

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

## **Sledování exprese endoglinu během aterogeneze**

## **The endoglin expression during atherogenesis**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.

Hradec Králové 2009

Lenka Večeřová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

„Ráda bych poděkovala PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za odborné vedení a cenné rady při sestavování mé diplomové práce. Mé poděkování rovněž patří Grantové agentuře Univerzity Karlovy, grant č. 150/50/85009. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem svým blízkým za velkou podporu.“

## **Abstrakt**

Lenka Večeřová

Sledování exprese endoglinu během aterogeneze

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce:

Sledovali jsme expresi endoglinu během aterogeneze v cévní stěně myší a pokusili se nalézt případné rozdíly v expresi zvířat s různými hladinami cholesterolu a různým stupněm rozvoje aterosklerózy.

Metody:

Použili jsme samice kmene C57BL/6J a dále samice s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, ve věku 8 a 16 týdnů. Byla provedena biochemická analýza vzorků krve a imunohistochemická analýza odebraných segmentů tkáně, které tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Pro detekci exprese endoglinu byla použita metodika Avidin-Biotin (ABC) s detekcí pomocí DAB.

Výsledky:

Pomocí biochemické analýzy jsme zjistili signifikantní nárůst hladin cholesterolu u 8 a 16 týdenní hyperchol. skupiny ve srovnání s 16 týdenní C57BL/6J. Podávání cholesterolu ve stravě také vedlo k signifikantnímu nárůstu hladin cholesterolu u 16 týdenních apoE/LDLr deficientních myší ve srovnání s 8 týdenní skupinou se standardní dietou. Imunohistochemická analýza ukázala velmi silnou expresi endoglinu na endotelu aorty v aortálním sinu, u všech skupin zvířat. Exprese byla nejsilnější u skupiny zvířat s nejvyšším cholesterolem a největšími aterosklerotickými pláty. Dále jsme zjistili, že exprese endoglinu je mimo aortální sinus velmi nízká a viditelná jen na endotelu plátů.

Závěr:

Exprese endoglinu tedy ukázala na jisté rozdíly v jeho lokalizaci ve vztahu k hladinám cholesterolu a přítomným aterosklerotickým plátům.

# Abstract

Lenka Večeřová

The endoglin expression during atherogenesis

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

## Background:

The aim of this diploma thesis is to analyze the endoglin expression in mice aorta and try to describe differences in the expression between animals with various levels of cholesterol and with different stage of the development of atherosclerosis.

## Methods:

Female C57BL/6J mice and female apoE/LDLr deficient mice, ages 8 and 16 weeks were used in the study. Biochemical analysis of blood samples and immunohistochemical analysis, of aorta were performed. For identification of endoglin expression was used Avidin-Biotin (ABC) method with DAB visualization.

## Results:

Biochemical analysis revealed significantly increased levels of cholesterol in 8 and 16 weeks hypercholesterolemic groups compared to 16 weeks C57BL/6J mice. There were also significantly increased levels of cholesterol in cholesterol-fed 16 weeks apoE/LDLr deficient mice compared with 8 weeks group fed with chow diet. Immunohistochemical analysis demonstrated very intensive expression of endoglin on the endothelium in aorta in aortic sinus, in all groups of mice. The expression was the most intensive in animal group with the highest cholesterol and with the largest atherosclerotic plaques. Expression of endoglin outside aortic sinus was very low and if ever it was detected on the surface of plaque only.

## Conclusion:

This work demonstrates some differences in localization of endoglin expression in relation to cholesterol levels and atherosclerosis plaques presence.

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Mikroskopická anatomie cév .....</b>	<b>8</b>
2.1 Kapiláry .....	8
2.2 Arterie .....	9
2.3 Žíly.....	10
<b>3. Ateroskleróza a zánět .....</b>	<b>11</b>
3.1 Počáteční fáze aterosklerózy.....	13
3.2 Mechanismus vzniku a rozvoje aterosklerózy .....	13
3.3 Histologická klasifikace aterosklerotických lézí .....	14
3.4 Stabilita aterosklerotického plátu.....	16
3.5 Lipoproteiny a zánět .....	17
<b>4. TGF-<math>\beta</math> a jeho význam v aterogenezi.....</b>	<b>18</b>
4.1 Cytokiny z rodiny TGF- $\beta$ .....	18
4.2 TGF- $\beta$ a aterogeneze.....	18
<b>5. Endoglin.....</b>	<b>20</b>
5.1 Endoglin a HHT .....	20
5.2 TGF- $\beta$ a endoglin.....	21
5.3 Endoglin a eNOS .....	22
<b>6. Myší modely aterosklerózy .....</b>	<b>24</b>
<b>7. Cíl práce.....</b>	<b>26</b>
<b>8. Experimentální část .....</b>	<b>27</b>
8.1 Zvířata a předepsaná dieta .....	27
8.2 Biochemická analýza .....	27
8.3 Imunohistochemie.....	28
8.4 Statistická analýza.....	30
<b>9. Výsledky.....</b>	<b>31</b>
9.1 Biochemická analýza .....	31
9.2 Imunohistochemická analýza.....	32
<b>10. Diskuze.....</b>	<b>40</b>
<b>11. Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>12. Seznam zkratek .....</b>	<b>44</b>
<b>13. Literatura .....</b>	<b>46</b>

# 1. Úvod

V průmyslově vyspělých zemích jsou kardiovaskulární onemocnění (KVO) hlavní příčinou mortality. U nás i v dalších zemích Evropy je nejčastější příčinou kardiovaskulární mortality ischemická choroba srdeční (ICHS), která je způsobena koronární aterosklerózou. Na druhém místě je ischemická cévní mozková příhoda (1). Tato onemocnění se také podílejí na nemocnosti, pracovní neschopnosti a stupňujících se výdajích na zdravotnictví.

Ateroskleróza je chronické onemocnění cévní stěny, respektive intimy. Je doprovázeno nahromaděním cholesterolu, fibrózní tkáně, některých dalších krevních komponent a změnami v medii cévní stěny. Vzniká jako specifická reakce na nespecifické poškození cévní stěny (1).

Toto onemocnění má řadu let asymptomatický průběh, poté se manifestuje svými komplikacemi: ischemickou chorobou srdeční, ischemickou cévní mozkovou příhodou nebo ischemickou chorobou dolních končetin.

Jde o onemocnění, kde není přesně známá příčina vzniku, ale je popsána řada faktorů, které se na jejím rozvoji podílejí. Dle současných znalostí jde o faktory, které poškozují cévní endotel a navozují tak první stádium tohoto onemocnění – endoteliální dysfunkci. Dominantní postavení mezi těmito rizikovými faktory má zvýšená koncentrace LDL cholesterolu (1).

Terapie aterosklerózy spočívá v ovlivnění rizikových faktorů, především se využívá hypolipidemická, anti-hypertenzní a antikoagulační léčba. Ovšem tyto přístupy samo onemocnění neléčí, pouze ovlivňují vznik komplikací. Mnohem větší význam má prevence, nejčastěji zmiňované omezení živočišných tuků a dostatek fyzické aktivity.

Zvýšený výskyt a závažnost onemocnění srdce a cév dávají podnět ke zkoumání jejich vzniku a rozvoje. Porozumění molekulárním mechanismům, které jsou odpovědné za vznik zánětlivé reakce během aterogeneze, nám může pomoci rozvinout nové terapeutické přístupy pro kontrolu, léčbu a prevenci aterosklerózy do budoucna.

## 2. Mikroskopická anatomie cév

Stěny krevní cévy se obvykle skládají z několika vrstev neboli tunik (2).

*Tunica intima:* Vnitřní výstelku cévní stěny tvoří jediná vrstva endotelových buněk tunika intima. Tyto buňky jsou uloženy na bazální membráně tvořené především kolagenem IV, glykoproteinem lamininem a proteoglykany. Pod endotelem se nachází vrstva subendotelového řídkého vaziva, která může obsahovat i hladkosvalové elementy a to zejména u artérií svalového a elastického typu.

*Tunica media:* Skládá se ze šroubovitě vyvinutých koncentrických hladkých svalových buněk. Mezi hladkosvalovými elementy se nacházejí v různém množství vlákna elastická, kolagenní vlákna (především kolagen typu III) a proteoglykany. Zdrojem tohoto extracelulárního materiálu jsou hladkosvalové buňky. Tunica media je oddělena od zevní adventicie elastickou blankou nazvanou lamina elastica externa a od intimy elastickou blankou nazvanou lamina elastica interna.

*Tunica adventicia:* Je tvořena podélně orientovanými kolagenními (především typ I) a elastickými vlákny. U cév s větším průsvitem se zde nacházejí fibroblasty a tukové buňky, ale také lymfatické cévy, nervy a vasa vasorum. Adventicie poté plynule přechází do vaziva, kterým céva prochází (2).

Oběhový systém obvykle dělíme na oddíl makrocirkulační (cévy o průměru  $> 0,1$  mm), ke kterému lze přiřadit arterie a žíly, a oddíl mikrocirkulační (cévy viditelné jen ve světelném mikroskopu), ke kterému patří zejména kapiláry.

### 2.1 Kapiláry

Kapiláry se skládají z jediné vrstvy endotelových buněk stočených do trubice uzavírající cylindrický prostor. Kapiláry mají malý průsvit, v průměru od 7 do 9  $\mu\text{m}$ . Jejich délka se obvykle pohybuje mezi 0,25 až 1 mm. Na různých místech jsou podél kapilár a malých venul rozmístěny pericyty, mezenchymové buňky s dlouhými výběžky, které částečně obepínají endotelie. Přítomnost myosinu, aktinu a tropomyosinu v pericytech naznačuje, že mají kontrakční schopnost. Pericyty zastupují v těchto nejmenších cévách tuniku medii. Kapiláry jsou také obklopeny tenkou vrstvou kolagenních vláken, které jsou ekvivalentem adventicie (3).



## 2.2 Arterie

Arterie dělíme podle velikosti na arterioly, svalové arterie středního, či velkého kalibru a velké elastické arterie (3).

a) *Arterioly*: Mají obecně průměr menší než 0,5 mm a relativně úzký průsvit. Jejich lumen je vystlán endotelovými buňkami. Subendotelová vrstva je velmi tenká a vnitřní elastická blanka většinou zcela chybí. Svalová medie je tvořena 1-5 cirkulárně uspořádanými vrstvami hladkosvalových buněk. Adventicie je tenká a nemá vyvinutou zevní elastickou blanku.

b) *Arterie svalového typu*: Intima těchto arterií je shodná s arterioly až na to, že subendotelová vrstva je poněkud tlustší a může obsahovat i hladkosvalové buňky. Membrána elastica je zřetelně vyvinuta. Medie může obsahovat až 40 vrstev hladkosvalových buněk. Tyto buňky jsou proloženy různým počtem elastických blanek, retikulárních vláken a proteoglykanů. Membrana elastica externa je přítomna jen ve větších svalových arteriích. Adventicie je tvořena z kolagenních a elastických vláken i malého počtu fibroblastů a tukových buněk. V adventicii najdeme lymfatické cévy, vasa vasorum a nervy, které mohou pronikat až do zevních vrstev medie.

c) *Velké arterie elastického typu*: K tomuto typu řadíme aortu a její hlavní větve. Intima, silnější než v arteriích svalového typu, je vystlána endotelovými buňkami. Subendotelová vrstva je silně vyvinuta. Vazivová vlákna subendotelové vrstvy jsou orientována podélně a hrají důležitou roli při deformaci endotelu během rytmických kontrakcí a dilatací tepen. Medie je tvořena z řady perforovaných koncentricky uspořádaných elastických blanek, jejichž počet s věkem narůstá. Mezi elastickými blankami se nacházejí hladkosvalové buňky, retikulární vlákna a základní hmota obsahující především chondroitin sulfát (2).

