

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

2007

Mgr. JITKA KOUTNÍKOVÁ

**Vliv podávání léčiva ze skupiny statinů na aterogenní proces u
experimentálního modelu aterosklerózy.**
(rigorózní práce)

Konzultant:

PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Vedoucí katedry:

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové, 2007

Mgr. Jitka Koutníková

Děkuji panu doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení a pomoc při sestavování diplomové práce. Dík patří také Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za pomoc při provádění experimentu a jeho vyhodnocení. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Pavlíně Jabůrkové za ochotu a cenné rady při zpracovávání praktické části diplomové práce. Pro tuto práci byly čerpány prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf. Poděkování patří taktéž kolektivu Katedry biologických a lékařských věd a Katedry farmakologie a toxikologie FaF UK za odbornou i jinou spolupráci na experimentu.

1. ÚVOD

Ateroskleróza je onemocnění tepen, při němž se v jejich stěnách ukládají tukové látky (ve formě tzv. ateromu) a druhotně vápník. Tepna je takto poškozována, ztrácí pružnost a dochází k jejímu postupnému zužování s následnou ischemií příslušné části organismu. Nejzápadnější jsou tyto změny na věnčitých tepnách srdce, tepnách dolních končetin a mozkových tepnách. Na vzniku a rozvoji aterosklerotických změn se podílí velké množství různých činitelů (1).

Ateroskleróza se často vyskytuje v civilizovaných zemích u obyvatel s bohatou výživou a malým nárokem na fyzickou práci. Proto se ateroskleróza řadí mezi onemoci, které se označují jako civilizační. V České republice je úmrtnost na toto onemocnění jedna z nejvyšších v Evropě (ve světě je zodpovědná za 30% celkové mortality).

Bude to stát ještě mnoho úsilí, než se podaří ovlivnit životní styl mladé a střední generace, u níž se aterosklerotické změny velice často vyskytují, ale nezpůsobují ještě zřetelné potíže. Prevence aterosklerózy by měla začínat od dětství

Ateroskleróza je dlouho němá, bez příznaků. Příznaky se objeví, až když dojde ke kritickému zúžení cévy nebo jejímu úplnému uzávěru. Projevy aterosklerózy jsou potom velmi rozmanité a závisí na části těla, ve které se postižená céva nalézá (a kterou zásobuje kyslíkem a živinami).

Jestliže dojde k náhlému uzávěru některé hlavní tepny, mohou být příznaky velmi dramatické (akutní infarkt myokardu, centrální mozková příhoda, uzávěr tepen dolních končetin) (2).

Tato diplomová práce je zaměřena na rozvoj aterogenních změn ve stěně karotidy králíka během podávané aterogenní diety. Hlavním záměrem práce je sledování exprese buněčných adhezních molekul a její změny po podávání hypolipidemika simvastatinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Základní stavba stěn tepny

Stěny tepen se skládají ze tří vrstev: vnitřní – tunica intima, střední – tunica media a zevní – tunica externa (adventitia).

Vnitřní vrstva stěny, tunica intima, se skládá z pojivového základu přecházejícího v subendothelovou vrstvu a z endothelových buněk, které vystylají vnitřní povrch tepny.

Střední neboli svalová vrstva, tunica media, je tvořena cirkulárně probíhající hladkou svalovinou, dále kolagenními a elastickými vlákny.

Zevní vrstva, tunica externa (adventitia), se skládá z kolagenních vláken a z četných podélných sítí vláken elastických.

2.2 Funkce endotelu za fyziologických podmínek

Hlavní funkce endotelu spočívají zejména v udržení cévního tonu, regulaci krevní srážlivosti, fibrinolytického systému a zánětlivých procesů. Porušení složitého komplexu interakcí mezi buňkami cévní stěny a buňkami v lumenu cév znamená zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních nemocí (3)..

Hlavní funkcí endotelu je udržení cévního tonu. Cévní tonus vzniká na základě vyvážené produkce vasodilatátorů a vasokonstriktorů. Mezi hlavní vasodilatátory

patří oxid dusnatý (NO). NO je syntetizován endoteliální NO syntázou, která katalyzuje přeměnu L-argininu na NO v endoteliálních buňkách. NO zprostředkovává dilataci cév a inhibuje adhezi leukocytů, agregaci destiček a proliferaci hladkosvalových buněk. Tak chrání cévní stěnu proti rozvoji aterosklerózy a trombózy. Hlavním vasokonstriktorem je angiotenzin II.

Endotel ovlivňuje krevní srážlivost produkcí např. tkáňového faktoru nebo von Willebrandova faktoru. Fibrinolytický systém je regulován syntézou a sekrecí tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA) a jeho hlavního fyziologického inhibitoru PAI-1 (inhibitor aktivátoru plazminogenu), jejichž sekrece je za fyziologického stavu vyvážená, zatímco produkce PAI-1 je hojná v aterosklerotické cévní stěně. Endotel se také podílí na zánětlivé reakci, a to produkcí cytokinů a adhezních molekul.

2.3 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce se zdá být klíčovou při vzniku kardiovaskulárních nemocí. Rizikové faktory jako kouření, věk, hypercholesterolémie, hyperglykémie nebo hypertenze iniciují chronický zánětlivý proces, který je doprovázený snížením či zánikem tvorby vasodilatačních a antitrombotických faktorů a vzrůstem tvorby vasokonstriktorů a protrombotických faktorů (4).

