

Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D., za odborné vedení diplomové práce, poskytování rad a materiálových podkladů k práci, dále Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc., a celé Katedře biologických a lékařských věd za umožnění vykonávání experimentální části diplomové práce na této katedře.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC komplex	avidin-biotin komplex
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ADP	adenosindifosfát
Ang-II	angiotenzin II
Apo B-100	apolipoprotein B-100
Apo E	apolipoprotein E
Arg	arginin
BCR	receptor B-lymfocytu
BMI	body mass index
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CRP	C-reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
DLP	dyslipidémie
EDRF	endoteliální relaxační faktor
ET-1	endotelin-1
Glu	glutamát
HDL-C	lipoprotein o vysoké hustotě
HLA-II	lidské leukocytární antigeny (human leucocyte antigens)
HLP	hyperlipoproteinémie
3-HMG CoA	3-hydroxymethylglutarylkoenzym A
ICAM-1	intercellular adhesion molecule
IDL	lipoprotein o střední hustotě
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1	interleukin-1
L-Arg	L-Arginin
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LDL-R	receptor pro lipoprotein o nízké hustotě
LP	lipoproteiny
Lp(a)	lipoprotein A
NK-κB	nukleární transkripční faktor
NO	oxid dusnatý
OCT medium	fixační medium pro kryofixaci
PAF	destičkový aktivační faktor
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PBS	fosfátový pufr (phosphate saline buffer)
PDGF	destičkami uvolňovaný růstový faktor
PECAM-1	platelet cell adhesion molecule
PGI 2	prostacyklin
TAG	triacylglyceroly
TC	celkový cholesterol
TCR	receptor T-lymfocytu
TG	triglyceridy
TGF-β	transformující růstový faktor
TNF	tumor nekrotizující faktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule
VE-kadherin	vascular endothelial cadherin
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	6
2.1.1. Tunica intima	6
2.1.1. Tunica intima	6
2.1.2. Tunica media	7
2.1.3. Tunica adventicia	7
2.2. FUNKCE ENDOTELU ZA FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK.....	8
2.2.1. Regulace cévního tonu	9
2.2.2. Vazoregulační látky syntetizované endotelem.....	10
2.2.3. Interakce mezi endoteliálními a krevními buňkami.....	10
2.2.3.1. Interakce krevních destiček a leukocytů s cévní stěnou.....	10
2.3. ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE	11
2.3.1. Endotel při ateroskleróze	15
2.4. RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY	15
2.5. PATOFYZIOLOGIE ATEROSKLERÓZY	20
2.5.1. Schéma aterogeneze	21
2.5.2. Lipoproteidy	22
2.5.3. Monocyty	23
2.5.4. Destičky	25
2.5.5. Nestabilita a ruptura plátů	25
2.6. BUNĚČNÉ ADHEZIVNÍ MOLEKULY VCAM-1	26
2.6.1. Struktura a funkce VCAM-1	27
2.6.2. Exprese VCAM-1	28
2.7. ENDOGLIN (CD 105).....	28
2.7.1. Struktura proteinu	28
2.8. STATINY.....	29
2.8.1. MECHANISMUS ÚČINKU STATINŮ	31
2.8.2. PLEIOTROPNÍ ÚČINKY STATINŮ	32
2.8.3. ATORVASTATIN.....	33
2.8.3.1. Mechanismus účinku.....	34
2.8.3.2. Nežádoucí účinky a interakce	35
3. CÍL PRÁCE	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA	38
4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	38
4.3. IMUNOHISTOCHEMIE	39
4.4. PRACOVNÍ POSTUP	40
4.5. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ.....	41
4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	42
4.7. VÝSLEDKY	43
4.7.1. Biochemická analýza	43
4.7.2. Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu	44
4.7.3. Stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu.	47
5. DISKUSE.....	49
6. ZÁVĚR	53
7. SEZNAM LITERATURY	55

ÚVOD

Ateroskleróza a její orgánové komplikace, tedy infarkt myokardu, mozkové cévní příhody a ischemická choroba dolních končetin, jsou nejčastější příčinou předčasné invalidizace a úmrtí ve většině civilizovaných zemí. Kardiovaskulární mortalita představuje v civilizovaných rozvinutých zemích nejčastější příčinu úmrtí po 45. roce věku i v celkovém úhrnu všech úmrtí, zatímco nejčastější příčinou úmrtí v nejhudších zemích jsou komplikace podvýživy, vzácně přímo hladovění.

Aterosklerotický proces, který se odehrává ve stěně tepny, je složitým dějem, do kterého zasahuje celá řada faktorů. Ateroskleróza je důsledkem kontinuálního celoživotního děje, jehož základy začínají již v raném dětství, ne-li prenatálně. V patogenezi aterosklerózy hrají klíčovou roli zejména metabolické faktory, celý proces má však také aspekty chronického zánětu. Život ohrožujícím vyústěním progresu aterosklerotického procesu je nestabilní aterom. Nestabilní aterom je pojem označující přeměnu poměrně tuhého ateromového stromatu na jeho polotekutou formu, která může v důsledku své konzistence vést k ruptuře ateromového obalu a k herniaci ateromových hmot do lumina cévy, jindy pak semilikvidní ateromový obsah vede k obturaci lumina cévy se všemi dalšími důsledky zejména v řečišti koronárním a cerebrálním.

Prevence aterosklerotického procesu v různých fázích jeho rozvoje je základní prevencí důsledků částečné nebo úplné obturace tepen, tedy různých forem ischemické choroby srdeční, ischemické choroby dolních končetin a mozkových cévních příhod (Handzha 2001).

Tato diplomová práce se však zameřovala zejména na změny na endotelu, ke kterým dochází ještě před formováním aterosklerotického plátu. Zabývala se také

možnostmi ovlivnění vybraných markerů endotelu po krátkodobém podávání v klinické praxi hojně užívaného hypolipidemika atorvastatinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Krevní cévy jsou arterie, vény a kapiláry. Arterie a vény tvoří makrocirkulační systém, zatímco kapiláry se podílí na mikrocirkulaci. Jejich cévní stěna je tvořena třemi základními vrstvami:

2.1.1. Tunica intima

2.1.2. Tunica media

2.1.3. Tunica adventitia

2.1.1. Tunica intima

Tunica intima je tvořena vrstvou endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cév. Jsou uloženy na bazální membráně tvořené především kolagenem, glykoproteinem lamininem a proteoglykany.

Lumen cév vystylá endotel. Odděluje krevní buňky od extravaskulární tkáně. Tvoří ho jednovrstevný plošný epitel. K udržení cévní permeability slouží zejména mezibuněčné spoje.

Mezibuněčných spojení existují celkem tři typy. Zonulae occludentes (tight junctions) patří mezi nejtěsnější spojení mezi buňkami. Tyto spoje se vyskytují hlavně mezi mozkovými endoteliálními buňkami v oblasti hematoencefalické bariéry. Dalším typem těchto spojení jsou nexy (gap junctions) a zonulae adherentes (adherens junctions). Hlavní složkou zonulae adherentes je VE-kadherin (Dejana et al 1999).

Pod endotelem se nachází vrstva subendotelového řídkého vaziva, přičemž existují rozdíly v jejím složení u jednotlivých typů cév. Arterie svalového typu zde mají hladkosvalové buňky. Arterie elastického typu mají subendotelovou vrstvu

silně vyvinutou. Vazivová vlákna jsou orientována podélně a hrají důležitou roli při deformaci endotelu během kontrakce a dilatace. Oproti tomu vény mají subendotelovou vrstvu velmi tenkou a bez hladké svaloviny. Kapiláry se skládají pouze z vrstvy endotelových buněk stočených do trubice.

2.1.2. Tunica media

Tunica media je složena z koncentrických hladkosvalových buněk, mezi kterými se nachází elastická vlákna a proteoglykany. Směrem k adventicii je medie oddělena blankou nazvanou lamina elastica externa a od intimy ji odděluje lamina elastica interna.

U arterií tato vrstva dominuje, obsahuje cirkulárně uspořádané vrstvy hladkosvalových buněk. Zejména pak u arterií svalového typu může medie obsahovat až 40 vrstev hladkosvalových buněk. Oproti tomu pro velké arterie elastického typu jsou typické perforované elastické blanky, mezi kterými jsou hladkosvalové buňky a retikulární vlákna.

Žíly mají medii mnohem tenčí než arterie. Tvoří ji svazečky hladkosvalových buněk smíšených s retikulárními vlákny a jemnou síťovinou elastických vláken.

Pericyty nahrazují tunicu medii v kapilárách. Obsahují myosin, aktin a tropomyosin, což jim dává kontrakční schopnost.

2.1.3. Tunica adventitia

Tunica adventicia se skládá z podélně orientovaných kolagenních a elastických vláken. Mohou se zde vyskytovat fibroblasty a tukové buňky. Adventicie plynule přechází do vaziva, kterým prochází.

Velké arterie mají v adventicii lymfatické cévy, vasa vasorum a nervy, velké množství fibroblastů a tukových buněk.

U vén tvoří adventicie dominantní část cévní stěny. Je tvořena kolagenními vlákny. Vény umístěné pod úrovní srdce mají v adventicii podélné svazky hladké svaloviny.

Vrstva kolagenních vláken nahrazuje tunicu adventicii u kapilár.

.2.2. FUNKCE ENDOTELU ZA FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK

Endotel byl dlouho považován za strukturu, která vyplňuje oběhový systém, a má primární nezbytnou funkci-udržovat permeabilitu buněčné stěny. V 19. století von Reckingausen ustanovil, že cévy nejsou pouze „tunely“ procházející skrz tkáň, ale že jsou též vyplněny buňkami. Starlingův experiment a jeho zákon kapilární výměny, stanovený v roce 1896, vedly k upevnění domněnky, že endotel je především selektivní, ale statická fyzikální bariéra, což popřelo Heidenhahnův popis endotelu z roku 1891 jako aktivního sekrečního buněčného systému. Nicméně studie cévní stěny pod elektronovým mikroskopem provedené Paladem v roce 1953 a fyziologické studie Gowana z roku 1959 popisují interakce mezi lymfocyty a endotelem postkapilárních venul podporované několika následujícími studiemi, které vedou k současnému pohledu na endotel jako na dynamický, heterogenní, diseminovaný orgán, který zastává životní funkce sekreční, syntetické, metabolické a imunologické (Davignon & Ganz 2004).

Endotel je tedy tvořen jednou vrstvou specializovaných buněk, které mají řadu regulačních funkcí. Základní funkce cévního endotelu jsou: regulace cévního tonu, ovlivnění struktury cévní stěny, antitrombotické a fibrinolytické působení,

interakce s buňkami v cirkulaci a regulace permeability cévní stěny (Dejana et al 1999).

2.2.1. Regulace cévního tonu

Endotel nepředstavuje pouze strukturální bariéru mezi cirkulací a okolními tkáněmi, ale endoteliální buňky také secernují mediátory, které ovlivňují vaskulární hemodynamiku ve fyziologickém stavu. Endoteliální buňky přispívají k regulaci krevního tlaku a toku krve uvolňováním vazodilatačních látek jako je NO a prostacyklin(PGI 2), stejně jako látek vazokonstrikčních včetně endotelinu a PAF (destičkového aktivačního faktoru) (Cannon 1998). Tyto chemicky rozdílné sloučeniny nejsou skladovány v intracelulárních granulích; přesněji řečeno jejich hlavní biologické účinky jsou regulovány lokalizací specifických receptorů na cévních buňkách, jejich rychlým metabolismem nebo stupněm genové transkripce. NO je konstitutivně secernován endoteliálními buňkami, ale jeho produkce je modulovaná množstvím exogenních chemických i fyzikálních stimulů, zatímco ostatní známé mediátory (PGI 2, endotelin, PAF) jsou syntetizovány primárně jako odpověď na změny vnějšího prostředí (Vanhoutte 1997).