## 2.3 Žíly

Žíly, můžeme dělit podobně jako arterie na venuly, vény malého, středního a velkého kalibru.

a) *Venuly*: Mají průměr 0,2-1 mm. Jsou tvořeny intimou skládající se z endotelu, tenké medie, neobsahující žádnou nebo jen několik vrstev hladké svaloviny. Adventicie je nejsilnější a je tvořena kolagenními vlákny.

b) *Vény malého a středního kalibru*: Tyto vény mají průměr 1-9 mm. Intima je obvykle opatřena tenkou subendotelovou vrstvou. Medie sestává z malých svazečků hladkých svalových buněk smíšených s retikulárními vlákny a jemnou síťovinou vláken elastických. Kolagenní vrstva adventicie je dobře vyvinuta.

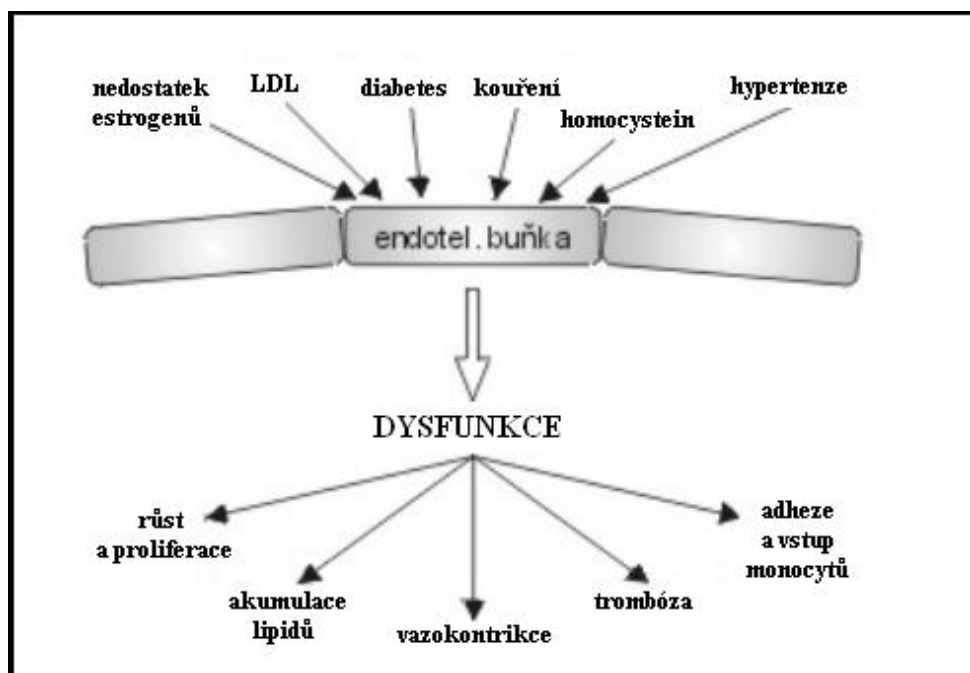
c) *Velké vény*: Jsou opatřeny dobře vyvinutou intimou. Tunica media je mnohem tenčí než u arterií a obsahuje jen několik vrstev hladkosvalových buněk a spoustu vaziva. Nejsilněji a nejlépe vyvinutá je v žilách adventicie. V žilách uložených pod úrovní srdce obsahuje adventicie podélné svazky hladké svaloviny, která se podílí společně s žilními chlopněmi na čerpání krve směrem k srdci (2).

### 3. Ateroskleróza a zánět

Ateroskleróza a její komplikace jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělé společnosti. Toto onemocnění je doprovázeno řadou rizikových faktorů, proto objasnit celý proces jejího vzniku je velmi obtížné. Obecně je přijímána představa, že ateroskleróza je specifickým typem chronického zánětlivého procesu. Který vzniká vzájemným působením mezi plazmatickými lipoproteiny, buněčnými komponentami (monocyty/makrofágy, T-lymfocyty, endotelové buňky a hladké svalové buňky) a extracelulární matrix buněčné stěny (4).

Jde o onemocnění, kde není přesně známá příčina vzniku, ale je popsána řada faktorů, které se na jejím rozvoji podílejí. Dle současných znalostí jde o faktory, které poškozují cévní endotel a navozují tak první stádium tohoto onemocnění – endoteliální dysfunkci (5).

*Obrázek 1: Endoteliální dysfunkce; hlavní příčiny a důsledky (1).*



Hlavní rizikové faktory jsou lipidové, kromě zvýšeného LDL cholesterolu jsou to zvýšené triacylglyceroly, snížený HDL cholesterol, přítomnost malých denzních LDL3 i zvýšené VLDL. Mezi další rizikové faktory patří věk, mužské pohlaví, kouření, rodinná anamnéza, hypertenze, diabetes mellitus, obezita a fyzická inaktivita (6).

**Tabulka 1: Základní rizikové faktory aterosklerózy (1).**

<b>modifikovatelné rizikové faktory</b>	<b>nemodifikovatelné rizikové faktory</b>
hypercholesterolemie	věk > 45 let muži, > 55 let ženy
kouření	rodinná anamnéza předčasné ICHS*
hypertenze	mužské pohlaví
diabetes mellitus, porušená glukózová tolerance	
fyzická inaktivita	
obezita	

\* Výskyt ICHS u prvostupňových příbuzných (sourozenci, rodiče), u mužů do 55 let věku, u žen do 65 let věku.

Původně existovaly dvě teorie vzniku aterosklerózy, **teorie lipidová** (primární příčinou aterosklerózy je akumulace lipidů v cévním endotelu) a **teorie endoteliálního poškození**. Později vznikla **sjednocená teorie aterosklerózy**, která předpokládá, že základním krokem v rozvoji aterosklerózy je endoteliální dysfunkce. Jde o lokalizované poškození endotelu, jsou obměněny jeho funkce, ale není poškozena jeho integrita. Vzniká nerovnováha mezi vazoaktivními mechanismy a hemokoagulačními působky, výsledkem je převaha vasokonstrikčních a protrombotických mechanismů, a aktivace zánětlivých a proliferačních dějů. V současné době se dostává do popředí infekční teorie (základním etiologickým agens jsou bakteriální a virové infekce). Všechny tyto teorie se prolínají a mají mnoho společných rysů (7).

Velký význam v rozvoji aterosklerózy mají také fyzikální faktory. Ty rozhodují o lokalizaci aterosklerotického ložiska. Ateroskleróza nepostihuje plošně všechny arterie, jde o lokalizovaný proces, přičemž aterosklerotická ložiska mají predilekční místa svého vzniku. Jde především o místa větvení arterií. Tato lokalizace svědčí o tom, že nejen jednotlivé rizikové faktory, ale i fyzikální faktory, hrají úlohu v rozvoji aterosklerózy. Patří sem tlakové a hemodynamické faktory, smykový stres (shear stress), změny v proudění krve. Fyziologickou adaptací na tyto podněty je zesílení

intimy, množením buněk hladké svaloviny. Pokročilé aterosklerotické léze se vyvíjí z tukových proužků právě v místech adaptivního zesílení intimy (8).

### **3.1 Počáteční fáze aterosklerózy**

Charakteristickým morfoloogickým znakem časně fáze aterosklerózy jsou tukové proužky, které tvoří buňky obsahující lipidy. Vyskytují se pod endotelovou vrstvou ve velkých cévách. Je prokázáno, že tyto buňky pocházejí z krevních monocytů, které se diferencovaly na makrofágy (9). V subintimálním prostoru tyto makrofágy pohlcují velké množství tukových částic a přeměňují se na tzv. pěnové buňky.

Tři hlavní lipoproteiny, které jsou považovány za aterogenní (LDL, Lp(a) a  $\beta$ -VLDL), jsou často pozorovány v aterosklerotických lezích (10). V prostoru intimy dochází k jejich chemické modifikaci, nejčastěji oxidaci, vedoucí k řadě biologických reakcí.

Tyto změny LDL částic vedou k tomu, že tyto oxLDL nejsou rozpoznány původními LDL receptory a jejich metabolismus a eflux z cévní stěny je narušen. Namísto toho, tyto modifikované LDL jsou rozpoznány modifikovanými LDL receptory (acetyl-LDL receptor), které se nazývají „scavenger receptory“ (9). Dochází k jejich kumulaci v cévní stěně.

V patogenezi aterosklerózy je zapojena i buněčná imunita. V lézích v blízkosti makrofágu a pěnových buněk bývají roztroušeny T-lymfocyty. Bylo prokázáno vzájemné působení mezi T buňkami a makrofágy. Kdy T buňky se aktivně zapojují do rozvoje aterosklerotické léze uvolňováním řady různých cytokinů. Jedním z nejdůležitějších cytokinů odvozených z T-lymfocytů je interferon gama  $\text{INF-}\gamma$ , který hraje roli v procesu tvorby pěnových buněk, v inhibici proliferace hladkých svalových buněk a produkci enzymů ovlivňujících stabilitu plátu (11).

### **3.2 Mechanismus vzniku a rozvoje aterosklerózy**

Na počátku dochází k adhezi monocytů, která je spuštěna přítomností adhezních molekul na endotelových buňkách. Mezi nejvýznamnější patří například VCAM-1, ICAM-1, P-selektin, E-selektin (12). Zvýšená exprese těchto molekul je považována za příčinu adheze T-lymfocytů a makrofágů k endotelovým buňkám. Zvýšené hodnoty

aterogenních lipoproteinů a cytokinů souvisí se zvýšeným výskytem těchto adhezních molekul in vitro (13).

Pro potvrzení teorie, že tyto adhezní molekuly hrají důležitou roli v počáteční fázi, byly použity myší modely s deficitem VCAM nebo ICAM-1. Bylo zjištěno, že VCAM má větší význam než ICAM-1 v iniciaci adheze monocytů na buňky endotelu (14).

Po navázání monocytů a T-lymfocytů na povrch cévní stěny, dochází k jejich migraci do subendoteliálního prostoru. Zde jsou diferencovány a přeměněny na makrofágy a pěnové buňky. Migrace je vyvolána přítomností chemoatraktantů v intimě, všechny musí splňovat dvě podmínky. A to přítomnost v intimě a působit specificky jako chemoatraktanty pro monocyty nebo lymfocyty. Patří sem oxLDL, Lp(a), cytokiny (IL-1, TNF $\alpha$ , MCP-1) a degradovaný kolagen a elastin (4).

### 3.3 Histologická klasifikace aterosklerotických lézí

Díky „American Heart Association“ byla v roce 1995 stanovena podrobná histologická klasifikace aterosklerotických změn, kde je popsáno 6 základním typů lézí (15, 16).

*Léze typu I:* Vývoj aterosklerózy lze pozorovat již v dětském věku ve formě izolovaných pěnových buněk. Tyto léze nejsou patrné pouhým okem, jsou to pouze mikroskopicky, či biochemicky detekovatelná první depozita lipidů v intimě cévy.

*Léze typu II:* Postupně vznikají souvislé vrstvy pěnových buněk tzv. „fatty streaks“ (tukové proužky) z makrofágů v intimě. Jsou viditelné makroskopicky jako žlutavé proužky, tečky nebo skvrny na povrchu intimy. Lipidy jsou zde uloženy výhradně intracelulárně. Jedná se hlavně o estery cholesterolu, cholesterol a fosfolipidy. Tukové kapénky se rovněž objevují v buňkách hladké svaloviny medie. Rozlišují se léze typu IIa a IIb, přičemž léze typu IIa jsou obecně více náchylné k progresi.