Ztráta vasodilatace závislé na endotelu není jedinou dysbalancí. Pokud jsou endoteliální buňky vystaveny prozánětlivým stimulům, začnou exprimovat leukocytární chemotaktické faktory, adhezní molekuly a zánětlivé cytokiny. Ukazuje se, že endoteliální dysfunkce se díky tvorbě zánětlivých faktorů účastní adheze

monocytů a T lymfocytů a podílí se na jejich přeměně na pěnové buňky. Dále participuje na migraci a proliferaci hladkých svalových buněk a na tvorbě extracelulární matrix, což vede k formování aterosklerotického plátu (5).

Endoteliální dysfunkce je tedy velkou změnou v endoteliálním fenotypu, která přispívá k rozvoji a klinickým projevům aterosklerózy. Významně se podílí také na pozdních stádiích nemoci a hraje roli i při akutních koronárních syndromech (6).

2.4 Ateroskleróza

Aterosklerózu lze definovat jako chronické onemocnění cévní intimy, provázené akumulací cholesterolu, fibrózní tkáně, některých dalších komponent krve a změnami v medii cévní stěny. Etiopatogeneze aterosklerózy je multifaktoriální proces. Vzniká jako specifická reakce na nespecifické poškození cévní stěny. Neznáme sice jednoznačnou příčinu jejího vzniku, známe ale řadu faktorů, které se na jejím vzniku podílejí a nazýváme je rizikovými faktory.

2.4.1 Rizikové faktory aterosklerózy

Kardiovaskulární onemocnění jsou ve vyspělých zemích nejčastější příčinou úmrtí. Jedním z nejvýznamnějších úspěchů lékařství bylo odhalení rizikových faktorů, které vzešlo z velkých kohortových studií (7).

Kouření

Je jedním z nejrozšířenějších rizikových faktorů. K rozvoji aterosklerózy přispívá aktivní i pasivní kouření. Podílí se na rozvoji dyslipidémie, což je porucha normálního složení krevních tuků, a přechodném vzestupu krevního tlaku (7).

Hypertenze

Hypertenze se na vzniku aterosklerózy podílí hlavně zvýšením produkce volných radikálů a také zvýšenou hladinou angiotenzinu II a endotelinu – 1. Hypertenze je u žen významnější rizikový faktor než u mužů.

Porucha metabolismu lipidů

Nejzávažnější je zvýšená hladina plazmatické koncentrace LDL cholesterolu, která výrazně urychluje vznik aterosklerózy [10]. Snížení jeho koncentrace o 1 % vede k poklesu rizika koronárních příhod o asi 2 %. Není zatím jasné, jaké jsou optimální koncentrace LDL cholesterolu v krvi. Současná doporučená koncentrace <3 mmol/l je doporučena pro primární i sekundární prevenci ICHS.

Naopak zvýšená koncentrace HDL cholesterolu eliminuje riziko zvýšeného LDL cholesterolu. Zvýšení HDL cholesterolu o 1 % snižuje riziko koronárních příhod o 2–3 %. Žádoucí koncentrace HDL cholesterolu je > 1,0 mmol/l. Zvýšení HDL cholesterolu nad 1,6 mmol/l je tzv. negativním rizikovým faktorem, „eliminuje“ vliv jiného rizikového faktoru (8).

Zvýšená koncentrace triglyceridů je samostatným nezávislým rizikovým faktorem ICHS u žen i u mužů, vyšší riziko přináší ženám. Doporučená koncentrace triglyceridů je < 2,0 mmol/l.

Diabetes mellitus

Působí rozvoj aterosklerózy hlavně narušením metabolismu lipidů. Nejvhodnějším léčebným postupem je dosažení co nejfyziologičtějších hodnot glykémie u pacientů (9).

Genetická predispozice a pohlaví

Genetická predispozice ovlivňuje hlavně rizikové faktory jako je hypertenze, diabetes mellitus, trombogenní faktory a další (10). Mezi nejvíce rizikově genetické predispozice patří familiární hypercholesterolemie (zvýšená hladina VLDL a LDL cholesterolu). U mužů přicházejí aterosklerotické změny o 10 let dříve než u žen. Ženské pohlavní hormony působí protektivně, po snížení jejich hladiny v menopauze dochází ke zrychlení vývoje aterosklerózy.

Tělesná inaktivita a věk

Pravidelný tělesný pohyb je nedílnou součástí prevence aterosklerózy. Výskyt aterosklerózy narůstá se zvyšujícím se věkem. Za rizikové skupiny z hlediska

kardiovaskulárních onemocnění je považován věk nad 45 let u mužů a nad 55 let u žen (11).

Nevhodná strava a obezita

Především nevhodná je energeticky nadbytečná strava s přemírou tuků, zvláště nasycených, cholesterolu i cukrů. Naproti tomu protektivně působí hlavně vegetariánská strava (zelenina, vláknina, rybí olej) (12).

Alkohol

Negativně působí pravidelný příjem vyšších dávek alkoholu. Malé dávky naopak působí protektivně (zvláště pokud současně obsahuje vyšší koncentraci flavonoidů, jak je tomu u červeného vína) (12).

.

Železo

Zvýšené zásoby železa, vyjádřené jako plazmatická koncentrace feritinu, jsou rizikovým faktorem aterosklerózy. Předpokládá se jeho peroxidační působení na LDL cholesterol.

Zvýšená koncentrace plazmatického histaminu

Je prokázáno, že výrazně zvýšená koncentrace histaminu (zvyšuje se např. při deficitu vitamínu C a vlivem stresu) poškozují funkci arteriálního endotelu.