2.2.2. Vazoregulační látky syntetizované endotelem

LÁTKA	HLAVNÍ ÚČINEK	JINÉ ÚČINKY	SEKRECE	SLOUČENINA	PREKURZOR. SLOUČENINA
NO (oxid dusnatý)	VD	Udržuje základní tonus cév, ↓ adhezi leukocytů a krevních destiček, ↑ sekreci krevních destiček, podporuje destičkovou disagregaci, ↓ migraci a proliferaci hladkých svalových buněk	Parakrinní, konstitutivní a indukovaná trombinem, ADP, bradykininem, substancí P, muskarinovými agonisty, cytokiny	Heterodiatom. volný radikál	L-Arg
PGI ₂ (prostacyklin)	VD	Zpomaluje destičkovou agregaci a depozici	Parakrinní, indukovaná a místa poškození endotelu	eikosanoid	Kyselina arachidonová
PAF (destičkový aktivační faktor)	VK	Podporuje leukocytární adhezi na buněčný povrch	Juxtakrinní/ indukovaná	fosfolipid	Kyselina arachidonová
ET -1 (endotelin 1)	VK	Mitogen pro buňky hladkých svalů, moduluje účinky mnoha sloučenin	Parakrinní/ indukovaná hypoxií, ischemií	Peptid z 21 aminokyselin	Preproendotelin 1 (203 aminokyselin)

2.2.3. Interakce mezi endoteliálními a krevními buňkami

2.2.3.1. Interakce krevních destiček a leukocytů s cévní stěnou

Cirkulující leukocyty a krevní destičky mohou adherovat na specifické oblasti endotelu během procesů imunitního dozoru a také se účastnit odpovědi na poranění nebo infekci tkáně. Tyto multicelulární interakce jsou nezbytnými prekurzory fyziologického zánětu nebo hemostázy. Naopak nekontrolovaná adheze leukocytů a krevních destiček přispívá k zánětlivým a trombotickým poruchám (Cines et al 1998).

2.3. ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE

V posledních letech se prohlubují poznatky o zásadní úloze endotelu v regulaci funkcí cévního systému a v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. Rizikové faktory jako jsou hypertenze, hyperlipoproteinémie, diabetes a kouření svým chronickým působením poškozují fyziologické funkce endotelu a vedou ke vzniku endoteliální dysfunkce, která hraje důležitou roli v patogenezi cévní aterosklerózy, arteriální hypertenze, diabetu nebo srdečního selhání. Zlepšení poškozené funkce endotelu úpravou životosprávy a vhodnou léčbou může zabránit vzniku a progresi aterosklerózy a jejích komplikací (Najemnik et al 1999).

Endotel neustále odpovídá na řadu lokálních a systémových podnětů. Aktivace endotelu těmito podněty vede k různým typům odpovědi-ke změně permeability, vasospastickým reakcím, porušení hemostatických mechanismů, uvolnění růstových faktorů. Aktivace endotelu může být na rozdíl od endoteliální dysfunkce přechodnou krátkodobou epizodou, která provází např. virovou infekci nebo krátkou expozici aktivačním faktorům. Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, kouření, hyperhomocysteinémie nebo nedostatek estrogenů, svým chronickým působením poškozují endoteliální funkce a vedou ke vzniku endoteliální dysfunkce (Chan et al 2003).

Endoteliální dysfunkcí se rozumí lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi faktory vazorelaxačními a vazokonstrikčními, prokoagulačními a antikoagulačními, růst stimulačními a růst inhibujícími. Výsledkem je proaterogenní účinek s převahou vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů.

V současné době je známo, že velká většina kardiovaskulárních onemocnění je spojena s poruchou funkce endotelu. Endoteliální dysfunkce se účastní v patofyziologii aterosklerózy, hypertenze, diabetu, ICHS, srdečního selhání, cévních mozkových příhod, při Raynaudově syndromu nebo plicní hypertenzi.

Vystavení endotelu působení aterogenních lipidů vede ke snížené aktivitě NO, která má za následek uplatnění růstových faktorů, průnik monocytů a LDL částic subendoteliálně a tvorbu pěnových buněk. Přítomnost lipoproteinu inhibuje fibrinolýzu a přispívá ke vzniku trombotických komplikací. U nemocných s arteriální hypertenzí hraje důležitou roli při poškození endotelu zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron a snížená aktivita vazodilatačních působků (EDRF/NO, prostacyklin). Zvýšená permeabilita endotelu a exprese adhezivních molekul (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1) umožňují adhezi a průnik zánětlivých buněk do cévní stěny, dochází ke strukturálním změnám cévní stěny, které se projevují morfologickými změnami endotelií, hypertrofií a hyperplazií hladkých svalových buněk (Mysliwiec et al 2004).

Hyperglykémie je spojená s glykosylací lipoproteinů, glykací bílkovin a zvýšenou permeabilitou endotelu pro aterogenní lipidy. Hyperglykémie aktivuje endotel k expresi adhezivních molekul, dochází k průniku monocytů přes endotel. Narušena je také produkce vazodilatačních a koagulačních působků (snížená syntéza prostacyklinu, nižší dostupnost NO, zvýšená sekrece von Willebrandova faktoru a PAI-1) (Schleef et al 1988).

Zvýšená aktivita osy renin-angiotenzin-aldosteron se u srdečního selhání podílí na zvýšení periferní cévní rezistence. Zvýšená degradace bradykininu a tím i snížená produkce vazodilatačních faktorů, aktivace syntézy endotelinu a produkce TNF při snížené tkáňové perfuzi dále přispívají k rozvoji endoteliální dysfunkce.

Poškození funkce endotelu je prvním krokem při vzniku aterosklerózy. V časné fázi rozvoje aterosklerózy umožňuje zvýšená permeabilita aktivovaného endotelu průnik aterogenních lipidů a monocytů do cévní stěny. K rozvoji endoteliální dysfunkce přispívá nedostatečná produkce vazodilatačně, antiadhezivně a antitromboticky působícího NO a zvýšená syntéza kontraktálních a růst stimulujících faktorů (endotelin, angiotenzin II, tromboxan A₂, PDGF). Při pohybu leukocytů v blízkosti aktivovaného endotelu dochází k interakci leukocytů s adhezivními molekulami, adhezi a migraci subendoteliálně. Zde se fagocytózou oxidovaných LDL částic monocyty mění v pěnové buňky a vytvářejí tukové proužky jako první stadium aterosklerózy. Postupnou akumulací krevních buněk a lipoproteinů se vytváří aterosklerotický plát.

U pokročilé aterosklerotické léze zvyšuje endoteliální dysfunkce trombotickou pohotovost a riziko ruptury plátu. Dysfunkce endotelu se tak podílí na vzniku nestabilních lézí s vysokým obsahem lipidů a makrofágů, které se klinicky mohou manifestovat akutními kardiovaskulárními příhodami.

Nejčastěji se k průkazu endoteliální dysfunkce používá sledování cévní reaktivity na vazoaktivní podněty, další možností je laboratorní stanovení markerů endoteliální dysfunkce a sledování metabolismu značených prekurzorů.

Léčba endoteliální dysfunkce může předejít rozvoji aterosklerózy zabráněním přechodu funkčních změn ve změny strukturální a umožňuje stabilizovat již vyvinuté aterosklerotické léze. Léčba onemocnění spojených s endoteliální dysfunkcí by měla směřovat k obnovení fyziologických funkcí endotelu eliminací rizikových faktorů nebo vhodnou farmakologickou léčbou stimulující vazodilatační, antiadhezivní a antiagregační vlastnosti endotelu (Nitenberg 2005).

Co se týče nefarmakologických možností léčby, nejjednodušším opatřením je odstranění působení rizikových faktorů úpravou životosprávy. Vyloučení vlivu kouření vede do několika měsíců k normalizaci endoteliálních funkcí. Zlepšení endoteliální dysfunkce bylo dosaženo úpravou glykémie u diabetiků, fyzickým tréninkem u nemocných se srdečním selháním, změnou dietních návyků u nemocných s hyperlipoproteinémií.

Farmakologická léčba endoteliální dysfunkce spočívá v hypolipidemické léčbě; osvědčily se především statiny, které snižují LDL a oxidovaný LDL-cholesterol, stimulují produkci EDRF/NO, vedou k obnově endotelem zprostředkované vazodilatace, dochází k významnému poklesu výskytu kardiovaskulárních příhod, na kterém se spíše než regrese aterosklerózy podílí úprava endoteliální dysfunkce (Ikeda & Shimada 2001).

Klinický význam působení inhibitorů ACE na endotel potvrdily například výsledky studie TREND, která u nemocných s koronární aterosklerózou a zvýšením LDL-cholesterolu prokázala úpravu endoteliální dysfunkce při šestiměsíční léčbě quinaprilem (Chlopicki & Gryglewski 2005).

Předpokládaným mechanismem působení antioxidantů (vitamín E, C, beta-karoten) na endoteliální dysfunkci je snížení oxidačního stresu vedoucí k nižší inaktivaci NO a stimulaci syntézy prostacyklinu; výsledky studií však jsou zatím nejednoznačné.

Řada studií prokázala účinnost estrogenové substituce v menopauze na úpravu endoteliální dysfunkce a pokles kardiovaskulární mortality; estrogeny mimo jiné zvyšují syntézu NO a prostacyklinu, inhibují syntézu troboxanu A₂ a endotelinu-1, snižují hladinu LDL-cholesterolu a mají antioxidantní účinky.

Dalšími látkami ovlivňujícími endoteliální funkce jsou blokátory kalciových kanálů. Amlodipin ovlivňuje endotel stimulací produkce bradykininu a inhibicí oxidace lipidů volnými radikály a tvorby pěnových buněk (Taylor 2004).

2.3.1. Endotel při ateroskleróze

Ateroskleróza je nejvíce rozšířené onemocnění cév v rozvinutých zemích. Představa, že ateroskleróza vzniká jako odpověď na endoteliální poranění, byla poprvé vyslovena před více než 20 lety, když bylo zjištěno, že již při nepravidelnostech v organizaci endoteliálních buněk jsou často v těchto místech nalézány tukové proužky, zatímco úplná destrukce endotelu může být patrná pouze v pozdním stádiu nemoci. Tyto a další práce jasně poukazují na fakt, že ne pouze mechanická, ale i funkční porucha endotelu může vést k rozvoji endoteliální dysfunkce (Cines et al 1998).

2.4. RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY

Rizikové faktory aterosklerózy a jejích orgánových komplikací se dělí na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné faktory patří věk (s vyšším věkem stoupá jak progres aterosklerotického procesu, tak množství jeho komplikací), mužské pohlaví (muži měli častěji komplikace aterosklerotického procesu, nyní se zdá, že se poměr mezi muži a ženami začíná postupně srovnávat) a genetické vloh. Za hlavní ovlivnitelné faktory považujeme kouření, inzulínovou rezistenci a hyperinzulinismus, arteriální hypertenzi, dyslipidémii, obezitu, diabetes mellitus, hyperfibrinogémií, nedostatek aerobní aktivity, nedostatek estrogenů, hyperhomocysteinémií, snížený příjem antioxidantů, nenasycených mastných

kyselin a vlákniny, nadbytek přijímané energie, cholesterolu, nasycených mastných kyselin a dále biologické faktory (Muntner et al 2005).

Věk je faktor zřetelně neovlivnitelný, je základním přístupem oddálení manifestace orgánových komplikací aterosklerózy, tedy ischemické choroby srdeční, a po jejich eventuální manifestaci dalšího oddálení recidivy těchto komplikací.

Mužské pohlaví bylo a je tradičně považováno za rizikový faktor zejména pro ischemickou chorobu srdeční. V posledních letech se postupně vyrovnává rozdíl mezi procentuálním zastoupením kouření u mužů a u žen a současně stoupá poněkud věk manifestace ICHS. Proto se zdá, že tradičně pojímaný neovlivnitelný rizikový faktor spojený s mužským pohlavím není tak zřetelný jako před deseti či patnácti roky. Je však evidentní, že ženy onemocní ICHS častěji až v menopauze (Mehta et al 1998).