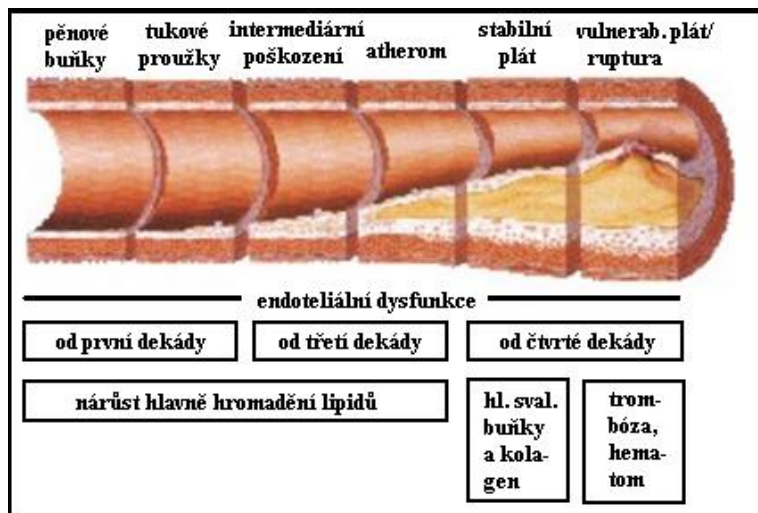
*Léze typu III:* Pro další stupeň vývoje aterosklerózy je charakteristická přítomnost extracelulárně uložených lipidů pod proužky makrofágů a pěnových buněk, často mezi vrstvami hladkých svalových buněk. Tyto lipidy obsahují více volného cholesterolu. Nazývá se také jako střední léze, přechodná léze a preateroma. Tento typ již může vést k rozvoji a manifestaci ischemie.

*Léze typu IV (ateromy):* Při nahromadění extracelulárních lipidů a rozpadu pěnových buněk vzniká lipidové jádro, obsahující krystaly cholesterolu a depozity kalcia. Makrofágové pěnové buňky a T-lymfocyty jsou hustě koncentrovány na periferii léze. Buňky hladké svaloviny jsou přítomny málo a také je zde malé množství extracelulární matrix. U tohoto typu hrozí prasknutí.

*Léze typu V:* Dále rozvíjející se léze se projevuje vystupující pojivovou tkání, obsahuje zvýšené množství kolagenu a hladkých svalových buněk. Tento typ léze se ještě dále rozděluje na typ Va (fibroaterom), který obsahuje lipidové jádro. Dalším histologickým znakem je rozrušení a poškození hladké svaloviny medie přiléhající k plátu. V medii i adventicii lze nalézt rozsáhlé akumulace makrofágů, T-lymfocytů, či žírných buněk. Typ Vb je kalcifikovaným typem léze, kde se kalcifikace objevuje zejména v místech předchozího výskytu nekrotické tkáně. Typ Vc je charakteristický nízkým obsahem lipidů, ale způsobuje často významné zužování arterií. Obecně je typ V již klinicky velmi významný, může se z něj vytvořit ruptura, hematom anebo trombus (spíše u VI typu).

*Léze typu VI (komplikované):* Jde vlastně o komplikace lézí IV a V. Léze VIa je ruptura, VIb hematom nebo hemoragie, VIc je trombóza a kombinací všech 3 typů představuje léze VI abc. Právě tyto léze jsou tedy konečným a klinicky zcela zásadním problémem aterosklerózy. Dojde-li k ruptuře aterosklerotické léze, iniciuje se tvorba trombu. Narůstající trombus uzavírá průsvit arterie a v daném místě vzniká ischemie. Trombóza nasedající na lézi je příčinou infarktu myokardu, nestabilní anginy pectoris nebo náhlé smrti.

**Obrázek 2: Vývoj aterosklerózy (I).**

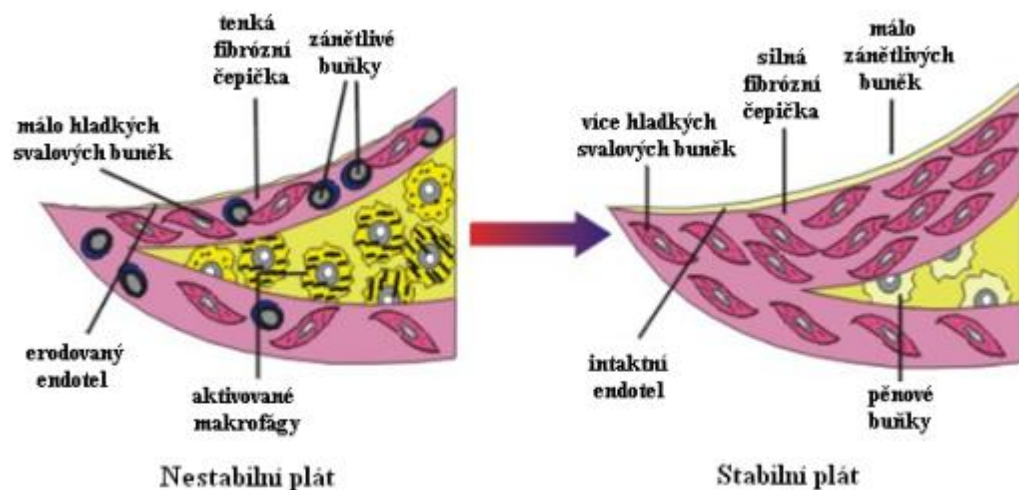


### 3.4 Stabilita aterosklerotického plátu

Typický plát (aterom, fibrózní plát) obsahuje lipidové nebo nekrotické jádro kryté fibrózní vrstvou tzv. čepičkou. Ta se skládá ze směsi hladkých svalových buněk a mimobuněčné hmoty. Základ léze tvoří pěnové buňky a T-lymfocyty. Tyto složky ovlivňují stabilitu plátu (17).

Rozlišujeme dva typy plátů. Stabilní plát se nejčastěji skládá z malého tukového jádra a silné fibrózní čepičky obsahující hladké svalové buňky a mimobuněčnou hmotu. Představuje riziko zúžení až uzavření cévy. Nestabilní plát tvoří velké lipidové jádro, tenká čepička a velké množství buněk zánětu (makrofágy a lymfocyty). Hrozí jeho prasknutí a vznik trombózy (18).

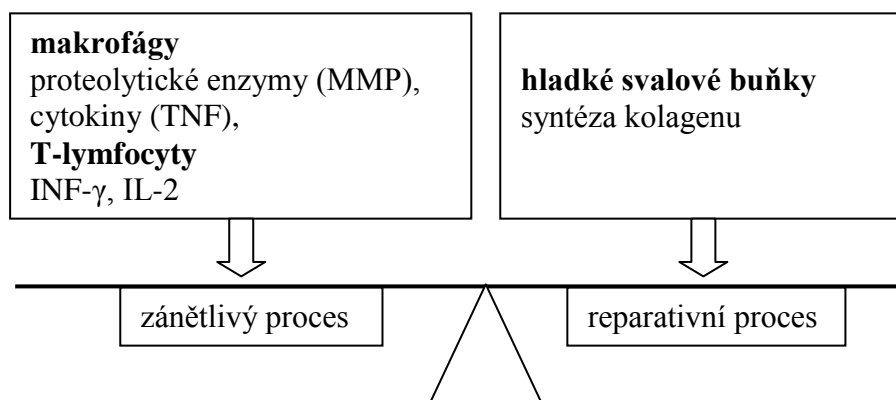
Obrázek 3: Schéma stabilního a nestabilního aterosklerotického plátu (1).



Makrofágy produkují matrix metaloproteinázu (MMP), která přispívá k rozkladu tenké čepičky a zesiluje tak možnost prasknutí plátu. Řada cytokinů (TNF, IL-1, MG-CSF) také zvyšuje sekreci MMP (19). T-lymfocyty uvolňují  $\text{INF-}\gamma$ , prostřednictvím kterého tlumí proliferaci hladkých svalových buněk a ovlivňují tak stabilitu plátu.



**Obrázek 4: Buněčné elementy v aterosklerotickém plátu (1).**



### 3.5 Lipoproteiny a zánět

Není pochybnost o souvislosti mezi hladinou krevních lipidů a rozvojem aterosklerózy. Bylo prokázáno, že aterogenní lipoproteiny typu oxidovaný LDL, zbytkový  $\beta$ -VLDL a lipoprotein Lp(a) vykazují přímé či nepřímé pro-zánětlivé účinky. Zatímco lipoprotein typu HDL má protizánětlivou funkci.

Vysoké plazmatické hladiny aterogenních lipoproteinů spouštějí řadu dějů vedoucích k rozvoji aterogeneze v cévní stěně. Dochází k adhezi monocytů a lymfocytů k endotelu a následné migraci těchto buněk do intimy. Tento proces je zprostředkován adhezními molekulami a cytokiny v arteriální stěně (20).

Oxidované LDL částice mohou vyvolat zvýšenou expresi adhezních molekul na endotelových buňkách, dále spouštějí migraci monocytů do intimy a stimulují produkci zánětlivých mediátorů (např. endotelin-1), které vyvolávají různé reakce v cévní stěně. Lp(a) vede také k rozvoji zánětlivého procesu. Zvyšuje expresi adhezních molekul, přitahuje monocyty a ovlivňuje proliferaci hladkých svalových buněk (21).

Naproti tomu HDL jako anti-aterogenní lipoprotein chrání proti rozvoji aterosklerózy. Má schopnost zpětně transportovat cholesterol z tkání, působí tak jako protizánětlivý faktor.

Vzhledem k přítomnosti zánětlivé reakce během aterogeneze, by protizánětlivé látky mohli být z tohoto pohledu v budoucnu použity při terapii aterosklerózy (22).

## 4. TGF- $\beta$ a jeho význam v aterogenezi

Členové rodiny transformujících růstových faktorů, TGF- $\beta$  a BMPs (bone morphogenetic proteins), jsou cytokiny s různou funkcí na cévní buňky. Významně regulují vývoj cév, jejich remodelaci a mají klíčovou roli v procesu aterosklerózy a restenózy. TGF- $\beta$  kontroluje odpověď T buněk a stimuluje hladké svalové buňky k produkci kolagenu, tím ovlivňuje fenotyp aterosklerotické léze (23).

### 4.1 Cytokiny z rodiny TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  a BMPs jsou nejvíce studované cytokiny z této skupiny. Ovlivňují řadu klíčových funkcí a jsou spojeny s poruchami cév jako je ateroskleróza, plicní hypertenze, hereditární hemoragická teleangiektázie (HHT) a restenóza.

Izoformy TGF- $\beta$  jsou TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3. Jsou exprimovány buňkami cévní stěny, endotelovými buňkami, hladkými svalovými buňkami (VSMCs), makrofágy a lymfocyty. Mají schopnost modulovat vývoj cévy, diferenciaci buněk, proliferaci, migraci, tvorbu extracelulární matrix a ovlivňují i buněčnou imunitu.

Jejich signál je zprostředkován heteromerním receptorovým komplexem typu I nebo typu II. Ten aktivuje signální cestu na Smad proteinech závislou nebo nezávislou. Následuje kaskáda dějů, která vede k interakci s transkripčními faktory v jádře. Dochází buď k aktivaci cílových genů, nebo k zastavení transkripce (24).

### 4.2 TGF- $\beta$ a aterogeneze

TGF- $\beta$  a jeho receptory jsou hojně exprimovány hladkými svalovými buňkami, makrofágy a T buňkami v aterosklerotické lézi právě během vývoje tukových proužků a vzniku plátu (25).

TGF- $\beta$  stimuluje chemotaxi leukocytů a produkci proteoglykanu hladkými svalovými buňkami, tím pravděpodobně přispívá k časně migraci makrofágů a hromadění tukových látek v lézi (23).