Infekční agens

Uvažuje se o některých bakteriálních (Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori) a virových patogenech (virus Herpes simplex, Cytomegalovirus). Jedním z příčin je schopnost bakteriálních kmenů produkovat faktory shlukující trombocyty, dále stimulovat produkci zánětlivých mediátorů, které se významně podílí na rozvoji aterosklerózy (13).

V poslední době se objevila řada dat ukazujících na význam subklinické dysfunkce štítné žlázy. Subklinická hypotyreóza se manifestuje necharakteristickými příznaky (např. únavností, nevykonností, depresivním laděním atd.). Tento stav je spojen se zvýšenými hladinami sérového cholesterolu. Bylo prokázáno, že nemocní se subklinickou hypotyreózou mají prokazatelně rozsáhlejší aterosklerózu aorty a častější výskyt akutního infarktu myokardu(14).

2.4.2 Patofyziologie aterosklerózy

Proces vzniku aterosklerózy probíhá v několika charakteristických fázích, které v případě dlouhodobého trvání aterogenních faktorů vedou ke vzniku klinických komplikací, nejčastěji ischemie srdce, mozku a dolních končetin.

Lipidní proužky – lipidní proužky jsou shluky pěnových buněk. Tento typ lézí je první fází aterosklerózy a nachází se již u dětí a mladých lidí (15).

Aterogenní proces se odvíjí od endoteliální dysfunkce, popsané výše. Spolupůsobením aterogenních faktorů dochází ke zvýšené kumulaci LDL v intimě cév. Zde se oxidačními procesy mění a vážou se na subendoteliální proteoglykany a kolagen (16). Oxidované LDL přímo aktivují endotel, působí chemotakticky na monocyty a zvyšují endoteliální expresi P-selektinu, VCAM-1 a ICAM-1. Výsledkem je aktivace cirkulujících monocytů a T lymfocytů a jejich prostupu do intimy cév (17).

První fáze prostupu leukocytů do subendoteliálních prostor se nazývá „kutálení po endotelu“ a spočívá v interakci mezi lektinovými receptory leukocytů a selektiny. Vytvoření pevné vazby je zprostředkováno interakcí mezi adhezními molekulami VCAM-1 a ICAM-1 a integriny. Transmigraci leukocytů umožňuje molekula PECAM-1, která se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk a interaguje s PECAM-1 molekulou na leukocytech (18).

V této fázi dominují v intimě monocyty. Jsou pod vlivem působení růstových faktorů jako EDGF (endothelium-derived growth factor) nebo faktorů stimulujících tvorbu kolonií jako např. M-CSF, díky kterým dochází k transformaci monocytů na makrofágy. Makrofágy vycytávají prostřednictvím svých receptorů oxidované lipoproteiny, které nemohou být katabolizovány cestou LDL receptorů. Estery cholesterolu se tedy kumulují intracelulárně. Vznikají tzv. pěnové buňky a jejich nahromaděním lipidní proužky (1).

Fibromuskulární plát – pro jeho vytvoření je charakteristická zejména migrace hladkosvalových buněk z medie do intimy a proliferace extracelulární matrix.

Makrofágy, podílející se na tvorbě lipidních proužků, produkují řadu látek, které ovlivňují další formování aterosklerotické léze. Ve velké míře produkují chemokin MCP-1, který zesiluje chemotaxi a podílí se na další akumulaci makrofágů v lézi. Dále produkují společně s endotelem destičkový růstový faktor (PDGF), monocytový růstový faktor (MDGF) a zánětlivé IL-1 β a IL-8, které přispívají ke změně kontraktilního fenotypu hladkosvalových buněk na fenotyp syntetický a také podporují proliferaci a migraci hladkosvalových elementů. TNF- α produkovaný aktivovanými makrofágy společně s IL-1 β zvyšuje expresi adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1 (19).

V této fázi vstupují do procesu aterogeneze hladkosvalové buňky. Normálně se nacházejí v kontraktilním stavu, podílejí se na udržení cévního tonu, na syntéze extracelulární matrix v medii a na reparaci cévní stěny při různých poraněních (20). Po změně na syntetický fenotyp (pomocí růstových faktorů a chemokinů makrofágů a T lymfocytů) dochází k rozrušení bazální membrány a změně exprese některých adhezních molekul. Hladkosvalové buňky se uvolní z vazby na extracelulární matrix v medii a transmigrují do intimy, kde se vážou prostřednictvím VCAM-1 a ICAM-1 molekul na endotelové buňky, makrofágy a leukocyty. V intimě začnou hladkosvalové buňky produkovat složky extracelulární matrix, zejména kolagen (21).

Kolagen je v aterosklerotických lézích tvořen nejen hladkosvalovými buňkami, ale i endoteliálními buňkami a fibroblasty. Syntéza kolagenu souvisí jak se změnou fenotypu, migrací a proliferací hladkosvalových buněk, tak s řadou lokálních i

systémových činitelů (TGF- β , PDGF, angiotensin II, IL-1, homocystein a mechanické napětí stimulují tvorbu kolagenu) (22).

Za předpokladu, že aterogenní faktor přestane v tomto stadiu působit, endotelové buňky ještě mohou regenerovat a postupně obnovit svou funkci. Výsledkem je pouhé ztluštění intimy, která obsahuje pouze jednu nebo dvě vrstvy myocytů, které se zde normálně nevyskytují. Pokud aterogenní faktory stále působí, onemocnění se dále rozvíjí.

Ateromový plát – je to již pokročilá aterosklerotická léze, kde došlo k vytvoření nekrotického lipidového jádra, zformování fibromuskulární čepičky a ukládání vápenatých iontů.