Primární, geneticky podmíněnou dyslipoproteinémií je například familiární hypercholesterolémie; autozomálně dominantní onemocnění, které je důsledkem chybní nebo funkční poruchy LDL receptoru a následně zpomaleným katabolismem LDL a IDL. K manifestaci nemoci dochází od narození, u heterozygótů jsou koncentrace LDL-C 2-3krát zvýšeny ve srovnání se zdravými osobami. Koncentrace TC se pohybují mezi 9-13 mmol/l, paralelně jsou zvýšené koncentrace LDL-C a apo B-100; u homozygótů se koncentrace TC nachází mezi 15-30 mmol/l a proporcionálně jsou zvýšeny koncentrace LDL-C.

Mezi další geneticky podmíněná onemocnění patří familiární defekt apolipoproteinu B-100 autozomálně dominantní, který je způsoben bodovou mutací (Glu 3500→Arg) apo B-100, která vede ke snížené afinitě LDL k LDL-R. Nejčastější příčinou vzestupu TC a LDL-C v populaci je polygenní hypercholesterolémie; frekvence onemocnění se udává mezi 1:20-100, kdy se patofyziologicky uplatňuje

kombinace genetických faktorů i vlivů zevního prostředí, což ústí ve zvýšenou produkci LDL, ale i jejich zpomalené odbourávání.

Familiární kombinovaná hyperlipidémie je nejčastější geneticky podmíněná porucha metabolismu LP, frekvence v běžné populaci je asi 0.5-1%; jedná se o smíšenou hyperlipidémii, která se často vyskytuje u nemocných po prodělaném infarktu myokardu (v 10-15%), porucha má autozomálně dominantní dědičnost. Může se jednat o poruchu jednoho hlavního genu a několika genů kandidátních, charakteristickým rysem je zvýšená syntéza apo B-100 a produkce „malých“ VLDL, TC od 6.5 do 8.0 mmol/l, část má pokles HDL-C a hyper apo B-100. Další genetickou příčinou DLP může být familiární dysbetalipoproteinémie, familiární endogenní a familiární smíšená hypertriglyceridémie, atd. (Pedraza 1993).

Co se týče ovlivnitelných rizikových faktorů, je dokázáno, že riziko rozvoje ICHS stoupá se zvyšující se tělesnou hmotností. Riziko ICHS je u lidí s body mass indexem 23-25 vyšší o 50% než u osob s BMI pod 21. Obezita může mít (asi i vlivem mobilizovaných volných mastných kyselin) přímý vliv na předčasný rozvoj aterosklerózy, která je častěji spojená s centrálním typem obezity. Kombinace centrální obezity a inzulínové rezistence vede k rychlé nadprodukci VLDL (s vysokým obsahem TG) v játrech (Coniglio et al 1997).

Je prokázán přímý vliv hyperinzulinémie; inzulínová rezistence zvyšuje koncentraci VLDL, snižuje koncentraci HDL, zvyšuje výskyt arteriální hypertenze. Inzulín působí na cévní stěnu stimulací tvorby růstových faktorů, proliferací buněk hladkého svalstva, stimulací produkce pojivové tkáně, zvýšenou aktivitou LDL-C, zvýšenou tvorbou a sníženou regresí tukových proužků, zvýšením hladiny plazmatického endotelinu-1, zvýšením inhibitoru plazminového aktivátoru-1 (D'Agostino et al 2004).

Arteriální hypertenze je i se svými možnými komplikacemi složitým onemocněním, jehož všechny aspekty nejsou dosud vysvětleny. Na stěnu tepny působí přímo zvýšení krevního tlaku, změny proudění krve, dochází k poruše endoteliální vrstvy. Hypertenze vede k remodelaci hladké svaloviny ve velkých tepnách, v malých tepnách vede ke zvýšení cévního tonusu (Catena et al 2005).

Předčasná menopauza a s tím spojený nedostatek estrogenů představuje také zvýšené riziko aterosklerózy.

Dalším rizikovým faktorem je vysoká koncentrace lipoproteinu Lp(a), která je spojena s vyšším rizikem ICHS; nebezpečný je i jeho protrombotický vliv, který je dán kompeticí a podobností struktury Lp(a) a fibrinogenu (zvýšená hladina fibrinogenu představuje výrazné riziko ICHS) (Iacoviello et al 2001).

Společné enviromentální faktory v rodině představují zejména výživa a také kouření. V rodinách kuřáků častěji kouří i filiární generace, nehledě na fakt pasivního kouření. Kouření u nás v posledních letech přibývá, zejména mezi mládeží a ženami mladšího a středního věku. Kouření, stejně jako výživa a arteriální hypertenze, představují pochopitelně faktory patogeneze aterosklerózy ovlivnitelné.

Sedavý způsob života má vliv především na svalové komponenty syndromu inzulinové rezistence a na rozvoj abdominální obezity. Je jisté, že sportování několikrát týdně po dobu několik desítek minut denně představuje významný faktor prevence ischemické choroby srdeční.

Faktory výživy v patogenezi aterosklerózy-opakovaně bylo prokázáno, že zvýšený přívod nasycených mastných kyselin či současný nižší přívod více-či mononenasycených mastných kyselin představují základní riziko aterosklerózy. Jejím rizikem je také vyšší celkový přísun energie, nižší příjem vlákniny, nižší příjem vitamínů, zejména kyseliny listové a protioxidačně působících vitamínů (vitamín C,

vitamín E) a dále nižší příjem protioxidačně působících látek (například obecně flavonoidy, zejména antokyany) představuje riziko vzniku, udržování a progresu aterosklerotického procesu. Běžně jsou doporučovány rostlinné tuky; mnoho rostlinných tuků na bázi margarínu ale obsahuje vysoké procento trans-mastných kyselin, jejichž aterogenní potenciál je dvojnásobný při srovnání s nasycenými mastnými kyselinami. Proto obecné doporučování rostlinných tuků může vést ke zvýšené zátěži trans-mastnými kyselinami.

Z hlediska tak zvané správné výživy je za správný model v současné době považována dieta středomořská, obsahující ryby, drůbež, vzácněji maso hovězí či vepřové, málo uzenin, vyšší příjem zeleniny a ovoce, což znamená i vyšší příjem vlákniny, vitamínů a protioxidačních látek. Z hlediska příjmu alkoholu se považuje uměřený příjem zejména vína za protektivní. Uměřený příjem znamená do 40 g denně pro muže a do 20-25 g denně alkoholu pro ženy. Podle některých názorů je z hlediska protekce výhodnější pít víno s přívodem flavonoidů, jiné názory se opírají o fakt, že při mírném příjmu alkoholu stoupá HDL-cholesterol. Vysoký příjem alkoholu vede naopak ke zvýšení plazmatických hladin triacylglycerolů, k jaterní steatóze a posléze cirhóze, atd. (Daubresse 2000).

Nakonec bych zmínila ještě vliv zánětlivých markerů jako rizikového faktoru aterosklerózy; jednoznačné patogeny určeny nebyly, ale o určitých mikrobech je známo, že jejich výskyt byl spojen s vyšší frekvencí infarktu myokardu. Nejčastěji jsou studovány *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Coxiella burnetii*, *Coxsackie B*, *Herpes virus hominis*, *Cytomegalovirus* (nalezený v restenózách karotických tepen). Byly zjištěny zvýšené titry proti *Chlamydia pneumoniae* u mužů s ICHS. Séropozitivita protilátek proti *Chlamydia pneumoniae* byla zjištěna až u 80-85% pacientů s aterosklerotickým postižením (Laurila et al 1997).

O tom, že infekční agens mohou být negativním jevem pro rozvoj aterosklerotických změn, svědčí vztah C-reaktivního proteinu (CRP) a ICHS. Zvýšené hladiny CRP byly nalezeny u nemocných s chronickou infekcí *Chlamydia pneumoniae* a u pacientů s chronickou gastritidou způsobenou *Helicobacter pylori*. Vztah byl prokázán k ICHS. Hodnoty CRP korelují též s teplotou aterosklerotického plátu.

Vzhledem k četnosti rizikových faktorů je jasné, že je třeba pečlivě léčit; farmakologicky i nefarmakologicky; jednotlivé rizikové faktory. Léčba u nemocných s vysokým individuálním rizikem je založena na léčbě poruch metabolismu tuků, arteriální hypertenze, diabetes mellitus, či poruchy glukózové tolerance. S ohledem na celou škálu faktorů, které ovlivňují chování aterosklerotické léze, je třeba do léčby zahrnout i sanaci zánětlivých ložisek, protože formace aterosklerotického plátu je dána hlavně částicemi LDL-cholesterolu, jeho nestabilita však může být výrazně ovlivněna nejen chemickými, ale i infekčními faktory (Vaughan et al 2000).

2.5. PATOFYZIOLOGIE ATEROSKLERÓZY

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění. Díky vysoké plasmatické koncentraci cholesterolu, zejména cholesterolu o nízké hustotě – LDL, který je hlavním rizikovým faktorem aterosklerózy, uvažovali mnozí, že proces aterosklerózy ve velké míře spočívá v akumulaci lipidů ve stěně artérie. Nicméně tento proces je mnohem složitější.

Četná pozorování u lidí i živočichů vedla k formulaci hypotézy o reakci na poškození, která původně předpokládala, že prvním krokem v ateroskleróze je

poškození endotelu. Nejnovější verze této hypotézy spíše upřednostňuje vznik a rozvoj endoteliální dysfunkce před pouhým poškozením endotelu (Ross 1999).

2.5.1. Schéma aterogeneze

Leukocyt má tendenci rolovat po endotelu. Dochází k tomu prostřednictvím vzájemného kontaktu molekul selektinů na endotelové buňce a oligosacharidových molekul na leukocytech. Následuje pevná adheze leukocytu na endotel díky molekulám z řady imunoglobulinů VCAM-1 a ICAM-1. Vazebnou složku tvoří integriny, které se zvýšeně exprimují až při aktivaci endotelu. Pro proniknutí leukocytu do subendotelu mezi endotelovými buňkami je zapotřebí molekula PECAM-1 (ve velkém množství je v meziendotelových spojích). Na invazi leukocytů do cévní stěny se velkou měrou podílejí chemokiny, chemotaktické cytokiny, které hrají roli v řízení pohybu a aktivaci leukocytů (Davignon & Ganz 2004).

Určitá místa arterií, jako jsou bifurkace a oblouky, způsobují charakteristické změny v toku krve. Změny v krevním průtoku se zdají být rozhodující v určení, která místa cév mohou být náchylná k tvorbě lézí. Pohyb a adheze monocytů a T-buněk na těchto místech je výsledkem up-regulace adhezních molekul jak na endotelu, tak i na leukocytech.

Endoteliální dysfunkce vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti endotelu. Zvyšuje se tak adhezivita (s přičiněním leukocytů a krevních destiček) i propustnost (permeabilita) endotelu. Endotel má tedy spíše koagulační než antikoagulační schopnosti a vytváří vazoaktivní molekuly, cytokiny a růstové faktory. Pokud není zánětlivá odpověď účinně kompenzována a nejsou odstraněny napadající agens, může proces dále pokračovat. Takto stimuluje zánětlivá odpověď migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny, ty se prolínají s oblastí zánětu

a vytváří intermediární (střední) lézi. Pokud tato reakce pokračuje trvale, může způsobit ztluštění stěny tepny, které je později kompenzováno postupnou dilatací, tudíž průsvit cévy zůstává ještě nezměněn (Taatjes et al 2000).

Odpověď je dále způsobena a usměrňována makrofágy vzniklými z monocytů a specifickými subtypy T-lymfocytů. Aktivace těchto buněk vede k uvolnění hydrolytických enzymů, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, které způsobují další poškození a případně vedou k místní nekróze. Akumulace mononukleárních buněk, migrace a proliferace buněk hladké svaloviny a vznik fibrotické tkáně vedou k dalšímu zvětšení a restrukturalizaci léze. Ta začíná být pokryta vazivovým krytem (čepičkou), který překrývá jádro (je tvořeno lipidovou a nekrotickou tkání) a vzniká tzv. komplikovaná léze. V tomto okamžiku již céva dále nemůže kompenzovat tuto situaci dilatací, vyklenuje se do lumen cévy a omezuje krevní průtok (Badimon et al 1999).

2.5.2. Lipoproteiny

Lipoproteinové částice jsou tvořeny tukem a bílkovinou. Bílkovinná součást se nazývá apolipoprotein nebo apoprotein. Fungují jako transportní formy krevních lipidů.