TGF- $\beta$  se zdá se být důležitý i pro stabilitu plátu, kde se pravděpodobně podílí na tvorbě vaziva fibromuskulární čepičky. Hladké svalové buňky exprimují větší množství TGF- $\beta$  v stabilní lézi než v nestabilní (26). Prostřednictvím cytoplazmatických

proteinů Smad zvyšuje TGF- $\beta$  genovou expresi kolagenu. Hladké svalové buňky vykazují různou schopnost reagovat na TGF- $\beta$  v závislosti na typu aterosklerotické léze. Uvnitř fibrózního plátu produkují hladké svalové buňky Smad proteiny, které jsou důležité pro funkci TGF- $\beta$ . V lézi bohaté na tuky a makrofágy neexprimují hladké svalové buňky Smad proteiny a tak schopnost produkovat kolagen jako odpověď na TGF- $\beta$  je snížena (27).

Nepřítomnost TGF- $\beta$  vede k deregulaci T-lymfocytů a následně k rozvoji zánětu. Zvětšuje se rozsah léze a vyvíjí se nestabilní typ plátu (28). Byly identifikovány markery typu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulující vývoj a funkci T buněk. TGF- $\beta$  ovlivňuje expresi Foxp3, což je transkripční faktor inhibující funkci CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulovaných T buněk.

Zdá se tedy, že TGF- $\beta$  má v rozvoji aterosklerózy protektivní úlohu. Z výše uvedeného vyplývá, že TGF- $\beta$  podporuje stabilní fenotyp plátu dvěma mechanismy. Stimuluje biosyntézu kolagenu prostřednictvím hladkých svalových buněk a inhibuje aktivaci T buněk, buď přímo, nebo přes CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (29).

## 5. Endoglin

Endoglin (CD105) je 180-kDa homodimerní transmembránový glykoprotein, který je primárně exprimovaný na endotelových buňkách. Je zapojen do procesu angiogeneze, do vývoje kardiovaskulárního systému a ovlivňuje cévní homeostázu (30).

Endoglin je součástí TGF- $\beta$  receptorového komplexu. Společně s TGF- $\beta$  receptory typu I a II je schopen vázat TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 3 (31).

Je tvořen třemi doménami. Extracelulární doména se skládá z 561 aminokyselin, transmembránová doména z 25 aminokyselin, a 47 aminokyselin tvoří intracelulární část. Studie ukázaly, že endoglin se vyskytuje ve dvou různých isoformách, L (long) a S (short), ty se liší v počtu aminokyselin v intracelulární části (32).

Endoglin byl nejdříve nalezen na lidských pre-B leukemických buňkách. Následně byla popsána jeho exprese endotelovými buňkami, aktivovanými makrofágy, fibroblasty, cévními hladkými svalovými buňkami a buňkami syncytiotrofoblastu (33).

Jeho výskyt i mimo endotel podpořil teorii, že exprese endoglinu ovlivňuje i další chorobné procesy jako je ateroskleróza. Exprese endoglinu byla nalezena v lidských aterosklerotických plátech společně s TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ R2, zatímco tato exprese byla velmi nízká ve zdravých cévách (34). Dále byla exprese endoglinu pozorována také v hladkých svalových buňkách aterosklerotických plátů (35). Zatím lze pouze říci, že role endoglinu v procesu aterogeneze zatím není zcela jasná. V posledních letech byla dále sledována role endoglinu ve vztahu k preeklampsii (36)

Význam endoglinu během proliferace endotelových buněk byl podpořen jeho zvýšeným nálezem v nových cévách tumorů (33).

Endoglin má regulující funkci v signální dráze TGF- $\beta$ . Sám nedokáže navázat TGF- $\beta$ 1 nebo TGF- $\beta$ 3, je nutná přítomnost TGF- $\beta$ R2. Významná role endoglinu spočívá v regulaci TGF- $\beta$  navozené inhibici migrace hladkých svalových buněk (37).

### 5.1 Endoglin a HHT

Hereditární hemoragická teleangiektázie (HHT) neboli Rendu-Osler-Weberův syndrom. Jde o autozomálně-dominantně dědičné onemocnění, pro které je charakteristické opakující se krvácení z nosu, mukokutánní rozšíření kapilár a malformace arterií a vén různých orgánů (mozek, játra, plíce) (33).

Podstatou tohoto onemocnění je mutace dvou genů (ENG a ALK1). Rozlišuje se několik typů, přičemž typ HHT1 závisí na mutaci endoglinu. Gen kódující endoglin byl identifikován jako cílový pro rozvoj tohoto vaskulárního onemocnění (38).

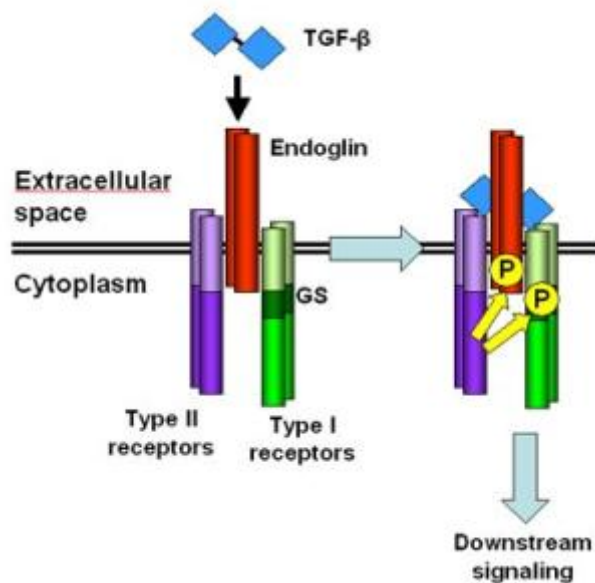
## 5.2 TGF- $\beta$ a endoglin

Úloha endoglinu v angiogenezi a dalších vaskulárních poruchách není přesně známa, ale bylo popsáno, že souvisí s TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  účinkuje prostřednictvím svých receptorů, které se označují TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII. Kromě těchto dvou existuje také tzv. „pomocný“ TGF- $\beta$ RIII - endoglin (CD105) (39).

Endoglin je funkční součástí TGF- $\beta$  membránového receptorového komplexu. Signální kaskáda je zahájena aktivací TGF- $\beta$  receptoru typu I nebo II (serin/treonin kinázový). Následuje indukce Smad proteinů a jejich přemístění do jádra. Endoglin reguluje přenos toho signálu od TGF- $\beta$ 1 zesílením cesty přes ALK1/Smad1, tlumí cestu přes ALK5/Smad3 (26, 40) a zvyšuje signalizaci přes ALK5/Smad2 (41).

**Obrázek 5: Endoglin jako funkční součást TGF- $\beta$  receptorového komplexu.**



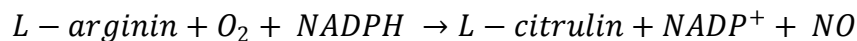
[http://www.roswellpark.org/Education/Graduate\\_Education/Departments/Immunology/Immunology\\_Research/Seon\\_Lab](http://www.roswellpark.org/Education/Graduate_Education/Departments/Immunology/Immunology_Research/Seon_Lab) (7.5.2009)

### 5.3 Endoglin a eNOS

Endoteliální syntetáza oxidu dusnatého (eNOS) tvoří oxid dusnatý (NO), což je endogenní látka uvolňována endotelovými buňkami s výraznými vasodilatačními účinky. Reguluje tak průměr krevních cév a udržuje anti-trombotické, anti-proliferativní a anti-apoptické prostředí v cévní stěně (42).

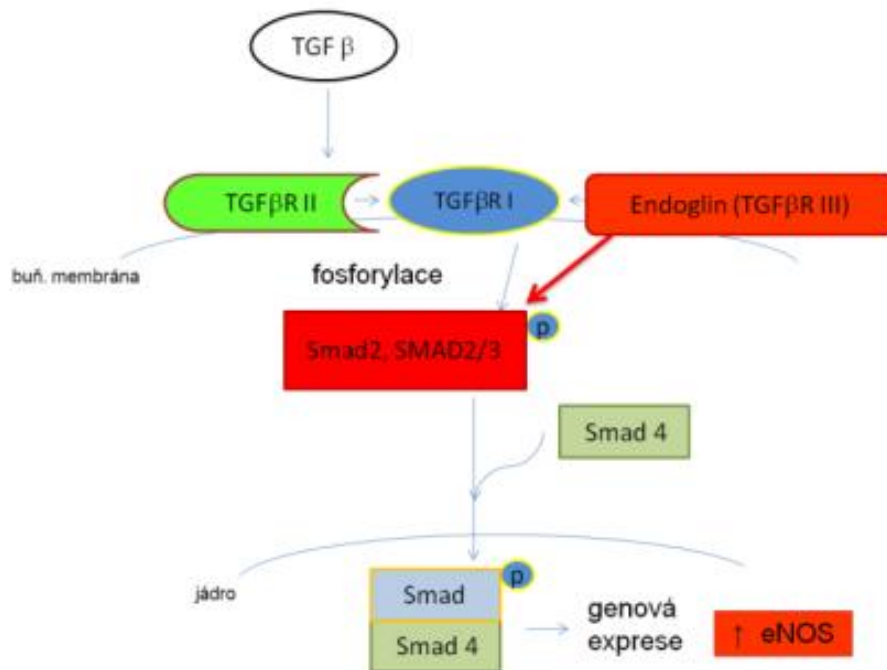
Endotelové buňky jsou vystaveny fyziologicky hemodynamickým silám, kterými působí proudící krev. Tzv. „shear stress“ může aktivovat signalizační kaskádu, která vede k indukci eNOS. Tuto aktivaci může vyvolat řada dalších stimulů, například vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), estrogen, sfingosin-1-fosfát, bradykinin (43).

eNOS zpracovává molekulární kyslík a elektron z NADPH a oxiduje substrát L-arginin na meziprodukt OH-L-arginin, který je poté oxidován na NO a L-citrulin (44).



Bylo zjištěno, že endoglin reguluje vasodilataci závislou na NO i expresi eNOS. Později byl popsán i pravděpodobný mechanismus, kterým endoglin zvyšuje expresi eNOS na cévním endotelu prostřednictvím Smad2 proteinů (in vitro) (45).

**Obrázek 6: Mechanismus působení endoglinu a možný způsob ovlivnění exprese eNOS.**  
(Nachtigal, nepublikovaná data)



Aktivace eNOS závislá na endoglinu nastává na úrovni transkripce a je regulovaná TGF-β receptorem typu I (ALK5) prostřednictvím Smad2. Specifická Smad2 signalizační kaskáda je up-regulovaná přítomností endoglinu na endoteliálních buňkách, zatímco při genové supresi endoglinu je tato cesta potlačena. Výsledky studií naznačují, že endoglin zvyšuje hladinu Smad2 posílením TGF-β signální dráhy, to vede ke zvýšené expresi eNOS v endoteliálních buňkách (45).

## 6. Myší modely aterosklerózy

Současným nejrozšířenějším modelem ke studiu aterosklerózy jsou myši, které se začaly v experimentech používat koncem 90. let 20. století.

Běžná myš není schopna rozvoje aterosklerózy (46). Důvodem je nízká hladina cholesterolu (kolem 1-1,15 mmol/l) a to hlavně v HDL frakci. Je to typické pro všechny hlodavce (47).

První experimenty na myších byly publikovány v roce 1985. Bylo prokázáno, že nejcitlivějším kmenem k rozvoji aterosklerózy byl kmen C57BL/6J (48). Úspěchem těchto studií bylo, že kmen C57BL/6J se stal základem genetických modifikací, které měly za cíl vytvořit vhodný model aterosklerózy.