Makrofágy dále pohlcují lipoproteinové částice a částečně dochází k jejich kumulaci ve střední části plátu. Zvýšeně akumulují volný cholesterol, zatímco v počátečních stádiích pohlcovaly estery cholesterolu. Cytotoxické účinky volného cholesterolu zřejmě vedou k odumírání makrofágů. Po zániku makrofágů se lipidy akumulují extracelulárně, uvolní se hydrolytické enzymy a zánětlivé substance a vytvoří se nekrotické lipidové jádro (16).

Také migrace hladkosvalových buněk z intimy do medie pokračuje, a to směrem k povrchu aterosklerotického plátu přes lipidové jádro. Stále syntetizují extracelulární matrix, zejména kolagen, elastin a proteoglykany. Všechny tyto děje

vedou k vytvoření tzv. fibromuskulární čepičky na povrchu aterosklerotického plátu. V nekrotických oblastech plátu navíc dochází k ukládání vápníku a mineralizaci.

Pokročilé aterosklerotické léze jsou vždy potenciálně velmi nebezpečné, protože často způsobují stenózu cévy. Pokud se propustnost cévy zmenší pod 15%, dochází často k projevům ischemie, nejčastěji anginy pectoris. Klinické komplikace aterosklerózy jako je infarkt myokardu, ale nezávisí na stupni cévní obstrukce, vznikají především jako následek trombózy (23).

Vznik trombu – Toto stadium je vlastně již klinickou komplikací aterosklerózy. Ke vzniku trombu může dojít buď při erozi endotelu, nebo při ruptuře plátu. Na vzniku trombózy se podílí celá řada faktorů, které často patří mezi obecné rizikové faktory aterosklerózy. Jsou to hyperlipidémie, hyperhomocysteinémie, diabetes, zvýšená koagulační aktivita, snížená fibrinolytická aktivita atd. (24).

Malá eroze endotelu znamená expozici kolagenu a tkáňového faktoru destičkám, čímž vznikají mikrotromby. Vznik těchto mikrotrombů nemá žádný klinický význam. Pokud je eroze a destrukce endotelu větší, dochází ke vzniku tzv. červeného trombu, který obsahuje velké množství destiček, červených krvinek a fibrinu. Tento trombus postupně uzavírá lumen cévy a může dojít až k úplné okluzi. Kromě toho se v místě vzniku trombu rozvíjí zánětlivá reakce s akumulací makrofágů a T lymfocytů (25).

Ruptura fibromuskulární čepičky plátu má za následek styk krve s nejvíce trombogenní oblastí plátu, kterou je kašovitá hmota s velkou koncentrací tkáňového faktoru, který je produkován makrofágy, hladkosvalovými i endotelovými buňkami. Trombus se vytváří v intimě, kde dochází k jeho inkorporaci do plátu. Pokud je ruptura plátu hluboká, průtok krve pomalý, nízká fibrinolytická aktivita a velká aktivita tkáňového faktoru, dochází k postupné expanzi trombu a může dojít až k úplné okluzi cévního lumen. Pokud je ruptura plátu malá, průtok krve rychlý a vysoká fibrinolytická aktivita, trombus se může uvolnit a dochází k embolizaci nebo může být postupně degradován a žádné klinické komplikace se neobjeví.

Ruptura aterosklerotického plátu je způsobena hlavně mechanickými silami, které působí na plát, a které převáží nad mechanickými vlastnostmi plátu. Stabilitu plátu významně oslabují makrofágy a T lymfocyty produkcí zánětlivých cytokinů a proteolytických enzymů (metaloproteináz), které snižují syntézu a zvyšují degradaci extracelulární matrix. Stabilita je oslabena také kumulací lipidů, degradací kolagenu, apoptózou a sníženou migrační a proliferační aktivitou hladkosvalových buněk (26).

2.5 Buněčné adhezní molekuly

Adhezní molekuly jsou látky, které se exprimují na povrchu všech tkání organismu. Přenáší signály mezi buňkami a podílí se tak na interakci buněk s okolním prostředím. Účastní se jak fyziologických dějů, jako je např. buněčný růst a diferenciací, tak patologických dějů, jako jsou interakce mezi složkami imunitního systému. Všechny mají povahu proteinů a dle další struktury se dělí na čtyři základní skupiny – selektiny, integriny, imunoglobuliny a kadheriny (27).

2.5.1 Selektiny

Selektiny jsou proteiny, které obsahují na svém N-konci lektinovou nebo lecitinovou doménu, jež se účastní interakce s příslušnými ligandy a určuje specifitu vazby. Dělí se na E-, P- a L-selektin (28).

E-selektin je exprimován endotelem a zprostředkovává adhezi leukocytů na cévní endotel. Stimulem k jeho expresi je aktivace endotelu zánětlivými faktory, např. TNF- α a interleukinem-1 (29).

L-selektin se nachází na leukocytech (B, T lymfocyty, neutrofilů, eosinofilů) a také na nezralých erythrocytech. Jeho význam spočívá v zajištění vazby leukocytů na endotel v místě zánětu, ale je zde přítomen konstitučně, tzn., že k jeho expresi není nutná aktivace (30).