LDL je hlavní příčinou poškození endotelu a pod ním ležící hladké svaloviny. LDL může být modifikován oxidací, glykací u diabetes mellitus, agregací a spojením s proteoglykany nebo včleněním do imunitních komplexů. Když jsou částice LDL zachyceny v arterii, mohou projít progresivní oxidací a být pohlceny makrofágy a to díky specifickým (scavengerovým) receptorům na povrchu těchto buněk. Pohlcení vede ke vzniku lipidových peroxidů a usnadňuje nahromadění esterů cholesterolu. Jakmile je LDL modifikován a pohlcen makrofágy, mění se na pěnové buňky.

Odstranění modifikovaného LDL je důležitou součástí úvodní ochranné úlohy makrofágů v zánětlivé odpovědi a minimalizuje účinek modifikovaného LDL na buňky endotelu a hladké svaloviny. Oxidovaný LDL je chemotaktický pro další monocyty a může regulovat kolonie stimulační faktor makrofágů a monocytární chemotaktický protein produkovaný buňkami endotelu. Rozšiřuje tedy zánětlivou odpověď vstupem nových monocytů do lézí (Gudev 1996).

Zánětlivé mediátory (např. TNF- α , interleukin-1 a makrofág-kolonie stimulující faktor) zvyšují vazbu LDL na endotel a hladkou svalovinu a zvyšují transkripci genu receptoru pro LDL.

Antioxidanty, jako např. vitamin E, mohou redukovat vznik volných radikálů. Zvyšují rezistenci LDL k oxidaci. V preklinických studiích bylo zjištěno, že příjem vitaminu E nepřímo úměrně souvisí s výskytem infarktu myokardu, omezuje a snižuje výskyt srdečních příhod.

Zvýšenou lipooxygenázovou aktivitu má ang-II, který může zvýšit zánět a oxidaci LDL. Hypertenze má prozánětlivé účinky a zvyšuje tvorbu peroxidu vodíku a volných radikálů (jako např. superoxidový anion a hydroxylový radikál) v plasmě. Tyto substance snižují tvorbu NO endotelem, zvyšují adhezi leukocytů a zvyšují periferní rezistenci.

2.5.3. Monocyty

Monocyty, prekurzory makrofágů, jsou přítomny v každé fázi aterogeneze. Makrofágy produkují cytokiny, chemokiny, molekuly regulující růst, metaloproteinázy a další hydrolytické enzymy. Vznik a množení mononukleárních buněk v lézích závisí na faktorech, jakými jsou makrofág-kolonie stimulující faktor a granulocyty-makrofág kolonie stimulující faktor. Vystavení makrofág-kolonie

stimulujícím faktoru umožňuje makrofágům přežít *in vitro* a pravděpodobně se i rozmnožovat v lézích. Naopak některé zánětlivé cytokiny (např. interferon-gama aktivovaný makrofágy) jim umožňují průběh programované buněčné smrti (apoptózy) (Yla-Herttuala 1991).

Původně se uvažovalo, že jediné buňky, které rostou v průběhu expanze aterosklerotických lézí, jsou buňky hladké svaloviny. Ale množení makrofágů má stejnou důležitost. Schopnost makrofágů produkovat cytokiny (jako např. TNF- α , interleukin-1 a TGF- β), proteolytické enzymy (například metaloproteinázy) a růstové faktory (zejména růstový faktor tvořený destičkami a růstový faktor podobný insulinu-1) může být rozhodující v úloze těchto buněk při poškození a obnově při rozvoji aterosklerotických lézí.

Aktivované makrofágy zastupují třídu II histokompatibilních antigenů (HLA II), které umožňují prezentovat antigeny T-lymfocytům. T-buňky jsou aktivovány, když naváží antigen vyprodukovaný makrofágy. Aktivace T-buňky má za následek sekreci cytokinů včetně interferonu-gama a TNF- α a β , které zesilují zánětlivou odpověď. Buňky hladké svaloviny v lézích mají také na svém povrchu molekuly třídy HLA II (pravděpodobně vytvořené interferonem-gama) a mohou tedy vytvářet antigeny T-buňkám (Takeya 2005).

V aterosklerotických lézích se ve všech stádiích nachází jak CD4, tak i CD8 T-lymfocyty.

Imunomodulační molekula CD40 ligand může být produkována makrofágy, T-buňkami, endotelem a hladkou svalovinou v aterosklerotických lézích *in vivo*. Její receptor CD40 je přítomen na stejných buňkách. Oba jsou up-regulovány v aterosklerotických lézích. U myši s deficitem apoE bylo prokázáno, že inhibice CD40 protilátkami redukuje vznik léze.

2.5.4. Destičky

Adheze destiček a nástěnná trombóza jsou přítomné při vzniku a vývoji aterosklerotických lézí. Destičky mohou adherovat k dysfunkčnímu endotelu, obnaženému kolagenu a makrofágům. Pokud jsou aktivovány, uvolňují cytokiny a růstové faktory, které se společně s trombinem mohou podílet na migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny a monocytů. Aktivace destiček vede k tvorbě volné kyseliny arachidonové, která může být transformována v prostaglandiny (jako je například tromboxan A₂, což je jedna z neúčinnějších vazokonstrikčních a tromboagregačních látek) nebo v leukotrieny, které mohou zesílit zánětlivou odpověď.

Destičky jsou důležité v udržení cévní integrity a při ochraně proti spontánnímu krvácení. Aktivované destičky se mohou akumulovat na stěnách arterií a doplňovat další destičky do rostoucího trombu (Gavriš & Sergienko 1993).

2.5.5. Nestabilita a ruptura plátů

Ruptura plátů a trombóza jsou významnými komplikacemi, které vedou k nestabilním koronárním syndromům.

Ruptura jako komplikace aterosklerotického plátu je hluboké prasknutí s uvolněním trombogenního materiálu do krve, kdežto u tzv. eroze mluvíme o povrchovém odstranění endotelu díky apoptóze endotelových buněk na povrchu léze.

Aterosklerotické pláty můžeme rozdělit na stabilní a nestabilní. Stabilní plát má nízký obsah tuků a nemá tendenci k ruptuře s vytvořením následné trombózy, která pak obturuje cévní lumen. Nestabilní plát je bohatý na lipidy a při okrajích

často praská. Dává tak vzniknout trombóze, která se projeví akutní cévní příhodou (Boyle 2005) .

U pacientů s infarktem myokardu je nestabilita a ruptura plátů výsledkem eroze, ztenčení a ruptury vazivové čepičky. Děje se tak často na okrajích lézí, kudy mohou vstupovat makrofágy, kde se hromadí, aktivují a kde probíhá apoptóza. Rozpad vazivové čepičky může být také výsledkem působení metaloproteináz (jako jsou kolagenázy, elastázy a stromelyzíny). Také T-buňky mohou stimulovat produkci metaloproteináz v lézích, což způsobuje nestabilitu plátů a má za následek další imunitní odpověď. Tyto změny mohou být také doprovázeny produkcí tkáňových prokoagulačních faktorů a dalších hemostatických faktorů, které dále zesilují možnost vzniku trombózy.

Následkem ukládání plátů je zúžení cévního průsvitu, které může vést k ischemii. Dalšími následky tvorby plátů jsou ztuhnutí cévní stěny (kalcifikace), vznik trombů, které uzavírají zbylý průsvit a mohou způsobit periferní embolizaci, dále krvácení do plátů a do cévní stěny. Takto poškozená stěna může mimo jiné povolit tlaku a dokonce prasknout, takže dojde k nebezpečnému krvácení do okolní tkáně, např. z aorty nebo z mozkových cév (Stehbens 2002).

2.6. BUNĚČNÉ ADHEZIVNÍ MOLEKULY – VCAM-1

Buněčné adhezivní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Adhezivní molekuly se účastní řízení řady fyziologických dějů jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciaci, hojení ran, či obnova tkání. Uplatňují se ale také při patologických procesech, kde se např. podílejí na interakcích mezi složkami imunitního systému (Joseph-Silverstein

& Silverstein 1998). Podle strukturních vlastností je můžeme rozdělit na 4 základní skupiny. Jsou to selektiny, integriny, immunoglobulinová skupina a kadheriny.

Imunoglobulinová skupina adhezivních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců. Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce) (Mareckova et al 1999). Patří sem celá řada adhezivních molekul jako antigenně specifické receptory T a B-lymfocytů TCR, BCR, koreceptory T-lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

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

2.6.1. Struktura a funkce VCAM-1

Z hlediska struktury je tato adhezivní molekula transmembránový glykoprotein obsahující N-konec, sérii Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. VCAM-1 má 7 extracelulárních domén, přičemž domény 1 a 4 jsou specifická vazebná místa pro vazbu $\alpha_4\beta_1$ integrinu (VLA-4) a někdy pro vazbu $\alpha_4\beta_7$ integrinu (Springer 1995). VCAM-1 se podílí na stabilizaci vazby leukocytů k endotelu a podílí se tedy na jejich diapedezi a zřejmě navíc selektivně vycytává mononukleární leukocyty, protože ty na rozdíl od neutrofilů exprimují α_4 integriny (Cybulsky et al 1999).

2.6.2. Exprese VCAM-1

VCAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami (Blann & McCollum 1994). Studie na králících a myších prokázaly, že VCAM-1 je endoteliálními buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T – lymfocytů v oblastech, které jsou predispoziční ke vzniku lézí, přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především shear stresem (Iiyama et al 1999). U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 exprimován především endoteliálními i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 exprimován většinou buněk, které se nacházejí v intimě cév. Přesto se ukazuje, že VCAM-1 je exprimován především v oblastech výskytu lézí.

Exprese této adhezivní molekuly je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Hypercholesterolemie a oxidované LDL a diabetes zvyšují expresi VCAM-1 (Khan et al 1995). Také kouření, hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi VCAM-1 (Walpole et al 1995). Exprese molekuly je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- α nebo IL-1.

2.7. ENDOGLIN (CD 105)

2.7.1. Struktura proteinu

CD 105 se nachází na buněčném povrchu jako homodimerická, transmembránová bílkovina o rozměru 180 kDa. Vnější domény váží s vysokou afinitou izoformy TGF- β 1 a TGF- β 3 (Obreo et al 2004).

Transmembránové a intracelulární domény CD 105 mají podobnost s betaglykanem ze 71% (Letamendia et al 1998).

Endoglin je převážně tvořen v cévních endoteliálních buňkách a jeho tvorba se zvyšuje při hypoxii. Dále byla jeho exprese detekována u makrofágů, hladkých svalových buněk a fibroblastů. Endoglin je považován za významný marker angiogeneze a tudíž je jeho exprese významná jak v embryonálním vývoji, tak také při procesu hojení ran, při infarktech a během kancerogeneze (Guerrero-Esteo et al 1999). Jeho zvýšená exprese je dávana do souvislosti s horší prognózou nádorového onemocnění. Mutace genu pro endoglin navíc vede k rozvoji hereditární hemorhagické telangiektázie (Lebrin et al 2005).

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

2.8. STATINY

Statiny jsou dnes běžně indikovanými léky u pacientů s komplikacemi aterosklerózy a stojí po boku „základním“ kardiologickým preparátům, jakými jsou např. betablokátory, kyselina acetylsalicylová nebo ACE inhibitory. Pro svou účinnost a minimum nežádoucích účinků se řadí k nejčastěji předepisovaným hypolipidemikům. Léčba statiny se v posledních několika letech výrazně rozšířila. Před deseti lety byly statiny vyhrazeny nejtěžším formám familiárních hypercholesterolémií, dnes jsou indikovány u osob, které mají vedle dalších kritérií zcela normální nebo jen hraničně vyšší hladiny sérového cholesterolu. Statiny patří mezi preparáty, které by zřejmě neměly chybět u žádného pacienta s ICHS. Stále častěji se s nimi setkáváme u diabetiků a osob s metabolickým syndromem, kde jsou většinou součástí kombinačních hypolipidemických režimů (Vaughan et al 2000).