V roce 1992 byl vytvořen kmen apolipoprotein E – deficitních myší (apoE<sup>-/-</sup>) (49). Apolipoprotein E (apoE) se vyskytuje na povrchu chilomikronů, VLDL, HDL, je důležitý pro interakci těchto částic s LDL receptorem v játrech a tzv. „LDL-related proteinem“. Dále je apoE důležitý pro zpětný transport cholesterolu z buněk a tkání pomocí HDL, ovlivňuje lipoproteinovou lipázu a může stimulovat produkci VLDL (50, 51). ApoE je také produkován makrofágy a inhibuje jejich přeměnu na pěnové buňky. Jeho deficit vede k poruše clearance chilomikronů, VLDL i IDL (52). Rozvoj aterosklerózy u tohoto modelu je tedy dán nárůstem hladin cholesterolu hlavně VLDL frakce (53) a je snížen zpětný transport cholesterolu z intimy cév (54). U tohoto modelu jsou daná predispoziční místa rozvoje aterosklerotických lezí, nejčastějším referenčním místem je aortální sinus, při odstupu aorty ze srdce. Dále vznikají léze v oblasti malého zakřivení aortálního oblouku, při odstupu karotid, interkostálních, mesenterických a renálních arterií, také v koronárních, femorálních a brachiocefalických arteriích (55).

Rychlost rozvoje aterosklerózy a její závažnost závisí na typu diety, jde-li o standardní nebo „vysokotukovou“ dietu (56). Příkladem je použití tzv. „Western type diet“ obsahující 21% tuku (11% nasycených) a 0,15% cholesterolu, která napodobuje složení diety u lidí (57). Podání této diety vede k rychlejší progresi aterosklerózy u těchto myší (46).

Dalším myším modelem využívaným pro studium aterosklerózy jsou LDL receptor deficientní myši (LDLR<sup>-/-</sup>) (58). Povrchové buněčné LDL receptory rozpoznávají apolipoprotein B (apoB) na LDL částicích a apoE na IDL částicích a odstraňují je z krevního oběhu. (LDLR<sup>-/-</sup>) představuje zároveň model lidské familiární hypercholesterolemie (nefunkční LDL receptor). Po podání vysoko-



tukové/cholesterolové diety dochází k nárůstu LDL a částečně i VLDL cholesterolu (20).

Posledním modelem, který je experimentálně také často využíván, je kmen s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL receptoru (apoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup>) (59). Dochází zde spontánně k vyšší hypercholesterolemii a rychlejšímu rozvoji aterosklerózy než u výše zmíněných modelů (60).

K myším modelům aterosklerózy jsou jisté výhrady, hlavně z hlediska velikosti, množství odebraného materiálu a nemožnost studovat aterogenezi jinde než v aortě.

Výhodou zvířecích modelů je možnost studovat rozsáhlou problematiku aterogeneze in vivo. Přičemž myší modely umožňují v experimentu dostatečný počet zvířat a jsou vhodné ke genetickým modifikacím.

## **7. Cíl práce**

Cílem této diplomové práce bylo sledovat expresi endoglinu během aterogeneze v cévní stěně myší. Sledovali jsme jeho expresi v kořenu aorty u normocholesterolemických C57BL/6J a u hypercholesterolemických apoE/LDLr deficientních myší ve věku 8 a 16 týdnů.

## 8. Experimentální část

V této diplomové práci jsme použili samice kmene C57BL/6J (Velaz) a dále samice s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15-20 gramů. Byly zakoupeny v Jackson Laboratories (USA) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

### 8.1 Zvířata a předepsaná dieta

Samice kmene C57BL/6J byla krmena standardní dietou až do věku zvířat 16 týdnů (n=8). ApoE/LDLr deficientní myši byly rozděleny náhodně do 2 skupin. Jedna skupina (n=8) byla krmena pouze standardní dietou a byla utracena ve věku 8 týdnů života. Druhá skupina (n=8) byla po 8 týdnech standardní diety krmena aterogenní dietou s obsahem 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů.

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

### 8.2 Biochemická analýza

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

### **8.3 Imunohistochemie**

Pro imunohistochemickou analýzu byly odebrány segmenty tkáně, které tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (*Leica, Praha, Česká republika*), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 µm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese endoglinu byla použita metodika Avidin-Biotin (ABC) s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

#### ***Primární protilátky***

K detekci exprese markeru endoglinu v cévní stěně byla použita pro světelnou mikroskopii monoklonální protilátka rat anti-mouse endoglin ve zředění 1/100 (*Pharmlingen, USA*).

#### ***Detekční systémy***

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu byl použitý diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, *DAKO, Carpinteria, USA*).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (*Vitana Corp., USA*) za pomoci softwaru NIS (*Laboratory Imaging Prague, Česká republika*).

## Pracovní postup

### *ABC metodika – detekce exprese endoglinu*

sušení tkáňových řezů v termostatu (60 minut)

fixace v acetonu (-20°C; 30 minut)

oschnutí řezů (15 minut)

1. PBS 5 minut
2. 10% serum v PBS (900  $\mu$ l PBS + 100  $\mu$ l sera) 30 minut
3. inkubace s anti-avidinem 15 minut
4. PBS 2x5 minut
5. inkubace s anti-biotinem 15 minut
6. PBS oplach
7. primární protilátka (ředí s v BSA) 60 minut
8. PBS 2x5 minut
9. 10% serum v PBS (900  $\mu$ l PBS + 100  $\mu$ l sera) 15 minut
10. sekundární protilátka (ředí se v BSA + 2% mouse serum) 30 minut
11. PBS 5 minut
12. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 70 ml PBS) 15 minut
13. PBS 2x5 minut
14. ABC komplex elite 30 minut  
**(10  $\mu$ l A + 10  $\mu$ l B do 500  $\mu$ l PBS nechat stát (30 minut))**
15. PBS 2x5 minut
16. DAB (10  $\mu$ l DAB in 500  $\mu$ l buffer) 30 sekund
17. Destilovaná voda
18. Hematoxylin **5 sekund**
19. Modrání pod tekoucí vodou z kohoutku 1 minuta
20. aceton oplach
21. aceton-xylen (10:1) (vždy dělat znova)→ aceton-xylen (1:10) 3 minuty
22. 3x xylen 2 minuty

## 8.4 Statistická analýza

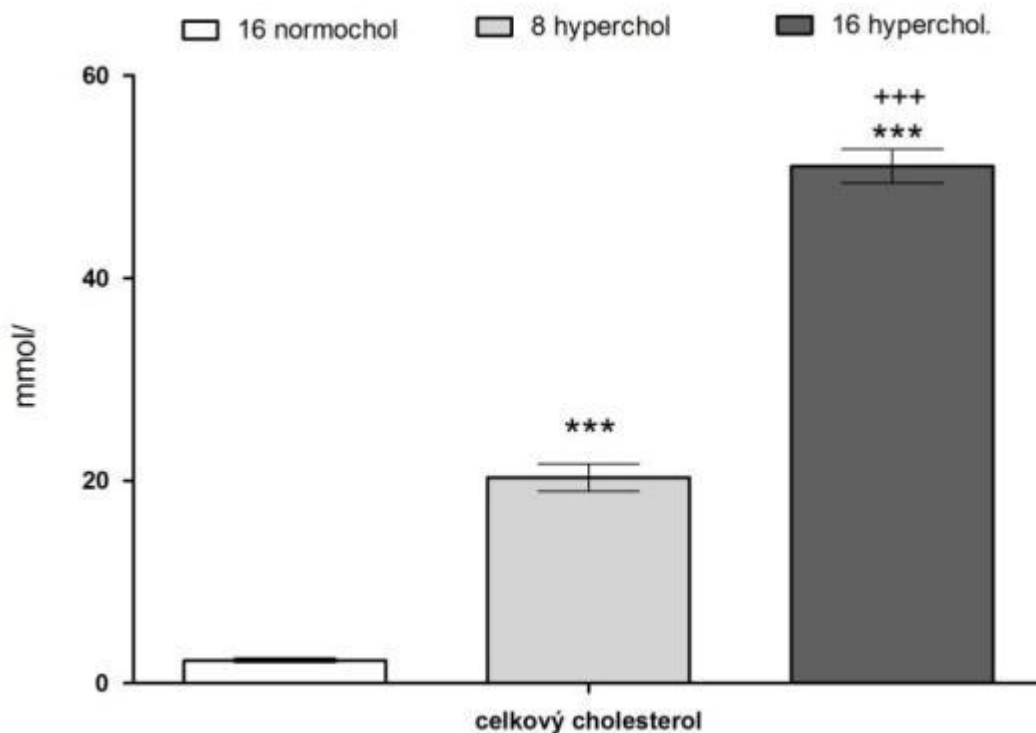
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru GraphPad. Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byla použita ANOVA analýza s následným použitím Tukeyho testu pro stanovení rozdílu mezi skupinami. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$ , kde  $\alpha=0,05$ .

## 9. Výsledky

### 9.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu. Výsledky zcela dle očekávání ukázaly výrazný a významný nárůst hladin cholesterolu u apoE/LDLr deficientních myší ve srovnání s 16 týdenními C57BL/6J ( $***P \leq 0,001$ ). Předpokládaný statisticky významný nárůst byl také pozorován u apoE/LDLr deficiencí myší krměných cholesterolem ve srovnání se skupinou bez cholesterolu ( $^{+++}P \leq 0,001$ ) (viz. Graf 1).

**Graf 1:** Hladiny celkového cholesterolu u třech skupin myší. Signifikantní nárůst je obecně pozorován u 8 a 16 týdenních hyperchol. skupin ve srovnání s 16 týdenními C57BL/6J ( $***P \leq 0,001$ ). Podávání cholesterolu ve stravě také vedlo k signifikantnímu nárůstu hladin cholesterolu u 16 týdenních apoE/LDLr myší ve srovnání s 8 týdenní skupinou ( $^{+++}P \leq 0,001$ ).



## 9.2 Imunohistochemická analýza

### *Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu*

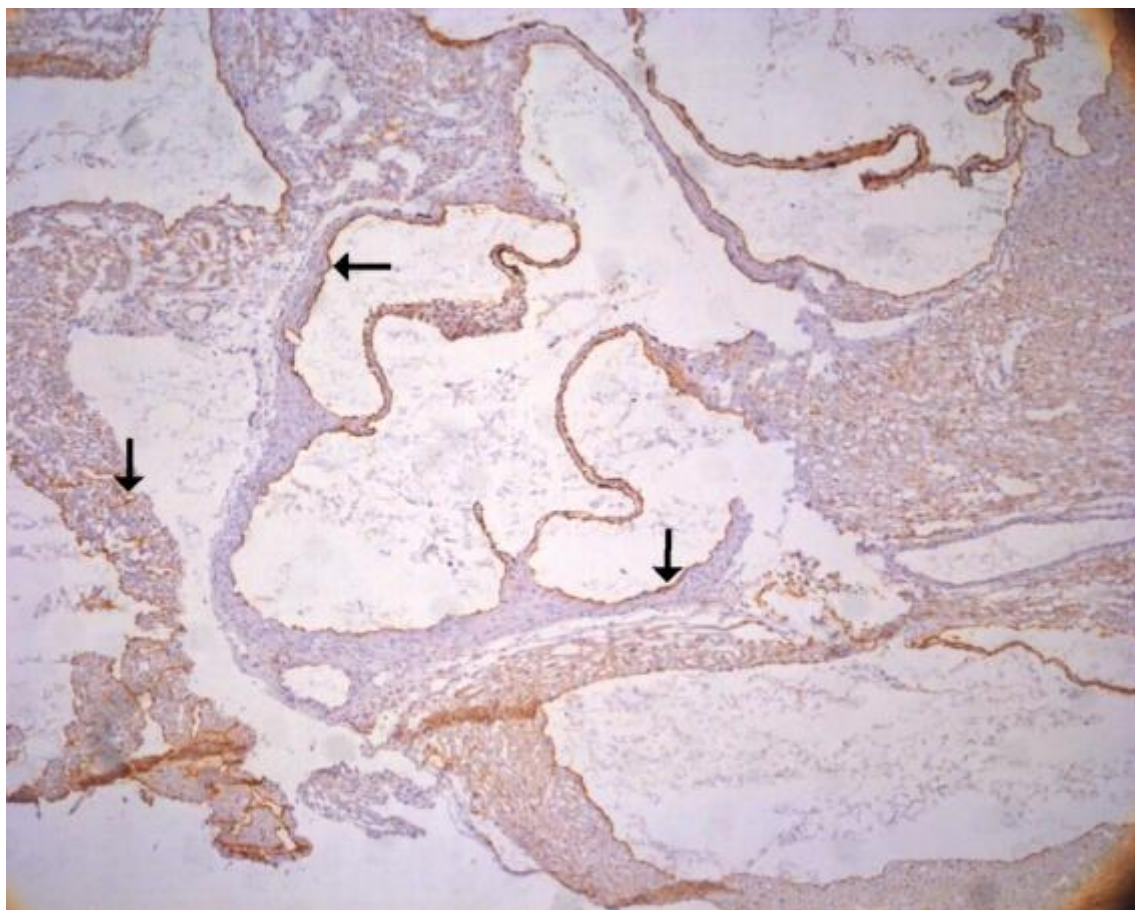
Výsledky morfologické analýzy korelovaly s biochemickými nálezy. U 16 týdenní normochol. skupiny myši nebyly nalezeny žádné morfologické změny v aortálním sinu. Překvapivě u 8 týdenní skupiny apoE/LDL receptor deficientních myši byly nalezeny pouze velmi malé léze charakteru tukových proužků a to zejména v oblasti kořene aorty. V descendentní části aorty jsme pozorovali cévy bez aterosklerotických plátů. Naproti tomu v 16 týdenní skupině byly nalezeny velké a pokročilé aterosklerotické pláty s nekrotickými jádry. Tyto nálezy poté do jisté míry korelovaly s výsledky detekce endoglinu.