P-selektin má největší molekulu ze skupiny selektinů. Je to protein, který má na svém N-konci lektínovou doménu, která se účastní interakce s příslušnými ligandy (hlavně sacharidovými), obsahuje EGF doménu (epidermal growth factor), CRP doménu, transmembránový úsek a cytoplazmatický C-konec. Primární ligand P-selektinu je P-selektin glykoprotein ligand-1 (PSGL-1), molekula bohatá na O-a N-glykany. PSGL-1 byl objeven na různých hemopoetických buňkách, např. neutrofilech, eosinofilech, lymfocytech, monocytech. P-selektin je součástí alfa granulí krevních destiček a Weibel-Paladeho tělísek endoteliálních buněk. Zprostředkovává interakce mezi krevními buňkami, leukocyty a endotelem. P-selektin je zodpovědný za adhezi leukocytů a krevních destiček na endotel. Účastní se první fáze interakce lymfocytů s endotelem, kdy dochází k tzv. kutálení nebo-li rollingu. Vazba selektinů na karbohydrátové ligandy není pevná, nejprve dochází ke kutálení leukocytů po endotelu a ne k jejich pevnému přichycení. Leukocyty včetně neutrofilů, T lymfocytů a monocytů využívají selektiny k prvnímu kontaktu a zachycení k endotelu. Hraje důležitou roli v procesu aterosklerózy, při níž dochází ke zvýšené expresi P-selektinu na aktivních aterogenních plátech. Při vyplavení zánětlivých mediátorů, histaminu a trombinu, dochází k degranulaci destiček a Weibel-Paladeho tělísek a následně k expresi P-selektinu na povrch endotelových buněk. P-selektin je exprimován pouze na aktivovaných endotelových buňkách, proto ho lze identifikovat při diabetu, hypertenzi, akutních srdečních příhodách, hypercholesterolémii. Každá aktivovaná buňka má na svém povrchu kolem 10 000 P-selektinových molekul. P-selektinová exprese na krevních destičkách poskytuje informace o rozsahu agregace destiček v místě poškození. Pokud inhibujeme P-selektin protilátkami, může se docílit 95%-100% deagregace. P-selektinová exprese může být ovlivněna

různými činidly, např. adenosin a epinefrin zvyšují jeho expresi, ACE inhibitory a antidiabetika snižují jeho expresi [34].

E-a hlavně P-selektin jsou markery časné aktivace endotelu a podílí se na iniciační akumulaci makrofágů a T lymfocytů. Hlavně P-selektin je exprimován endotelem před akumulací makrofágů a T lymfocytů v intimě cév [32]. Mají důležitou funkci pro zjištění vaskulárních a trombotických onemocnění [34].

2.5.2 Integriny

Integriny jsou transmembránové glykoproteiny exprimované téměř ve všech tkáních organismu. Na buňkách se vyskytují konstitučně, ale ve dvou konformačních stavech, jež se liší afinitou ke svým ligandům. V klidu jsou v nízkoafinní konformaci, po aktivaci různými stimuly (např. Mg^{2+}) přechází do vysokoafinního stavu, který umožňuje vznik pevné vazby.

Co se týče jejich vztahu k ateroskleróze, tak jsou významné 3 skupiny integrinů - β_1 , β_2 a β_3 . Do skupiny β_1 patří integriny exprimované monocyty, T lymfocyty a trombocyty a vážou složky mezibuněčné hmoty, jako je kolagen a adhezní molekuly exprimované na endotelu. β_2 jsou leukocytární integriny, které se účastní interakce mezi leukocyty a endotelem. Poslední skupinu tvoří β_3 integriny, které se účastní interakcí trombocytů se složkami mezibuněčné hmoty. Hrají důležitou roli při zachycování destiček v místě vaskulárního poškození (27).

Význam integrinů spočívá hlavně ve vytvoření pevné vazby mezi leukocyty a endotelem v místě zánětlivé reakce.

2.5.3 Imunoglobuliny

Tato skupina představuje až 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jsou to látky glykoproteinové povahy. Patří sem celá řada molekul, např. antigenně specifické receptory T a B lymfocytů. Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci VCAM-1, ICAM-1 a PECAM-1 (31).

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) a ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami. Jejich expresi zvyšuje řada faktorů, jež se uplatňují v procesu aterosklerózy – hypercholesterolemie, oxidované LDL a diabetes, ale i kouření, hyperhomocysteinemie a hemodynamický stres (32).

PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) – je to glykoprotein, exprimovaný hlavně na endoteliálních buňkách v místě intercelulárních spojů, na trombocytech a většině leukocytů. Podílí se na transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostor (33).

2.5.4 Kadheriny

Jedná se o transmembránové glykoproteiny, které zodpovídají za homofilní mezibuněčnou adhezi. Tato adheze je závislá na přítomnosti extracelulárního vápníku. Jsou to hlavní strukturální glykoproteiny, jež tvoří adherentní mezibuněčné spoje, zvané zonula adhaerens (31).

Podílejí se na diferenciaci, proliferaci a migraci buněk nebo reparaci poškozené tkáně. Je to dáno jednak jejich adhezními vlastnostmi, jednak schopností podílet se na přenosu signálů mezi buňkami.

Při aterogenezi se uplatňují zejména epiteliální (E)-kadherin a vaskulární-endoteliální (VE) kadherin. Exprese E-kadherinu byla zjištěna v aterosklerotických lézích u buněk, jež se přeměnily na pěnové buňky. Zdá se, že by se mohly podílet na agregaci těchto pěnových buněk a podílet se na formování lipidového jádra (34). VE-kadherin je exprimován cévním endotelem téměř u všech typů cév. Je hlavní molekulou adherentních spojů mezi endoteliálními buňkami a právě porušení jeho funkce znamená zvýšení cévní permeability a přispívá ke vzniku endoteliální dysfunkce (35).

ENDOGLIN (CD 105)

CD105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu transformačního růstového faktoru-beta (TGF- β). Bylo prokázáno, že endoglin také moduluje signalizaci TGF- β prostřednictvím interakce s TGF- β receptorem I nebo II. (36).