Hlavní indikací statinů zůstává hypercholesterolemie nebo smíšená dyslipidémie s převahou hypercholesterolemie u pacientů s manifestní aterosklerózou nebo ve vysokém riziku aterotrombotických komplikací (van Nieuw Amerongen et al 2000).

Statiny jsou tedy indikovány především u nemocných s izolovanou hypercholesterolemií včetně heterozygótů familiární hypercholesterolemie. Uplatnění však mohou nalézt i v terapii smíšené hyperlipoproteinémie, účinek léčby statiny je optimální tehdy, jestliže vstupní hodnota triglyceridů nepřesahuje hodnotu 4 mmol/l. Při vyšších hodnotách triglyceridů statiny v monoterapii selhávají a je třeba užít kombinaci s fibráty (někteří autoři doporučují vysokou dávku statinů v monoterapii). V terapii homozygótů familiární hypercholesterolemie statiny bohužel obvykle selhávají. Pozitivních výsledků bylo dosaženo pouze s vysokou dávkou atorvastatinu (Auer et al 2002).

V roce 2003 byla publikovaná rozsáhlá metaanalýza několika desítek studií, ze které vyplývá, že terapie statiny snižuje riziko kardiovaskulárních příhod o 61% a riziko ischemické cévní mozkové příhody o 17%. K dispozici je však řada důkazů pro podávání statinů i v jiných situacích než je dlouhodobá prevence komplikací aterosklerózy, např. pozitivní přínos časné zahájené terapie statiny u akutního koronárního syndromu-časné zahájená hypolipidemická léčba vedoucí k „dramatickým“ poklesům koncentrací LDL-cholesterolu dokonce výrazně pod uznávané cílové hodnoty přináší nemocným s akutním koronárním syndromem významné snížení rizika (Mori & Saito 2002).

Statiny se nepodávají pouze v monoterapii, ale jsou i důležitou součástí kombinované léčby. Dlouhou dobu byly užívány v kombinaci s pryskyřicemi, nyní se do popředí při snaze o maximální snížení LDL-CH dostává kombinace

s ezetimibem. Další kombinace s fibráty nachází místo v terapii smíšených hyperlipidemií. S rostoucím významem metabolického syndromu se kromě kombinace statin+fibrát uplatní i kombinace statin+niacin.

V klinické praxi jsou u nás používány tyto statiny: lovastatin, pravastatin, simvastatin, atorvastatin, fluvastatin a rosuvastatin. Největší pokles LDL byl zaznamenán u atorvastatin (60%) a simvastatinu (40%). TAG nejúčinněji snižuje fluvastatin (31%), po kterém také nejvíce stoupá koncentrace HDL (Hernandez et al 2003).

2.8.1. MECHANISMUS ÚČINKU STATINŮ

V roce 1976 zjistili Endo a spol., že produkt plísně *Penicilium citricum* snižuje syntézu cholesterolu kompetitivní inhibicí klíčového enzymu biosyntézy cholesterolu 3-HMG-CoA reductázy (statiny tzv. I. generace-lovastatin, simvastatin a pravastatin jsou produkty plísní, II. generace-fluvastatin je semisyntetický racemát a III. generace-atorvastatin a cerivastatin jsou již plně syntetické). Tento enzym katalyzuje přeměnu 3-HMG-CoA na mevalonát, což je jeden z prvních kroků biosyntézy cholesterolu. Snížením nitrobuněčné syntézy cholesterolu se buňka dostává do situace deficitu cholesterolu, což vede ke zvýšené expresi LDL receptorů na buněčné membráně všech buněk, především ale hepatocytů. Zvýšená syntéza a zvýšení aktivity LDL receptorů umožňují urychlené vychytávání LDL partikulí z plazmy (Davignon & Mabile 2001).

Hypolipidemický účinek statinů je poměrně dobře objasněn, zatímco dosud není jednoznačně vysvětlen mechanismus, jakým statiny snižují koncentraci triglyceridů. Předpokládá se především snížení syntézy VLDL v játrech, dalším možným mechanismem je zvýšení clearance a odbourávání VLDL cestou LDL

receptorů, jejichž počet se na povrchu hepatocytů zvyšuje. Chylomikronové remnanty obsahují totiž stejně jako VLDL apolipoprotein E, který je schopen navázat lipoproteinovou částici na LDL receptor.

Podle výsledků mnoha prací zabývajících se vlivem statinů na parametry tukového metabolismu lze shrnout a uvést, že léčba statiny snižuje koncentrace celkového cholesterolu o 20-30%, LDL-cholesterolu o 25-40%, triglyceridů o 5-20% a současně mírně zvyšuje koncentrace HDL-cholesterolu o 5-10%. Těmto změnám odpovídají i změny ve spektru apolipoproteinů-významný pokles koncentrace apolipoproteinu B a mírný vzestup hladiny apolipoproteinu A-I.

Co se týče změny zastoupení aterogenních „malých denzích LDL částic“ a velkých neaterogenních LDL částic, donedávna platil názor, že statiny se chovají vesměs neutrálně a poměr těchto částic se nemění. Teprve v nedávné době se prokázalo, že u nemocných se smíšenou HLP dochází ke snížení výskytu aterogenních „small dense LDL“ po léčbě statiny (Bellosta et al 2000).

2.8.2. PLEIOTROPNÍ ÚČINKY STATINŮ

Statiny jsou schopny ovlivňovat také řadu dějů, které však nesouvisejí s hladinami lipidů. Tyto účinky statinů jsou označovány jako nelipidové nebo pleiotropní. Tento tzv. nehypolipidemický efekt vede ke snížení nejen koronární a kardiovaskulární, ale i celkové mortality (Calabro & Yeh 2005). Jedná se zejména o:

- ▶ inhibici proliferace hladkých svalových buněk cévní stěny
- ▶ úpravu endoteliální dysfunkce
- ▶ stabilizaci aterosklerotického plátu
- ▶ protizánětlivé působení

► snížení trombotické pohotovosti

Za zcela nelipidový účinek statinů je třeba považovat jejich antiagregační působení, které je nejvíce vyjádřeno u pravastatinu. Druhým typicky nelipidovým účinkem statinů je inhibice proliferace hladkých svalových buněk ve stěně cévní. Tento účinek je nejvíce vyjádřen u fluvastatinu a simvastatinu, ale i u lovastatinu, naopak u pravastatinu prakticky chybí. Zatímco většina autorů považuje inhibici proliferace myocytů za pozitivní efekt léčby, který působí protiterogenně, objevují se i názory zcela opačné. Ty považují proliferaci myocytů za významný faktor při stabilizaci plátů a pozitivní vliv inhibice proliferace zpochybňují.

Po podání statinů (původní pozorování je popsáno po lovastatinu, později byly publikovány práce se všemi statiny v klinické praxi) dochází ke zlepšení endoteliální funkce, konkrétně ke zlepšení koronární vazodilatace po stimulačním podnětu (např. po podání acetylcholinu). Tento účinek však může být vysvětlen jistě i jen hypocholesterolemizujícím efektem statinu.

Po léčbě statiny dochází ke stabilizaci aterosklerotického plátu. Tento efekt je však opět snadno vysvětlitelný právě snížením hladiny cholesterolu (Arnaud & Mach 2005).

Velmi diskutovanou otázkou je možný pozitivní účinek statinů na srdeční selhání. Potenciální přínos statinů pro nemocné s chronickým srdečním selháním souvisí velmi pravděpodobně s výše popsányi lipidovými i nelipidovými účinky této skupiny léků.

2.8.3. ATORVASTATIN

Atorvastatin patří do skupiny hypolipidemik, která nejvýznamněji snižují celkový a LDL-cholesterol. Je indikován u nemocných s izolovanou

hypercholesterolémií a se smíšenou hyperlipoproteinémií s převahou hypercholesterolémie a jen mírným zvýšením triglyceridů. Kromě monoterapie je používán v kombináční léčbě s fibráty, s inhibitory vstřebávání cholesterolu (ezetimibem), i s pryskyřicemi (Duriez 2003).

Atorvastatin je účinné hypolipidemikum ze skupiny statinů. Ve srovnání s ostatními dostupnými statiny je jeho účinek srovnatelný nebo vyšší, incidence nežádoucích účinků je přitom srovnatelná s ostatními statiny (Seljeflot et al 2002). Z obvykle udávaných výsledků terapie statiny vybočují výsledky studií s atorvastatinem. Atorvastatinem dosahované poklesy celkového a LDL-cholesterolu odpovídají již při běžně užívaných dávkách (10 mg) vesměs nejvýraznějším změnám, zdůrazňována je také vysoká schopnost atorvastatinu snižovat koncentrace triglyceridů-výrazněji, než ostatní léky této skupiny. Již při obvyklých dávkách dochází k poklesu koncentrace triglyceridů okolo 20% (Vaughan et al 1996).

2.8.3.1. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku atorvastatinu, stejně jako ostatních statinů, spočívá v selektivní kompetitivní inhibici 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy (HMG-CoA reduktáza) (Duriez 2003). HMG-CoA reduktáza je enzym zodpovědný za syntézu kyseliny mevalonové, která je výchozím metabolitem pro tvorbu cholesterolu de novo. Nedostatek cholesterolu v játrech vyvolaný inhibicí jeho novotvorby vede ke zmnožení receptorů pro LDL na povrchu jaterních buněk s následným zvýšením katabolismu LDL. Výše uvedeným mechanismem dochází po podání atorvastatinu k výraznému snížení koncentrace celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a malých denzních částic LDL při signifikantním zvýšení koncentrace

HDL-cholesterolu. Dále dosud ne zcela známým mechanismem výrazněji než ostatní statiny snižuje koncentrace triacylglycerolů.

Mimo výše uvedené účinky atorvastatin (stejně jako ostatní inhibitory HMG-CoA reduktázy) inhibuje destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor-PDGF), což vede ke snížení migrace makrofágů do subendoteliálního prostoru a ke snížení migrace a proliferace buněk hladké svaloviny a fibroblastů v subendoteliálním prostoru; následně pak dochází ke zlepšení funkce cévního endotelu. Atorvastatin má určité antitrombotické působení (snížení koncentrace komplexu trombin-antitrombin III, trombomodulinu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu) (Wierzbicki et al 2003).

2.8.3.2. Nežádoucí účinky a interakce

Atorvastatin je ve většině případů dobře snášen, celkový výskyt nežádoucích účinků v kontrolovaných studiích byl velmi podobný jako u ostatních statinů. V převážné míře se jednalo o málo závažné nespecifické nežádoucí účinky, které obvykle neměly kauzální souvislost s terapií atorvastatinem (podobný výskyt byl po podání placebo). Specifické nežádoucí účinky se objevily u méně než 5 % pacientů. Pouze u necelých 2 % pacientů bylo nutné terapii atorvastatinem přerušit z důvodů nežádoucích účinků. Nejčastěji se vyskytly gastrointestinální nežádoucí účinky, jako je plynatost (3 %), zácpa (2 %) nebo naopak průjem (1 %) a bolest břicha (1 %). Výskyt těchto nežádoucích účinků nepřevyšoval jejich četnost po podání placebo. Výskyt myalgií, případně dalších poruch muskuloskeletálního ústrojí (v průměru 2 %) nepřesahoval výskyt těchto nežádoucích účinků pozorovaný po podání ostatních statinů (v průměru 3 %). Zvýšení hodnot kreatinfosfokinázy nad

trojnásobek horní hranice normy se vyskytlo u 2,5 % pacientů (Endres & Laufs 2004).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo detekovat a kvantifikovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu ve stěně cévy u kmene myší C57BL/6J, kterým byla podávána standardní laboratorní dieta. Dále byl sledován vliv krátkodobě podávaného hypolipidemika atorvastatinu na změnu v expresi těchto endoteliálních markerů. Pro zobrazení exprese VCAM-1 a endoglinu byly využity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci jejich exprese stereologické metody.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Jako experimentální model byli použiti samci myši kmene C57BL/6J ve věku 4 týdnů. Myši byly rozděleny do 2 skupin (v obou skupinách bylo 8 jedinců). První skupinou byly C57BL/6J myši krmeny standardní laboratorní dietou po dobu 12 týdnů. Druhé skupině myši byl k této dietě přidáván atorvastatin v množství 10mg/kg. Dávka atorvastatinu byla zvolena dle dávky použité v předcházejících experimentech jiných autorů (Choudhury et al 2004). Všechna zvířata dostávala atorvastatin po dobu 8 týdnů. V průběhu experimentu se nevyskytly žádné rozdíly v týdenních průměrech spotřeby potravy nebo v hmotnosti zvířat.