Expresí endoglinu byla obecně velmi podobná u 16 týdenní normochol. skupiny zvířat a u 8 týdenní skupiny apoE/LDLr deficientních myši. Expresí endoglinu byla relativně výrazná na cévním endotelu v aortálním sinu, na srdečních chlopních, a také v malých cévách a kapilárách v okolním myokardu (obr 7 a 8). Analýza oblasti descendentní části aorty prokázala, že v obou výše zmíněných skupinách byla nalezena pouze velmi nízká exprese endoglinu (obr 9 a 10).

Naopak exprese endoglinu byla do jisté míry rozdílná u 16 týdenních apoE/LDLr deficientních myši. Zde byla rovněž silná exprese na cévním endotelu v aortálním sinu a to zejména na povrchu (endotelu) aterosklerotických plátů. Dále byla exprese detekována na srdečních chlopních a také v malých cévách a kapilárách v okolním myokardu (obr 11 a 12). Expresí byla nalezena i v oblasti descendentní aorty. Byla slabší než v aortálním sinu, nicméně i zde byla vidět hlavně na povrchu aterosklerotických plátů (obr 13).



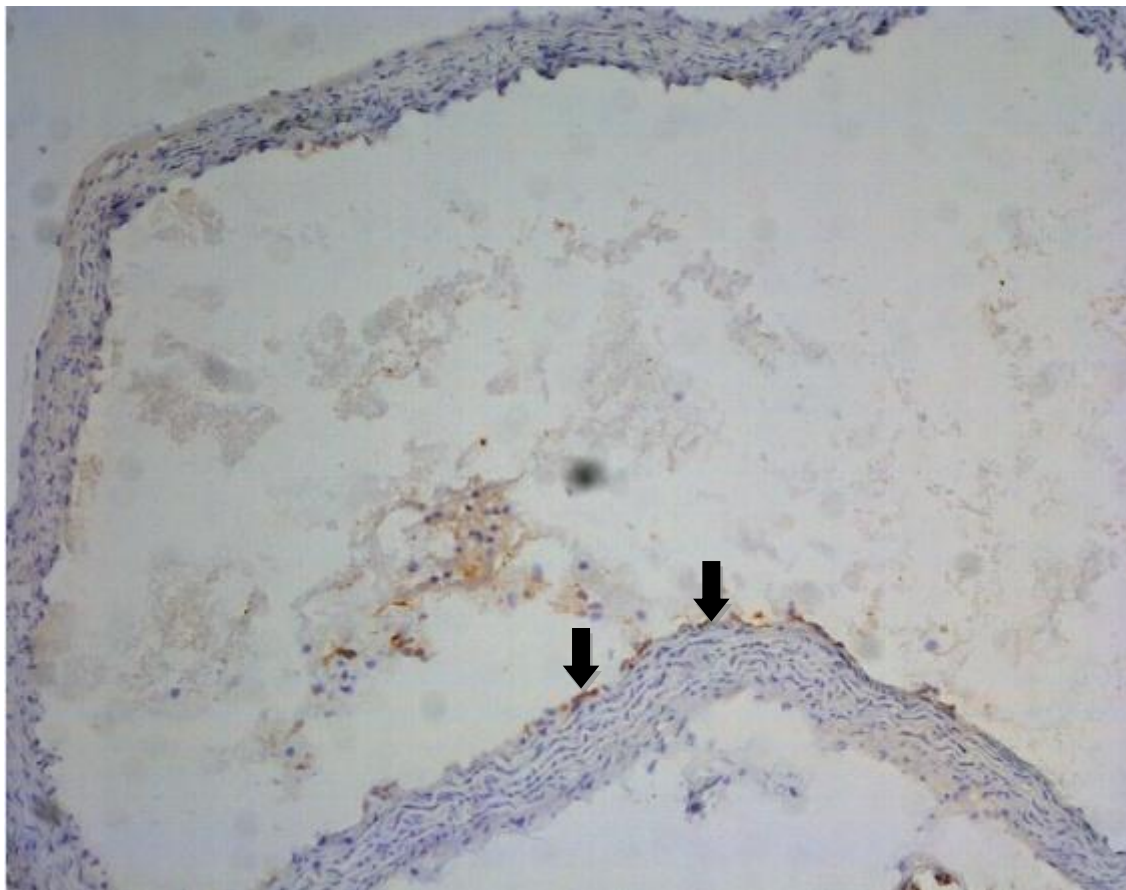
*Obrázek 7: Příklad imunohistochemického barvení endoglinu v 16 týdenní normochol. skupině a 8 týdenní hyperchol. skupině v oblasti kořene aorty. Expresie endoglinu byly v těchto skupinách téměř identické. Expresie endoglinu byla relativně výrazná na cévním endotelu v aortálním sinu, na srdečních chlopních a byla také silná v malých cévách a kapilárách v okolním myokardu (šipky). Zvětšeno 40x.*



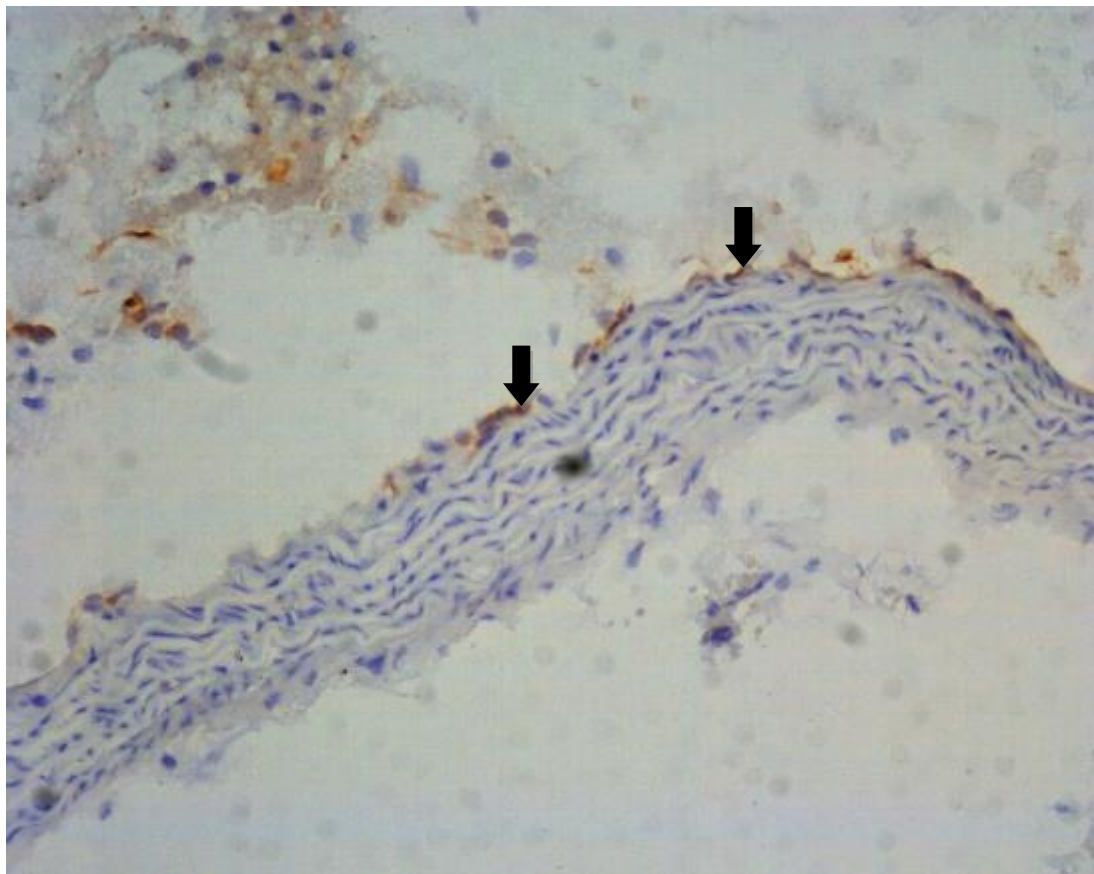
*Obrázek 8: Příklad imunohistochemického barvení endoglinu v 16 týdenní normochol. skupině a 8 týdenní hyperchol. skupině v oblasti kořene aorty. Exprese endoglinu byly v těchto skupinách téměř identické. Detail exprese endoglinu zejména na cévním endotelu a na srdečních chlopních (šipky). Zvětšeno 200x.*



**Obrázek 9: Příklad imunohistochemického barvení endoglinu v 16 týdenní normochol. skupině a 8 týdenní hyperchol. skupině v oblasti descendentní aorty. Expresie endoglinu byly v těchto skupinách téměř identické. Expresie endoglinu byla velmi slabá a detekována pouze u několika endoteliálních buněk (šipky). Zvětšeno 100x.**