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. Jeho zvýšená exprese je dávana do souvislosti s horší prognózou nádorového onemocnění. Mutace genu pro endoglin navíc vede k rozvoji hereditární hemorrhagické telangiektázie. (37).

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.

2.6 STATINY

Statiny patří mezi nejčastěji užívané léky ke snížení koncentrace cholesterolu. Jejich více než 10leté používání umožňuje hodnotit jejich efekt na morbiditu a mortalitu. Četné studie prokázaly příznivé vlastnosti statinů jak v primární, tak v sekundární prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Metaanalýza těchto studií zjistila zlepšení klinického stavu pacientů již v době, kdy koncentrace cholesterolu v plazmě nebyly změněny, nebo u pacientů s normální průměrnou koncentrací cholesterolu. Podobně jako u onemocnění kardiovaskulárního systému, přibývá studií popisujících příznivý vliv podávání statinů na snížení proteinurie a zpomalení poklesu glomerulární filtrace u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (38).

Statiny představují jednu z nejpoužívanějších skupin léků. Přestaly být doménou odborných lékařů a mohou je předepisovat i praktičtí lékaři. Tím se významně zvýšila jejich dostupnost a počet nemocných, kteří tyto léky užívají. Zasahují do metabolických pochodů, roste tak počet interakcí (39).

Léčba zaměřená na úpravu lipidového spektra patří, spolu s antihypertenzivy, mezi nejefektivnější, ale i nejnákladnější léčebné postupy zlepšující prognózu nemocných (40).

V současné době je dostupných šest molekul statinů (atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin a simvastatin). Rozdíl v jejich potenciálu snížit LDL-cholesterol je dán různou schopností blokovat aktivitu reduktázy a v délce této blokády. Vedle poklesu LDL-cholesterolu snižují statiny též triglyceridemii. Efekt na pokles hladiny triglyceridů (TG) je výrazně závislý na genotypu. Účinek statinů na HDL-cholesterol není výrazný (41).

Klinický efekt léčby statiny byl prověřen jak v primárně, tak v sekundárně preventivních studiích. Dokumentován byl pokles mortality i morbidity. Metaanalýza řady studií ukázala, že pokles LDL-cholesterolu dosahuje při léčbě statiny průměrně 25–36 % je následován 24–37% poklesem kardiovaskulární úmrtnosti. Tedy každé procento poklesu LDL-cholesterolu je sledováno opět jednoprocenním poklesem úmrtí z cévních příčin. Na efektu statinů se podílí pravděpodobně i tzv. extralipidový efekt: snížení aktivity zánětlivých a protrombotických pochodů. Tento účinek stojí pravděpodobně v pozadí za vysoce příznivým působením této lékové skupiny u akutních koronárních příhod (42).

2.6.1 Přehled statinů

Atorvastatin

Je po perorálním užití rychle absorbován, maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 1–2 hodinách. Je metabolizován cytochromem P-450 (CYP-450) – izoenzym 3A4, z velké části na biologicky aktivní metabolity. Je vylučován žlučí po hepatální a extrahepatální metabolizaci. Při jaterní nedostatečnosti je plazmatická koncentrace atorvastatinu výrazně zvýšena (43).

Fluvastatin

Po požití téměř úplně absorbován (98 %), poté podléhá zřetelnému „first-pass“ efektu (první průchod játry). Absolutní systémová biologická dostupnost je proto relativně nízká (24 %). Při dávkách vyšších než 20 mg není farmakokinetika lineární. Je metabolizován CYP-450 – izoenzym 2C9 (43).

Lovastatin

Je to lakton, který se in vivo rychle hydrolyzuje přes CYP-450 – izoenzym 3A4 na příslušnou hydroxykyselinu. Přibližně 10 % lovastatinu se vyloučí močí a 83 % stolicí. Při podání lovastatinu nalačno dosahuje plazmatická koncentrace aktivních inhibitorů 2/3 hodnoty ve srovnání s podáním léku ihned po jídle, proto podáváme lovastatin nejlépe po jídle (44)

Pravastatin

Na rozdíl od ostatních statinů je hydrofilní a není metabolizován systémem CYP-450. Neinterferuje proto s léky, které jsou tímto cytochromem metabolizovány. Významně snižuje adhezi krevních destiček a leukocytů. Je považován za „antitrombofilní statin". Po několikaměsíční léčbě dochází k výrazné redukci destičkových trombů, snižuje se koncentrace PAI-1 a fibrinogenu, zvyšuje se syntéza NO endoteliemi. Snižuje v plátech počet zánětlivých buněk i makrofágů a je pravděpodobné, že také moduluje imunitní systém organismu (44)

Rosuvastatin

Je relativně hydrofilní a metabolizován je systémem CYP-450 – izoenzym 2C9 a méně 2C19. Prakticky nemá aktivní metabolity, asi z 10 % je vylučován močí, z 90 % játry. Má vysokou selektivitu k jaterní tkáni, je minimálně vychytáván periferními buňkami. Jde o zatím nejúčinnější statin (co se týče snížení LDL-cholesterolu), který se jeví jako účinnější než atorvastatin (45).