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

4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

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

4.3. IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm dlouhých segmentech aortálního sinu a aortálního oblouku. Vzorky se ponořily do OCT směsi (Leica, Německo), následně byly zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy v chladničce při -80°C . Poté byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce $7\ \mu\text{m}$ na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C . Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy po 15 minutovém usušení vložily na 10 minut do PBS(phosphate saline buffer). PBS je roztok fosfátových solí, který během barvení sloužil jako pufr o pH 7,4 a vytvářel ideální prostředí pro barvení. Řezy se na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo), aby se zablokovala nespecifická vazebná místa. Poté se nechaly inkubovat s avidinem D(15 minut), opláchly se v PBS, nechaly se inkubovat s biotinem (15 minut) a opět se opláchly v PBS. 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. V experimentu byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD31(platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) ředěná v BSA 1/100
 - monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106(VCAM-1) ředěná v BSA 1/100
 - monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD105(endoglin), zředění 1/50.
- Všechny protilátky byly zakoupeny ve firmě BD Pharmingen (California, USA). Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do 10% goat séra v PBS. Dále

se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) – rat anti-goat u VCAM-1 a endoglinu, která byla značena biotinem(Vector Laboriem, USA) a opět se řezy vložily do roztoku PBS(5 minut). Pak se řezy vložily na 15 minut do 3% roztoku peroxidu vodíku PBS. Opět se řezy vložily do roztoku PBS(2x5 minut). Připravili jsme ABC komplex elite (Vector Laboriem, USA) z roztoku A a roztoku B, do kterého jsme vložili řezy na 30 minut. Řezy se nechaly opláchnout v PBS. K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidin(DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton–xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton–xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontována do eukittu.

4.4. PRACOVNÍ POSTUP

1.	nechat uschnout řezy	60 minut
2.	fixace aceton (uschovaný v – 20 stupních)	15 minut
3.	usušit	15 minut
4.	PBS	10 minut
5.	10% zvířecí serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	30 minut
6.	inkubace s avidin D	15 minut
7.	oplach v PBS	5 minut
8.	inkubace s biotinem	15 minut
9.	PBS	oplach
10.	primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
11.	PBS 1	2x5 minut
12.	10% serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera)	15 minut

13.	sekundární protilátka (+ mouse serum v PBS)	30 minut
14.	PBS 3	5 minut
15.	3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
16.	PBS 4	2x5 minut
17.	ABC komplex elite	30 minut
18.	PBS 5	5 minut
19.	DAB (podle návodu)	nutno určit čas
20.	destilovaná voda	oplach
21.	aceton	oplach
22.	aceton-xylen (10:1)	3 minuty
23.	aceton-xylen (1:10)	3 minuty
24.	3x xylen	2 minuty
25.	Eukitt – montování krycího sklíčka	

4.5. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ

Plochy endoteliální exprese PECAM-1, VCAM-1 a endoglinu byly kvantifikovány pomocí stereologických metod (Nachtigal et al 2004). Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μ m (0,385mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé imunohistochemické barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý jedenáctý řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 200 průsečíků mezi body sítě a aterosklerotickým plátem na jednu cévu (Gundersen et al 1988). Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P$$

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

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

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

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

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

4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA

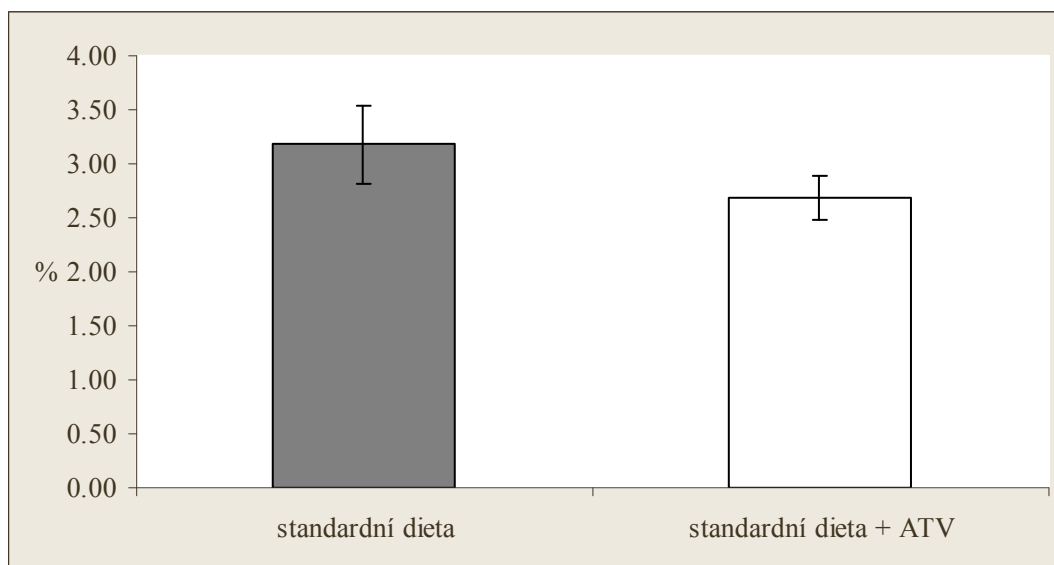
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (One Way Anova). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p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

4.7. VÝSLEDKY

4.7.1. Biochemická analýza

Podávání atorvastatinu u C57BL/6J myši krmených standardní dietou snížilo hladinu cholesterolu v porovnání s C57BL/6J skupinou myši, kterým byla podávána pouze aterogenní dieta, ale bez dosažení statistické významnosti (2.69 ± 0.21 vs. 3.18 ± 0.36 mmol/l, $P = 0.277$).

Graf č.1: Hladiny celkového cholesterolu u obou experimentálních skupin. Podávání atorvastatinu nevedlo ke snížení hladiny celkového cholesterolu ve srovnání se skupinou, které byla podávána pouze standardní dieta ($P = 0.277$).



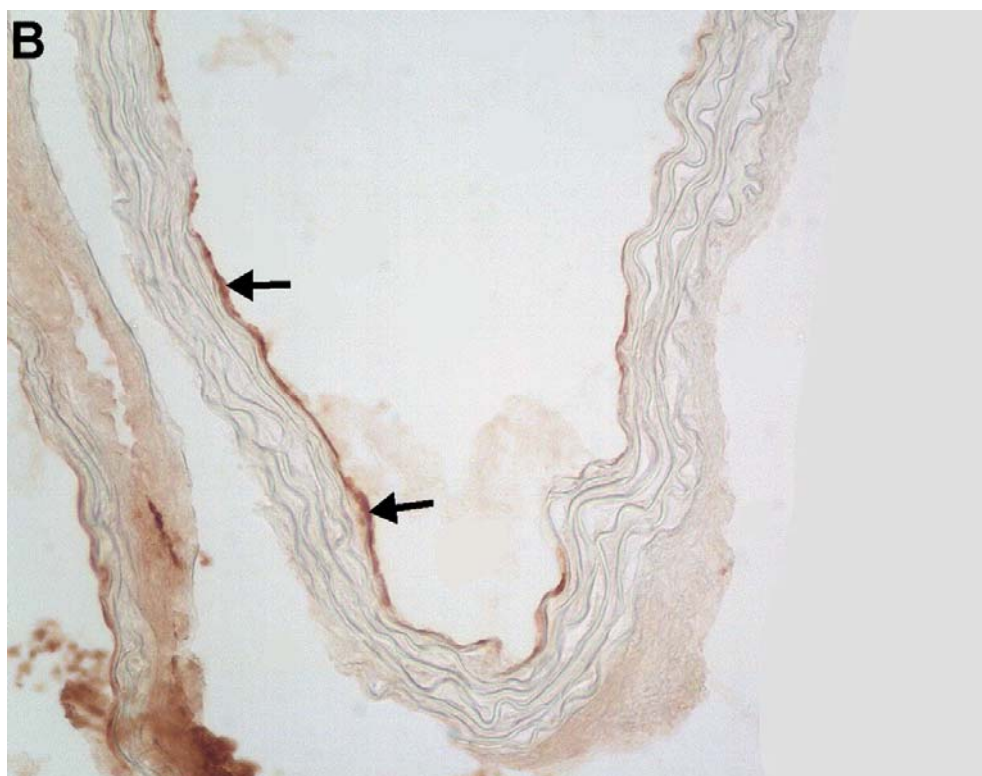
4.7.2. Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu

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

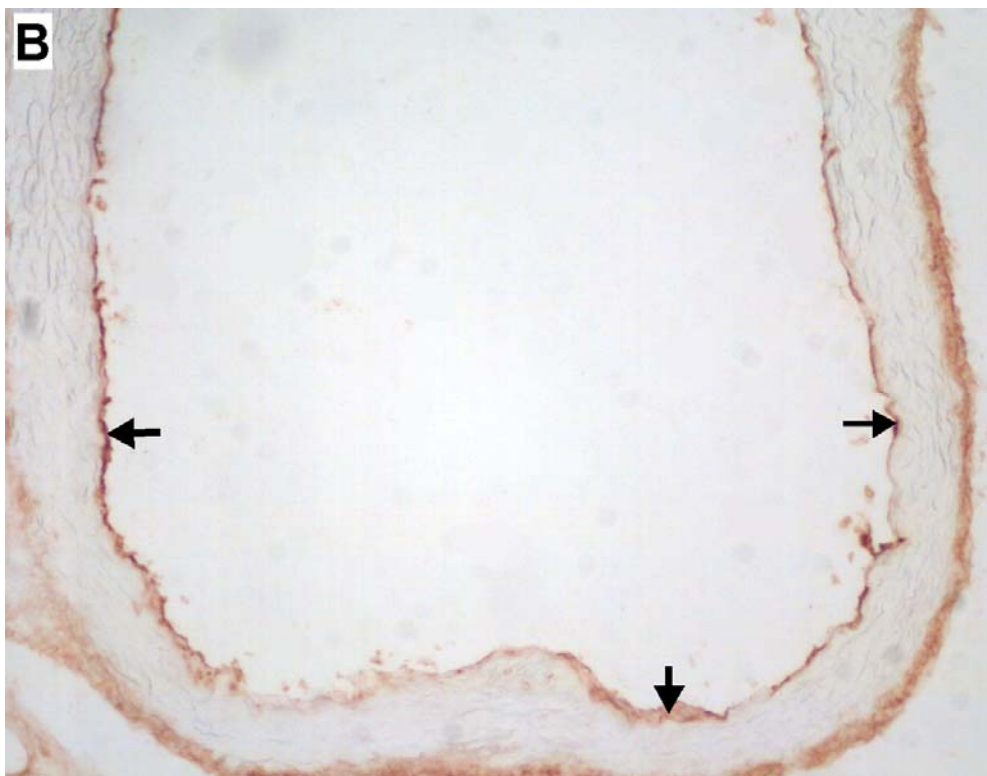
Expresí VCAM-1 byla pozorována převážně v endotelu aorty u obou skupin zvířat (viz obr. 1). Pouze velmi slabá exprese byla nalezena v kapilárách okolního myokardu. Podávání atorvastatinu vedlo k výrazné změně intenzity barvení VCAM-1. Byla zachována částečná exprese na endotelu, nicméně intenzita barvení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

Expresí endoglinu v experimentu byla detekována v endotelu aorty u všech zvířat. Dále byla pozorována v myokardu a to v kapilárách a v endotelu menších cév. Expresí endoglinu byla podobná z hlediska lokalizace u všech myší v experimentu. Podávání atorvastatinu prakticky neovlivnilo expresi endoglinu v endotelu aorty (viz obr. 2).