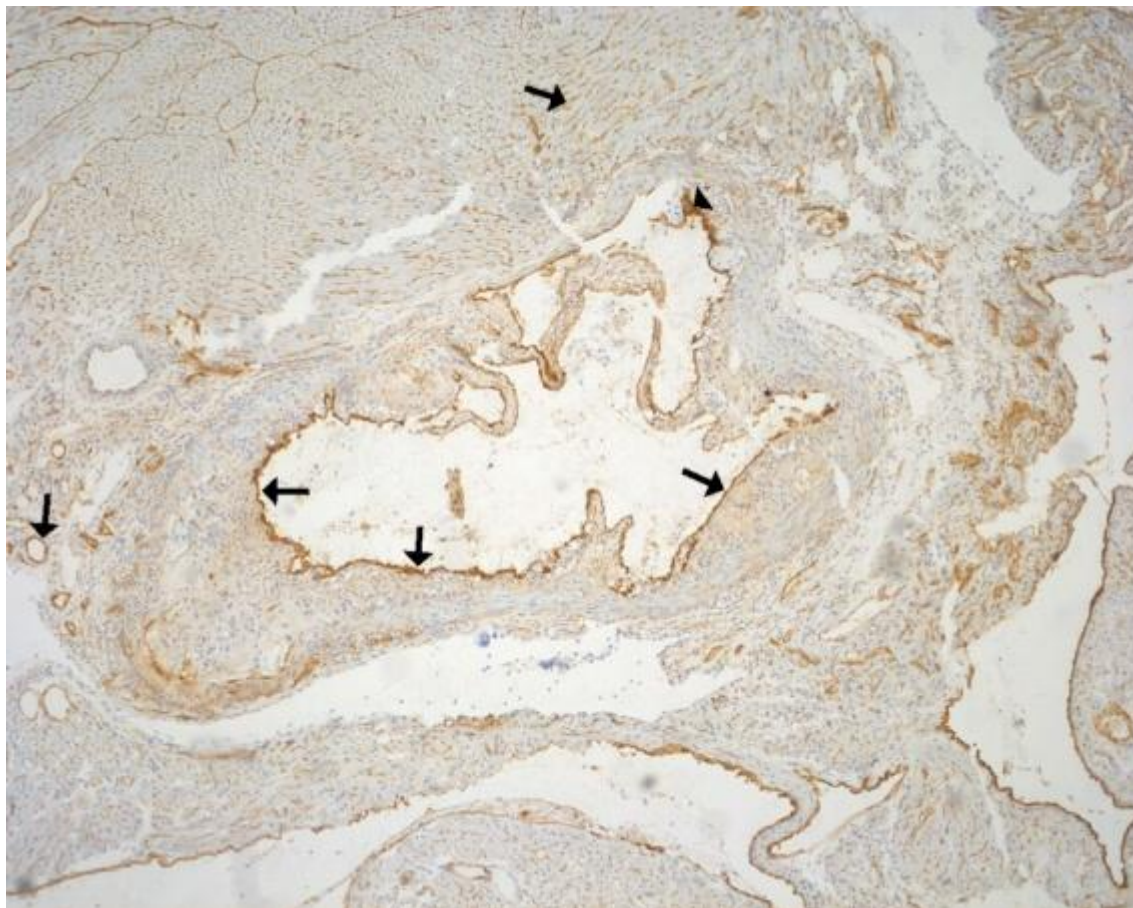


*Obrázek 10: Příklad imunohistochemického barvení endoglinu v 16 týdenní normochol. skupině a 8 týdenní hyperchol. skupině v oblasti descendentní aorty. Expresie endoglinu byly v těchto skupinách téměř identické. Detail exprese endoglinu ukazující slabou expresi pouze u několika endoteliálních buněk (šipky). Zvětšeno 200x.*

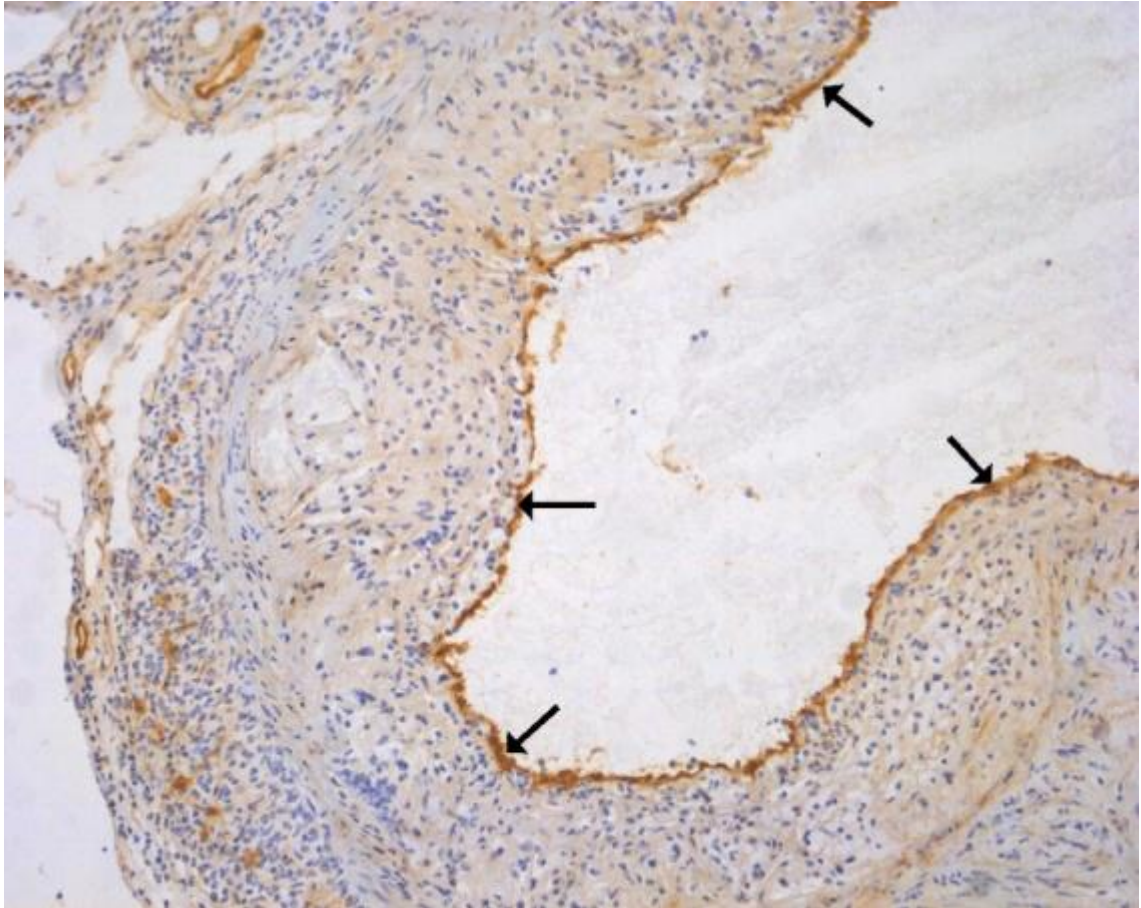




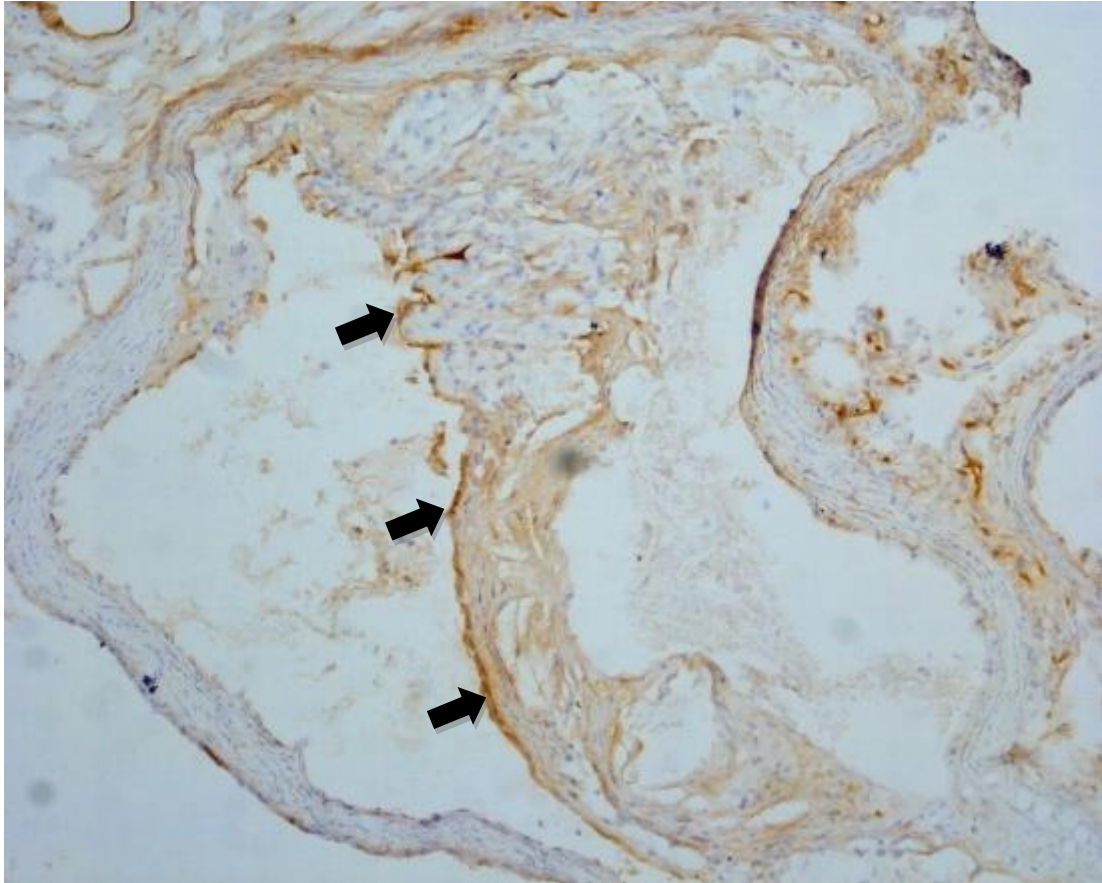
*Obrázek 11: Příklad imunohistochemického barvení endoglinu v 16 týdenní hyperchol. skupině v oblasti aortálního sinu. Silná exprese byla detekována na cévním endotelu v aortálním sinu a to zejména na povrchu (endotelu) aterosklerotických plátů. Dále byla exprese detekována na srdečních chlopních a byla také silná v malých cévách a kapilárách v okolním myokardu (šipky). Zvětšeno 40x.*



**Obrázek 12: Příklad imunohistochemického barvení endoglinu v 16 týdenní hyperchol. skupině v oblasti aortálního sinu. Detail silné exprese endoglinu na povrchu aterosklerotického plátu (šipky). Zvětšeno 200x.**



*Obrázek 13: Příklad imunohistochemického barvení endoglinu v 16 týdenní hyperchol. skupině v oblasti descendentní aorty. Silná exprese byla detekována zejména na cévním endotelu na povrchu aterosklerotických plátů (šipky). Zvětšeno 100x.*



## 10. Diskuze

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným jevem, který určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze (61).

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste. Po několika měsících se u vybraných kmenů myši začínou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (48). Velkou výhodou je, že myši jsou v laboratorních podmínkách velmi dobře kontrolovatelné, krmené přesně definovanou stravou, což je u dlouhodobých studií na lidech nereálné. V lidské populaci se ale provádí velké množství studií asociačních, které sledují genetický vliv na aterosklerotický rozvoj. Jak již bylo zmíněno výše, myši jsou vůči rozvoji aterosklerózy velice odolné. Z experimentů vyplynulo, že nejlépe se dá aterogeneze indukovat u kmene myši C57BL/6J. Pokud je tento myšičí druh krmen stravou bohatou na cholesterol obsahující kyselinu cholovou, dochází k rozvoji lézí. Od lidského stavu se ale liší, a to jak lokalizací, tak histologickou povahou. Tento proces se také spíše přisuzuje zánětlivé reakci, než genetické predispozici (62).

My jsme v diplomové práci použili jak normocholesterolemická C57BL/6J zvířata tak ApoE/LDL receptor deficientní myši, které vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu, již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě



ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik (59).

Endoglin nebo také TGF- $\beta$ RIII je schopen ovlivňovat činnost TGF- $\beta$ , což je cytokin, který má v procesu aterosklerózy zřejmě protektivní účinky (63). Je tvořen třemi doménami. Extracelulární doména se skládá z 561 aminokyselin, transmembránová doména z 25 aminokyselin, a 47 aminokyselin tvoří intracelulární část. Studie ukázaly, že endoglin se vyskytuje ve dvou různých isoformách, L (long) a S (short), ty se liší v počtu aminokyselin v intracelulární části (37). Endoglin je nepostradatelný pro spoustu životních funkcí. Mezi hlavní účinky patří vliv na normální vaskulogenezi a angiogenezi. Endoglin je důležitý i v procesu erythropoézy. Migraci a proliferaci endoteliálních buněk také podporuje dostatečné množství endoglinu, a to aktivací signální kaskády (64).