Simvastatin

Je vychytáván v játrech, podléhá významnému „first-pass" efektu. Je metabolizován přes CYP-450 – izoenzym 3A4, vylučován je především do žluče, a plazmatická koncentrace aktivní látky je proto nízká. Maximální koncentrace v plazmě je dosažena mezi 1–3 hodinami. Vazba na plazmatické proteiny je 95% (46)

Kromě lovastatinu, který se lépe vstřebává při jídle, je vhodnější užívat ostatní statiny nalačno. Vzhledem k tomu, že syntéza endogenního cholesterolu je nejvyšší v noci, bývá doporučováno brát statiny na noc. Statiny jsou vylučovány převážně žlučí (70–95 %), lze je proto podávat i u nemocných s renální insuficiencí. Výjimkou je pravastatin, který je asi z 20 % vylučován ledvinami.

Za „základní dávku“ u pacientů, kteří nejsou transplantováni, lze považovat 5 mg rosuvastatinu, 10 mg atorvastatinu, 10 mg simvastatinu, 20 mg lovastatinu a pravastatinu, 40 mg fluvastatinu. Násobení dávky statinů nevede k násobení účinku na LDL-cholesterol, naproti tomu riziko vedlejších účinků se zvyšuje a cena léčby se násobí. V současnosti je nedosažení cílové koncentrace LDL-cholesterolu pod 3,0 (2,5) mmol/l indikací k přidání ezetimibu, nového hypolipidemika, které zabraňuje vstřebávání cholesterolu ve střevě (47).

Tabulka č. 1: Přehled základních vlastností statinů

charakteristika	atorvastatin	fluvastatin	lovastatin	pravastatin	rosuvastatin	simvastatin
maximální dávka (mg/den)	80	80	40	40	40	80
doporučená dávka (mg/den)	10 - 20	20 - 80	20 - 40	20 - 40	5 - 20	10 - 40
biologický poločas $t_{1/2}$ (h)	15,0 – 30,0	0,5 – 2,3	2,9	1,3 – 2,8	20,8	2,0 – 3,0
čas potřebný k dosažení maximální koncentrace v plazmě t_{max} (h)	2,0 – 3,0	0,5 – 1,0	2,0 – 4,0	0,9 – 1,6	3,0	1,3 – 2,4
doba podávání	večer	večer	večer s jídlem	večer	večer	večer
metabolismus v játrech	CYP-450 3A4	CYP-450 2C9	CYP-450 3A4	sulfatace	CYP-450 2C9	CYP-450 3A4

[44]

2.6.2 Mechanismus účinku statinů

Statiny jsou inhibitory HMG-CoA-reduktázy. HMG-CoA-reduktáza je enzym, který katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát, což je jeden z časných kroků v syntéze cholesterolu a dalších důležitých molekul. Inhibicí tohoto enzymu vedou statiny ke snížení syntézy cholesterolu, především v jaterních buňkách (48).

Snížení dostupnosti cholesterolu v hepatocytech vede především ke zvýšení exprese receptorů pro LDL na povrchu hepatocytů a ke zvýšenému vychytávání LDL-částic z krevního oběhu. Zvýšené vychytávání LDL-částic a následný pokles koncentrace LDL-cholesterolu v krvi představuje hlavní mechanismus účinku statinů. Snížení množství cholesterolu v hepatocytech způsobuje také snížení produkce VLDL-částic v játrech. To vede ke snížení plazmatické koncentrace TG, druhotně však též ke snížení přeměny VLDL-částic na LDL-částice a tím opět ke snížení koncentrace LDL-cholesterolu (49).

Základní dávka statinů snižuje LDL-cholesterol asi o 27 %, její zdvojnásobení vždy o dalších asi 7 %. Statiny také mírně snižují TG (v závislosti na jejich dávce) a mírně zvyšují HDL-cholesterol (nezávisle na dávce) (39).

2.6.3 Pleiotropní účinky statinů

Statiny mají i další nelipidové (pleiotropní) účinky: tlumí zánětlivou a imunitní reakci v cévní stěně a ovlivňují proliferaci hladkých svalových buněk a extracelulární matrix. To přispívá ke stabilizaci aterosklerotického plátu, i když pro stabilizaci plátu

je nepochybně zásadní snížení LDL-cholesterolu v krvi, a tím i v aterosklerotickém ložisku. Některé statiny omezují i riziko trombogeneze – tlumí syntézu PAI-1, trombomodulinu a tromboxanu B₂. Zlepšují funkci cévního endotelu tím, že zvyšují syntézu oxidu dusnatého (NO) a snižují expresi endotelinu (50).

Imunomodulační účinek je způsoben inhibicí cytotoxických T lymfocytů – „přirozených zabíječů“. Je zajímavé, že tento účinek statinů nebyl prokázán u nemocných, kteří nebyli transplantováni. Vysvětlením může být nutnost současného podávání ciclosporinu (51)

2.6.4 Nežádoucí účinky statinů

Občasné nežádoucí účinky (>1%):

Trávicí ústrojí: Zácpa, bolesti v břiše, flatulence, nauzea.

Méně časté nežádoucí účinky:

Trávicí ústrojí: Dyspepsie, průjem.

Celkové: Slabost, bolesti hlavy.

Kůže: Exantémy, rash, pruritus.

Játra: Výrazné a setrvávající zvýšení hodnot sérových transamináz.

Vzácné nežádoucí účinky (< 0,1 %):

Trávicí ústrojí: Zvracení.

Hematologické: Anémie.

Kůže: Alopecie.

Játra: Ikterus, hepatitida, pankreatitida.

Svaly: Myopatie, myalgie, svalové křeče, rhabdomyolýza.

Neurologické: Parestézie, periferní neuropatie.

Jiné: Závratě [46].