Obr. 1: Expres VCAM-1 v endotelu aortálního sinu cholesterolové skupiny zvířat (A) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B). Expres je pozorována pouze v endoteliálních buňkách (viz šipky). Z obrázku je patrné, že podávání atorvastatinu snížilo endoteliální expresi VCAM-1. Zvětšení 100x



Obr. 2: Expze endoglinu v endotelu aortálního sinu cholesterolové skupiny zvířat (A) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B). Endoteliální expze endoglinu nebyla po podávání atorvastatinu výrazně snížena (B). Zvětšení 100x.

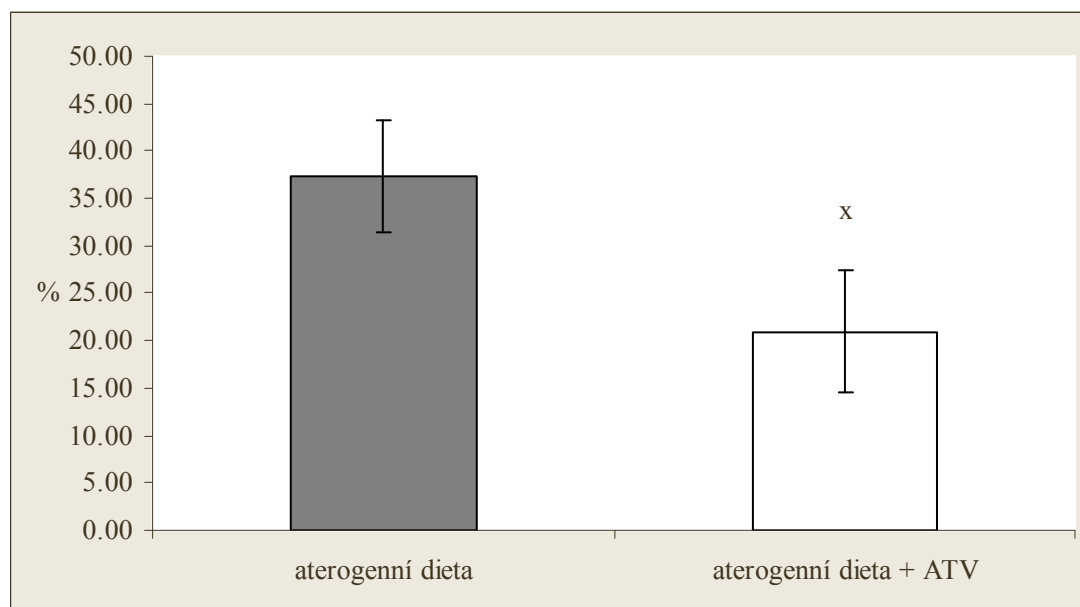


4.7.3. Stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu.

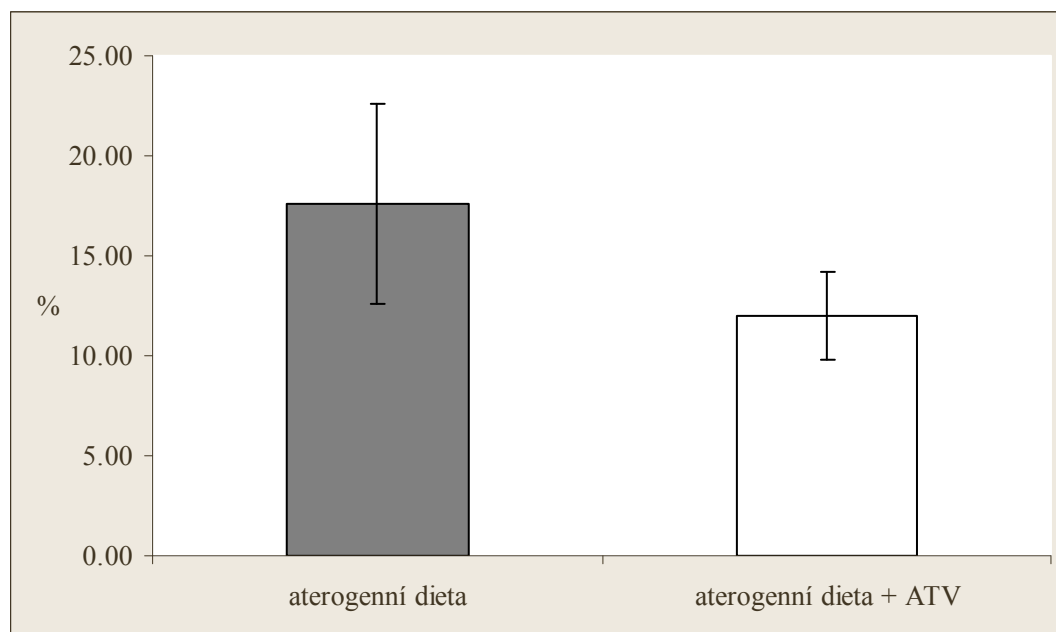
Kvantitativní stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu byla vztažena k expresi PECAM-1 na endotelu, který vyjadřuje 100%-ní přítomnost endoteliálních buněk. Výsledky tedy vyjadřují procento aktivovaných buněk barvených VCAM-1 nebo endoglinem. Podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu snížení endoteliální exprese VCAM-1 (20.9 ± 6.4 vs. 37.3 ± 5.8 %, $P = 0.005$) v porovnání s neléčenými myšmi (obr. 1).

Naopak se ukázalo, že exprese endoglinu byla po podávání atorvastatinu snížena pouze mírně a tedy statisticky nevýznamně ve srovnání s neléčenou skupinou.

Graf č. 2: Stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 v aortálním sinu. Exprese VCAM-1 byla po podávání atorvastatinu signifikantně snížena ve srovnání s neléčenou skupinou ($^xP = 0.005$).



Graf č. 3: Stereologická analýza endoteliální exprese endoglinu v aortálním sinu. Kvantitativní analýza neprokázala signifikantní snížení exprese endoglinu po podávání atorvastatinu ve srovnání s nelečenou skupinou ($P = 0,303$).



5. DISKUSE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které 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 (Ross 1999). V souvislosti se zánětem se intenzivně studuje úloha adhezivních molekul, složek imunitního systému, ale i dalších faktorů modifikujících zánětlivou reakci, které tak obecně participují na rozvoji a vzniku klinických komplikací aterosklerózy (Nilsson 2005). Za základní a první krok v patogenezi aterosklerózy je dnes považována endoteliální dysfunkce charakterizovaná aktivací endotelu s následnou expresí zánětlivých, proliferčních a vazokonstrikčních markerů.

Tato diplomová práce byla proto zaměřena na možnosti ovlivnění endoteliální exprese dvou různých markerů: VCAM-1 a endoglinu u C57BL/6J myši krměných standardní dietou a po podávání atorvastatinu.

Adhezní molekuly VCAM-1 a další, jako např. ICAM-1 a selektiny, jsou markery endoteliální dysfunkce a to jak v časných, tak i pokročilejších stádiích aterogeneze. Jejich exprese se zvyšuje při hypercholesterolemii a jsou zásadní pro vstup makrofágů a lymfocytů do cévní intimy, čímž se výrazně podílejí na progresi aterosklerotických změn (Nakashima et al 1998).

CD 105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu TGF- β (Conley et al 2000). Exprese endoglinu převládá na endoteliálních buňkách, makrofázích, fibroblastech a hladkých svalových buňkách medie (Obreo et al 2004). Kromě toho bylo demonstrováno, že exprese endoglinu je zvýšena během angiogeneze a při vývoji nádorového onemocnění. Mimoto byla exprese endoglinu zvýšena v hladkosvalových buňkách a endoteliálních buňkách v pokročilých aterosklerotických lézích v prasečích karotidách (Behr-Roussel et al 2000).

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

Myši jsou za normálních podmínek vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Hladinu cholesterolu mají kolem 2 mmol/l a cholesterol je lokalizován hlavně v antiaterogenních HDL-lipoproteinech a tudíž se u nich neformují aterosklerotické léze. Nicméně pokud se myším podává dieta s vysokým obsahem cholesterolu a kyselinou cholovou, jejich hladina cholesterolu se dvojnásobně až trojnásobně zvýší. K indukci hypercholesterolemie a rozvoji aterogenních změn je nejnáchylnější kmen myši C57BL/6J (Breslow 1996).

Vzhledem k tomu, že indukce aterogenních změn pomocí vysokocholesterolové diety byla součástí práce kolegyně Metelkové, jsme se rozhodli popsat změny exprese VCAM-1 a endoglinu u normocholesterolemických zvířat.

V souladu s literárními zdroji se nám podle očekávání nepodařilo zjistit žádné aterosklerotické léze, ani další morfologické abnormality ve stěně cévy u těchto myši. Tato skutečnost však pro nás byla příznivá, neboť jsme se chtěli zaměřit

především na studium chování endotelu ještě před formováním morfologicky detekovatelných aterosklerotických lézí.

Statiny jsou inhibitory HMG-CoA reduktázy, enzymu, který se podílí na syntéze cholesterolu (na přeměně HMG-CoA na mevalonát). Dochází ke zvýšené expresi LDL receptorů, které odstraňují LDL-cholesterol a prekurzory LDL - cholesterolu z cirkulace (Endres & Laufs 2004). Řada klinických a experimentálních prací z poslední doby však také jednoznačně poukazuje na to, že statiny zlepšují funkci endotelu, zvyšují stabilitu krevních destiček, snižují oxidační stres a působí také protizánětlivě (Sukhova et al 2002). Tyto účinky se nazývají jako pleiotropní nebo také nelipidové.

V této práci jsme sledovali vliv atorvastatinu na hladiny celkového cholesterolu a na expresi VCAM-1 a endoglinu v endotelu aorty v oblasti aortálního sinu a aortálního oblouku.

Podávání atorvastatinu neovlivnilo celkovou hladinu cholesterolu u C57BL/6J myši ve srovnání s neléčenou skupinou. Navzdory tomu se ukázalo, že v atorvastatinové skupině došlo k významnému snížení endoteliální exprese VCAM-1. Vzhledem k tomu, že k tomuto účinku došlo bez ovlivnění hladiny, lze předpokládat přímý vliv atorvastatinu na expresi VCAM-1. Expze řady zánětlivých faktorů, které se uplatňují v ateroskleróze, je regulována podle NF- κ B transkripčního faktoru (Collins & Cybulsky 2001). V řadě studií bylo také prokázáno, že statiny inhibují aktivaci tohoto faktoru bez ohledu na vliv na hladiny cholesterolu (Hernandez-Presa et al 2003). Vzhledem k těmto faktům lze předpokládat, že snížení endoteliální exprese VCAM-1 po podávání atorvastatinu je dáno právě ovlivněním aktivity NF- κ B. Podobný efekt statinů na expresi adhezních molekul bez

hypolipidemického účinku byl pozorován i v jiných studiích na experimentálních modelech aterosklerózy (Sukhova et al 2002; Nachtigal et al 2005).

Stereologická analýza endoteliální exprese endoglinu ukázala statisticky nevýznamné snížení po podávání atorvastatinu. Nicméně bylo prokázáno, že i exprese endoglinu by mohla být regulována právě prostřednictvím NF- κ B. Navíc v dalších studiích na Katedře biologických a lékařských věd bylo zjištěno, že exprese endoglinu je snížena po podávání atorvastatinu u apoE deficientních myší a C57BL/6J myší krmených aterogenní dietou. V současné době nemáme vysvětlení, proč nebylo toto snížení pozorováno i u C57BL/6J myší krmených standardní dietou. Vzhledem k dalším pracím na Katedře biologických a lékařských věd, které sledují problematiku exprese endoglinu, lze tedy předpokládat, že zřejmě existuje vztah mezi hladinou cholesterolu a expresí endoglinu a lze tedy tvrdit, že statiny zřejmě mohou ovlivňovat jeho expresi v cévním endotelu.