V této diplomové práci jsme tedy navazovali na předchozí studie na KBLV. Ty ukázaly to, že endoglin je exprimován cévním endotelem u normocholesterolemických i hypercholesterolemických zvířat (65). My jsme se snažili nalézt případné rozdíly v expresi zvířat s různými hladinami cholesterolu a různým stupněm rozvoje aterosklerózy.

Výsledky obecně ukázaly velmi silnou expresi endoglinu na endotelu aorty v oblasti aortálního sinu, a to u všech skupin zvířat. Je potřeba ale říci, že exprese byla nejsilnější u skupiny zvířat s nejvyšším cholesterolem a největšími aterosklerotickými pláty. Dále se ukázalo, že exprese endoglinu je velmi nízká mimo aortální sinus a v těchto oblastech descendentní aorty je navíc jeho exprese viditelná téměř výhradně na endotelu plátů. Tyto výsledky naznačují, že exprese endoglinu by se mohla zvyšovat společně se zvyšováním hladin cholesterolu a navíc je vázána na místa výskytu nejvýraznějších aterosklerotických změn u myši, tj. do oblasti aortálního sinu. I takto ovšem nemůžeme zcela usuzovat na význam jeho exprese v aterogenezi. V literatuře existuje řada prací, které ukazují, že exprese endoglinu se nevyskytuje ve zdravých cévách ale pouze v těch, které obsahují aterosklerotické pláty (23, 35, 66). Na druhou stranu však byla popsána vazba mezi expresí endoglinu a expresí a funkcí eNOS, což je kritický projektivní enzym v aterogenezi (45, 67, 68). V této souvislosti se nabízí otázka, zda zvýšená exprese endoglinu během aterogeneze na cévním endotelu není

ochranným mechanismem díky zvyšování množství NO následkem zvýšené exprese eNOS. Tyto spekulace budou předmětem intenzivních studií v budoucnosti.

Závěrem lze tedy konstatovat, že jsme prokázali expresi endoglinu zejména na cévním endotelu na povrchu plátu v oblasti aortálního sinu a obecně také na povrchu plátu mimo aortální sinus. Nejvyšší exprese byla detekována u zvířat s největšími hladinami cholesterolu a největšími aterosklerotickými pláty.

Tato práce poukázala na jisté rozdíly v lokalizaci exprese endoglinu ve vztahu k hladinám cholesterolu a přítomným aterosklerotickým plátům.

## 11. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo sledovat expresi endoglinu během aterogeneze v cévní stěně myši. Sledovali jsme jeho expresi v kořenu aorty u normocholesterolemických C57BL/6J a u hypercholesterolemických apoE/LDLr deficientních myši ve věku 8 a 16 týdnů.

Výsledky biochemické analýzy ukázaly významný nárůst hladin cholesterolu u apoE/LDLr deficientních myši ve srovnání s 16 týdenními C57BL/6J. Dále byl prokázán předpokládaný statisticky významný nárůst u apoE/LDLr deficiencí myši krměných cholesterolem ve srovnání se skupinou bez cholesterolu.

Expresie endoglinu byla obecně velmi podobná u 16 týdenní normochol. skupiny zvířat a u 8 týdenní skupiny apoE/LDLr deficientních myši. Nejvyšší exprese byla detekována u zvířat s největšími hladinami cholesterolu a největšími aterosklerotickými pláty.

Expresie endoglinu byla relativně výrazná na cévním endotelu v aortálním sinu, na srdečních chlopních a byla také silná v malých cévách a kapilárách v okolním myokardu (obr 7 a 8). Analýza oblasti descendentní části aorty prokázala expresi endoglinu téměř výhradně na povrchu plátů u 16 týdenní hyperchol skupiny.

Expresie endoglinu tedy ukázala na jisté rozdíly v jeho lokalizaci ve vztahu ke hladinám cholesterolu a přítomným aterosklerotickým plátům.

## 12. Seznam zkratek

ABC	Avidin-Biotin metodika
ALK1	activin receptor-like kinase 1
apoE	apolipoprotein E
apoB	apolipoprotein B
BMPs	kostní růstové proteiny (bone morphogenetic proteins)
BSA	bovinní sérum albumin
CD	diferenční skupina, označení pro skupinu molekul na buňkách
DAB	diaminobenzidin
ENG	endoglin
eNOS	endoteliální syntetáza oxidu dusnatého
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
ICAM-1	intracelulární adhezí molekula
ICHs	ischemická choroba srdeční
IDL	lipoproteiny o intermediární hustotě
IL	interleukin
INF- $\gamma$	interferon gama
KBLV	katedra biologických a lékařských věd
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LDLr	LDL receptor
LDLR <sup>-/-</sup>	receptor deficientní myši
Lp(a)	lipoprotein (a)
MCP-1	monocyty přitahující protein
MG-CSF	monocyty-makrofágy kolonie stimulující faktor
MMP	proteolytický enzym, matrix metaloproteináza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukováná forma
NO	oxid dusnatý
Ox-LDL	oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě
OCT medium	zmrazovací medium
PBS	fosfátový pufr
Smad	protein regulující funkci TGF- $\beta$ , fungující jako transkripční faktor

TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TGF- $\beta$	růstový transformační faktor $\beta$
TGF- $\beta$ RII	receptor typu II pro TGF- $\beta$
VCAM-1	adhezní molekula cévních buněk
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
VSMCs	hladké svalové buňky cévní

## 13. Literatura

1. Špinar J, Vítovec J: Ischemická choroba srdeční. Grada, Praha, 2003, p. 364.
2. Junquera: Základy histologie. 2002.
3. Klika: Histologie. Praha, 1986.
4. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26, 1999.
5. Toborek M and Kaiser S: Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 94: 295-314, 1999.
6. Hallan S, de Mutsert R, Carlsen S, Dekker FW, Aasarod K and Holmen J: Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis* 47: 396-405, 2006.
7. Bjorkbacka H: Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 19: 548-9, 2008.
8. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V and Luno J: Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 14: 243-8, 2007.
9. Boyle JJ: Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 63-8, 2005.
10. Tarbell JM: Mass transport in arteries and the localization of atherosclerosis. *Annu Rev Biomed Eng* 5: 79-118, 2003.
11. Nilsson J: Regulating protective immunity in atherosclerosis. *Circ Res* 96: 395-7, 2005.
12. Cybulsky MI, Won D and Haidari M: Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol* 20 Suppl B: 24B-8B, 2004.
13. Galkina E and Ley K: Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2292-301, 2007.
14. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW and Milstone DS: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107: 1255-62, 2001.
15. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A

report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1512-31, 1995.

16. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14: 840-56, 1994.

17. Shah PK: Pathophysiology of coronary thrombosis: role of plaque rupture and plaque erosion. *Prog Cardiovasc Dis* 44: 357-68, 2002.

18. Libby P: Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91: 2844-50, 1995.

19. Chen J, Li D, Schaefer RF and Mehta JL: Inhibitory effect of candesartan and rosuvastatin on CD40 and MMPs expression in apo-E knockout mice: novel insights into the role of RAS and dyslipidemia in atherogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 446-52, 2004.

20. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M and Hofker MH: Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and ldlr mice. *Clin Chem Lab Med* 43: 470-9, 2005.

21. Moiseeva EP: Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 52: 372-86, 2001.

22. Chan DC, Barrett HP and Watts GF: Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy. *Am J Cardiovasc Drugs* 4: 227-46, 2004.

23. Bobik A: Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1712-20, 2006.

24. Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, Tararak E, Condrón M and Kostolias G: Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* 99: 2883-91, 1999.

25. Singh NN and Ramji DP: The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 487-99, 2006.

26. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P and Ten Dijke P: TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65: 599-608, 2005.

27. Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, Ilyinskaya O, Smirnov V, Tararak E and Bobik A: Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired

TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1391-6, 2004.

28. Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Tedgui A, Mallat Z and Groux H: Specific abrogation of transforming growth factor-beta signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood* 102: 4052-8, 2003.

29. Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, Tedgui A and Groux H: Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 108: 1232-7, 2003.

30. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J and Letarte M: Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027-30, 1992.

31. St-Jacques S, Forte M, Lye SJ and Letarte M: Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 51: 405-13, 1994.

32. Velasco S, Alvarez-Munoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM and Rodriguez-Barbero A: L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* 121: 913-9, 2008.

33. ten Dijke P, Goumans MJ and Pardali E: Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11: 79-89, 2008.

34. Piao M and Tokunaga O: Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study. *J Atheroscler Thromb* 13: 82-9, 2006.

35. Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C and Vary CP: Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153: 323-35, 2000.

36. Lopez-Novoa JM: Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant* 22: 712-4, 2007.

37. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, Lopez-Novoa JM and Bernabeu C: S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 103: 1383-92, 2008.



38. Zicha J, Pechanova O, Cacanyiova S, Cebova M, Kristek F, Torok J, Simko F, Dobesova Z and Kunes J: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiol Res* 55 Suppl 1: S49-63, 2006.
39. Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ and Bernabeu C: Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* 365: 694-705, 2007.
40. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S and ten Dijke P: Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* 12: 817-28, 2003.
41. Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA, Fabra A, Garcia-Pardo A, Vera S, Letarte M and Bernabeu C: Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 78: 614-23, 1999.
42. Sessa WC: eNOS at a glance. *J Cell Sci* 117: 2427-9, 2004.
43. Mungrue IN, Brecht DS, Stewart DJ and Husain M: From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 179: 123-35, 2003.
44. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH and van Goor H: Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 199: 8-17, 2003.
45. Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L and Bernabeu C: Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210: 456-68, 2007.
46. Jawien J, Nastalek P and Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-17, 2004.
47. Breslow JL: Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-8, 1996.
48. Paigen B, Holmes PA, Mitchell D and Albee D: Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6J, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis* 64: 215-21, 1987.
49. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA and Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-71, 1992.
50. Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL and Mahley RW: Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 268: 10160-7, 1993.

51. Rensen PC and van Berkel TJ: Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 271: 14791-9, 1996.
52. Reddick RL, Zhang SH and Maeda N: Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 141-7, 1994.
53. Nachtigal P, Jamborova G, Pospisilova N, Pospeschova K, Solichova D, Zdansky P and Semecky V: Atorvastatin has distinct effects on endothelial markers in different mouse models of atherosclerosis. *J Pharm Pharm Sci* 9: 222-30, 2006.
54. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL and Ross R: ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 133-40, 1994.
55. VanderLaan PA, Reardon CA and Getz GS: Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 12-22, 2004.
56. Moghadasian MH, Frohlich JJ and McManus BM: Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab Invest* 81: 1173-83, 2001.
57. van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM and Hofker MH: Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 111: 25-37, 1994.
58. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE and Herz J: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92: 883-93, 1993.
59. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL and Brown MS: The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4431-5, 1994.
60. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW and Stocker R: Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb J* 13: 667-75, 1999.
61. Mareckova Z, Heller S and Horky K: [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 45: 46-50, 1999.

62. Daugherty A: Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 323: 3-10, 2002.
63. Mallat Z, Gojova A, Sauzeau V, Brun V, Silvestre JS, Esposito B, Merval R, Groux H, Loirand G and Tedgui A: Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice. *Circ Res* 93: 884-8, 2003.
64. van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, Mager JJ, Snijder RJ, Westermann CJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, ten Dijke P, Arthur HM, Goumans MJ, Lebrin F and Mummery CL: Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation* 114: 2288-97, 2006.
65. Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P and Semecky V: Endothelial expression of endoglin in normocholesterolemic and hypercholesterolemic C57BL/6J mice before and after atorvastatin treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 85: 767-73, 2007.
66. Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M and O'Brien E: Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2546-52, 2000.
67. Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M and Letarte M: A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96: 684-92, 2005.
68. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM: Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* 18: 609-11, 2004.