlopicki S., Nachtigal P. *Práce je přijata časopisem J Vasc Res* (2016); (IF= 2.186) * These authors contributed equally to this work.

- IV. **Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction.** Rathouska J., Jezkova K., Nemeckova I., Nachtigal P.; *Atherosclerosis* 243 (2015) 383-388; (IF= 3.994)