Jak již bylo naznačeno dříve, endoglin je schopen modulovat účinky významného cytokinu TGF- β . Bylo například prokázáno, že endoglin antagonizuje inhibiční účinky TGF- β na endotelové buňky, což pak má za následek rozvoj angiogeneze (Gamble et al 1995). Vzhledem k tomu, že TGF- β působí protizánětlivě, inhibuje činnost makrofágů a T-lymfocytů a snižuje expresi adhezních molekul (McCaffrey et al 1999), lze předpokládat, že zvýšená exprese endoglinu by mohla tyto účinky inhibovat a přispívat tak k rozvoji aterogenních změn. Tudíž snížení exprese endoglinu po podávání statinů by mohlo představovat další z možných mechanismů, jak statiny mohou pozitivně ovlivňovat aterogenní proces.

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium exprese vybraných markerů endoteliální dysfunkce VCAM-1 a endoglinu v cévní stěně u kmene C57BL/6J myši po podávání standardní diety. Exprese těchto markerů byla sledována v oblasti aortálního sinu a aortálního oblouku. Pomocí imunohistochemických a stereologických metod byly hodnoceny změny exprese VCAM-1 a endoglinu po osmitýdenním podávání atorvastatinu.

Biochemická analýza krevních vzorků ukázala, že podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny celkového cholesterolu v plazmě C57BL/6J myši krmených standardní dietou ve srovnání s neléčenou skupinou.

Stereologická analýza imunohistochemického barvení ukázala, že podávání atorvastatin (10mg/kg denně) signifikantně snížilo endoteliální expresi VCAM-1.

Naproti tomu endoteliální exprese endoglinu nebyla po statinové terapii změněna.

Tato diplomová práce potvrdila protizánětlivý účinek atorvastatinu na cévní endotel.

I přesto, že jsme neprokázali vliv podávání atorvastatinu na expresi endoglinu, lze vzhledem k dalším studiím probíhajícím paralelně s touto tvrdit, že atorvastatin snižuje expresi endoglinu a to jak za současného hypolipidemického účinku, tak i bez něj. Vzhledem k tomu, že endoglin je modulátor funkce antiaterogenního faktoru TGF- β , může hrát změna jeho exprese významnou roli v procesu aterogeneze.

7. SEZNAM LITERATURY

- Arnaud, C., Mach, F. (2005) Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **98**: 661-666
- Auer, J., Berent, R., Weber, T., Eber, B. (2002) Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem.* **9**: 1831-1850
- Badimon, J. J., Lettino, M., Toschi, V., Fuster, V., Berrozpe, M., Chesebro, J. H., Badimon, L. (1999) Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation.* **99**: 1780-1787
- Behr-Roussel, D., Rupin, A., Simonet, S., Bonhomme, E., Coumailleau, S., Cordi, A., Serkiz, B., Fabiani, J. N., Verbeuren, T. J. (2000) Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* **102**: 1033-1038
- Bellosta, S., Ferri, N., Arnaboldi, L., Bernini, F., Paoletti, R., Corsini, A. (2000) Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care.* **23 Suppl 2**: B72-78
- Blann, A. D., McCollum, C. N. (1994) Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* **72**: 151-154
- Boyle, J. J. (2005) Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol.* **3**: 63-68
- Breslow, J. L. (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science.* **272**: 685-688
- Calabro, P., Yeh, E. T. (2005) The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol.* **20**: 541-546
- Cannon, R. O., 3rd (1998) Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* **44**: 1809-1819
- Catena, C., Novello, M., Lapenna, R., Baroselli, S., Colussi, G., Nadalini, E., Favret, G., Cavarape, A., Soardo, G., Sechi, L. A. (2005) New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a). *J Hypertens.* **23**: 1617-1631
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., Stern, D. M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* **91**: 3527-3561
- Collins, T., Cybulsky, M. I. (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* **107**: 255-264
- Coniglio, R. I., Colombo, O., Vasquez, L., Salgueiro, A. M., Otero, J. C., Malaspina, M. M. (1997) [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. *Medicina (B Aires).* **57**: 21-28
- Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, C., Vary, C. P. (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* **153**: 323-335
- Cybulsky, M. I., Lichtman, A. H., Hajra, L., Iiyama, K. (1999) Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta.* **286**: 207-218

- D'Agostino, R. B., Jr., Hamman, R. F., Karter, A. J., Mykkanen, L., Wagenknecht, L. E., Haffner, S. M. (2004) Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care*. **27**: 2234-2240
- Daubresse, J. C. (2000) [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux*. **21**: A359-362
- Davignon, J., Ganz, P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. **109**: III27-32
- Davignon, J., Mabile, L. (2001) [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)*. **62**: 101-112
- Dejana, E., Bazzoni, G., Lampugnani, M. G. (1999) Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res*. **252**: 13-19
- Duriez, P. (2003) [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie*. **58**: 5-14
- Endres, M., Laufs, U. (2004) Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke*. **35**: 2708-2711
- Gamble, J. R., Bradley, S., Noack, L., Vadas, M. A. (1995) TGF-beta and endothelial cells inhibit VCAM-1 expression on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **15**: 949-955
- Gavriish, A. S., Sergienko, O. V. (1993) [The functional morphology of the thrombocytes and their role in the pathogenesis of atherosclerosis and ischemic heart disease (a review of the literature)]. *Lik Sprava*. 31-36
- Gudev, A. (1996) [The role of the oxidative modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Mol Med (Sofia)*. **1**: 31-38
- Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendia, A., Perez-Alvarez, M. J., Langa, C., Lopez, L. A., Fabra, A., Garcia-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M., Bernabeu, C. (1999) Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. **78**: 614-623
- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., et al. (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. **96**: 857-881
- Handzha, I. M. (2001) [Viral infection, atherosclerosis, and ischemic heart disease]. *Lik Sprava*. 65-67
- Hernandez-Presa, M. A., Ortego, M., Tunon, J., Martin-Ventura, J. L., Mas, S., Blanco-Colio, L. M., Aparicio, C., Ortega, L., Gomez-Gerique, J., Vivanco, F., Egido, J. (2003) Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res*. **57**: 168-177
- Hernandez, C., Lecube, A., Barbera, G., Chacon, P., Lima, J., Simo, R. (2003) Effects of hypolipidemic treatment on serum markers of vascular inflammation in dyslipidemic men. *Med Sci Monit*. **9**: CR114-119
- Chan, N. N., Vallance, P., Colhoun, H. M. (2003) Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **23**: 1048-1054
- Chlopicki, S., Gryglewski, R. J. (2005) Angiotensin converting enzyme (ACE) and HydroxyMethylGlutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors in the forefront of pharmacology of endothelium. *Pharmacol Rep*. **57 Suppl**: 86-96
- Choudhury, R. P., Carrelli, A. L., Stern, J. D., Chereshev, I., Soccio, R., Elmalem, V. I., Fallon, J. T., Fisher, E. A., Reis, E. D. (2004) Effects of simvastatin on

- plasma lipoproteins and response to arterial injury in wild-type and apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res.* **41**: 75-83
- Iacoviello, L., Donati, M. B., de Gaetano, G. (2001) [Novel risk factors for atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and cholesterol as predictors of peripheral arteriopathy]. *Ital Heart J Suppl.* **2**: 1031-1033
- Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., Li, H., DiChiara, M., Medoff, B. D., Cybulsky, M. I. (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res.* **85**: 199-207
- Ikeda, U., Shimada, K. (2001) Pleiotropic effects of statins on the vascular tissue. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* **1**: 51-58
- Joseph-Silverstein, J., Silverstein, R. L. (1998) Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest.* **16**: 176-182
- Khan, B. V., Parthasarathy, S. S., Alexander, R. W., Medford, R. M. (1995) Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* **95**: 1262-1270
- Laurila, A., Bloigu, A., Nayha, S., Hassi, J., Leinonen, M., Saikku, P. (1997) Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**: 2910-2913
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., Ten Dijke, P. (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* **65**: 599-608
- Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L. M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L., Bernabeu, C. (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem.* **273**: 33011-33019
- Mareckova, Z., Heller, S., Horky, K. (1999) [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek.* **45**: 46-50
- McCaffrey, T. A., Du, B., Fu, C., Bray, P. J., Sanborn, T. A., Deutsch, E., Tarazona, N., Shaknovitch, A., Newman, G., Patterson, C., Bush, H. L., Jr. (1999) The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol.* **31**: 1627-1642
- Mehta, J. L., Saldeen, T. G., Rand, K. (1998) Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **31**: 1217-1225
- Mori, S., Saito, Y. (2002) [Pleiotropic effects of statins]. *Nippon Rinsho.* **60**: 875-881
- Muntner, P., He, J., Astor, B. C., Folsom, A. R., Coresh, J. (2005) Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 529-538
- Mysliwiec, M., Borawski, J., Naumnik, B., Ryzewska-Rosolowska, A. (2004) Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia--possibilities of intervention. *Rocz Akad Med Bialymst.* **49**: 151-156
- Nachtigal, P., Pospisilova, N., Pospechova, K., Jamborova, G., Kopecky, M., Jaynes, R., Briestensky, J., Santar, I., Smahelova, A., Solichova, D., Zdansky, P., Semecky, V. (2005) MDOCTrade mark and atorvastatin have potential

- antiinflammatory effects in vascular endothelium of apoE(-/-) mouse model of atherosclerosis. *Life Sci*.
- Nachtigal, P., Semecky, V., Kopecky, M., Gojova, A., Solichova, D., Zdansky, P., Zadak, Z. (2004) Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract*. **200**: 219-229
- Najemnik, C., Sinzinger, H., Kritz, H. (1999) Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca*. **26**: 148-153
- Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L., Ross, R. (1998) Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **18**: 842-851
- Nilsson, J. (2005) Regulating protective immunity in atherosclerosis. *Circ Res*. **96**: 395-397
- Nitenberg, A. (2005) [Endothelial dysfunction in patients with diabetes: identification, pathogenesis and treatment]. *Presse Med*. **34**: 1654-1661
- Obreo, J., Diez-Marques, L., Lamas, S., Duwell, A., Eleno, N., Bernabeu, C., Pandiella, A., Lopez-Novoa, J. M., Rodriguez-Barbero, A. (2004) Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem*. **14**: 301-310
- Pedraza, A. (1993) [Hyperlipoproteinemia in the production of atherosclerosis. Risk factors: diagnosis and treatment]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. **51**: 21-33
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. **340**: 115-126
- Seljeflot, I., Tonstad, S., Hjermann, I., Arnesen, H. (2002) Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. **162**: 179-185
- Schleef, R. R., Bevilacqua, M. P., Sawdey, M., Gimbrone, M. A., Jr., Loskutoff, D. J. (1988) Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem*. **263**: 5797-5803
- Springer, T. A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. **57**: 827-872
- Stehbens, W. E. (2002) The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses*. **58**: 359-360
- Sukhova, G. K., Williams, J. K., Libby, P. (2002) Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **22**: 1452-1458
- Taatjes, D. J., Wadsworth, M. P., Schneider, D. J., Sobel, B. E. (2000) Improved quantitative characterization of atherosclerotic plaque composition with immunohistochemistry, confocal fluorescence microscopy, and computer-assisted image analysis. *Histochem Cell Biol*. **113**: 161-173
- Takeya, M. (2005) [Monocytes and macrophages--multifaced cell population involved in inflammation, atherosclerosis, and obesity]. *Nippon Rinsho*. **63 Suppl 4**: 117-122
- Taylor, A. L. (2004) Endothelial dysfunction and nitric oxide enhancing therapy: a new approach to the treatment of heart failure. *Congest Heart Fail*. **10**: 237-242

- van Nieuw Amerongen, G. P., Vermeer, M. A., Negre-Aminou, P., Lankelma, J., Emeis, J. J., van Hinsbergh, V. W. (2000) Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation*. **102**: 2803-2809
- Vanhoutte, P. M. (1997) [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. **90 Spec No 6**: 9-19
- Vaughan, C. J., Gotto, A. M., Jr., Basson, C. T. (2000) The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. **35**: 1-10
- Vaughan, C. J., Murphy, M. B., Buckley, B. M. (1996) Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*. **348**: 1079-1082
- Walpola, P. L., Gotlieb, A. I., Cybulsky, M. I., Langille, B. L. (1995) Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **15**: 2-10
- Wierzbicki, A. S., Poston, R., Ferro, A. (2003) The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther*. **99**: 95-112
- Yla-Herttuala, S. (1991) Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Med*. **23**: 561-567