Vzácně se také objevil zjevný syndrom přecitlivělosti. Byl spojen s některým z těchto příznaků: Angioneurotický edém, LE-syndrom, polymyalgia rheumatica, vaskulitida, trombocytopenie, eosinofilie, zvýšená sedimentace erytrocytů, artritida a artralgie, urtikarie, fotosenzitivita, horečka, flush, dyspnoe a celkový pocit slabosti [46].

Změny laboratorních nálezů: Vyskytly se zvýšené hodnoty alkalické fosfatázy a gamma-glutamyltranspeptidázy. Změny jaterních funkcí bývají mírné a přechodné. Objevily se i zvýšené hladiny sérové kreatininkinázy, způsobené frakcí CK z kosterního svalstva [46].

Klinické projevy rhabdomyolýzy

Do klinického obrazu rhabdomyolýzy může vyústit jakékoliv toxické postižení kosterního svalstva spojené s nekrózou (52). Nejčastějšími příčinami jsou traumata, infekce (např. virus chřipky, *Staphylococcus* spp) a xenobiotika. Klinický obraz může

být značně proměnlivý, subjektivně převažuje svalová slabost, zvýšená citlivost, bolest a kontraktury (nejčastěji bývají postiženy lýtkové a zádové svaly). Většina pacientů ale přichází s nespecifickými příznaky slabosti, únavy, horečky, tachykadie, nevolnosti, typickým příznakem je tmavé zbarvení moči myoglobinem. Třemi závažnými komplikacemi rhabdomyolýzy jsou akutní renální selhání v důsledku myoglobinurie, srdeční arytmie až zástava při hyperkalémii a hypokalciémií a kompartment syndrom (útlak nervů a cév v důsledku edému svalů).

Diagnóza bývá stanovena na základě klinického obrazu a stanovení hodnoty kreatinkinázy (CK), k potvrzení může být použita biopsie. Není výjimkou, že CK dosahuje 100 až 1000 násobného vzestupu. Dalším očekávaným nálezem je myoglobinurie, která bývá asi v 50% případů provázena oligurií. Dalšími přidruženými laboratorními nálezy je zvýšení laktátdehydrogenázy a aminotransferáz, společně s postižením renálních funkcí stoupají koncentrace kaliumu, fosforu, kyseliny močové a močoviny.

Včasné rozpoznání rhabdomyolýzy a odstranění vyvolávající příčiny je kritickým okamžikem v následné péči o pacienta. Léčba spočívá v korekci hypotenze, hypovolémie, dehydratace a prevence hrozícího renálního selhání. Zásadou je zabezpečení dostatečné diurézy a alkalizace moči bikarbonátem k lepšímu vylučování myoglobinu. Odhaduje se, že asi u jedné třetiny pacientů s rhabdomyolýzou dochází k rozvoji renálního selhání a mortalita těchto pacientů se pohybuje v rozmezí 5 až 30% (53).

2.6.5 Lékové interakce statinů

Kromě pravastatinu jsou ostatní statiny metabolizovány přes cytochrom P-450. Mnohé léky tento enzymový systém inhibují a může dojít k nežádoucímu zvýšení plazmatických hladin statinů s rizikem myopatie až rabdomyolýzy. Podle údajů z ohlášených případů myotoxicity v USA byla incidence rabdomyolýzy na 1 milion obyvatel následující: fluvastatin 0, pravastatin 0,04, atorvastatin 0,04, simvastatin 0,12 a lovastatin 0,19. Riziko je zvýšené u pacientů po srdeční transplantaci, protože 8 % případů z uvedeného počtu tvořili pacienti současně užívající ciclosporin (38).

Naopak léky, které indukují CYP-450 3A4 (barbituráty, třezalka tečkovaná atd.), hladiny statinů snižují. Je proto důležité znát léky, které tyto enzymy inhibují (zvýšení hladin) nebo indukují (snížení hladin). Také kombinace statinů s fibráty může zvyšovat riziko myopatie až rabdomyolýzy, zvláště při vyšších dávkách statinů. Další rizikové stavy pro vznik myopatie jsou současný diabetes mellitus, hypothyreóza, ledvinné a jaterní postižení, věk nad 70 let a vysoké dávky statinů (např. > 40 mg/den simvastatinu) (41).

Statiny zvyšují účinek perorálních antikoagulancií, u těchto nemocných je proto při nasazení statinů nutné monitorovat INR a upravit dávku warfarinu.

Tabulka č. 2: Přehled lékových interakcí statinů

cytochrom P-450	účinek	léky s možnou interakcí
inhibice 3A4	zvýšení plazmatické koncentrace statinů	cyklofosfamid ,ciclosporin, diazepam, erythromycin, clarithromycin, felodipin, fluconazol, ketoconazol, codein, lidocain, nifedipin, nitrendipin, sildenafil, terfenadin, verapamil, grapefruitová šťáva
indukce 3A4	snížení plazmatické koncentrace statinů	barbituráty, carbamazepin, griseofulvin, phenytoin, primidon, rifampicin
inhibice 2C9	zvýšení plazmatické koncentrace fluvastatinu a rosuvastatinu	amiodaron, cimetidin, trimethoprim + sulfamethoxazol, fluoxetin, isoniasid, ketoconazol, metronidazol, sulfinpyrazon, ticlopidin
indukce 2C9	snížení plazmatické koncentrace fluvastatinu a rosuvastatinu	barbituráty, carbamazepin, phenytoin, primidon, rifampicin

2.6.6 Kontraindikace statinů

Statiny jsou kontraindikovány při přecitlivělosti, dále při aktivní jaterní chorobě anebo při nevysvětleném dlouhodobém zvýšení aktivity sérových transamináz, při myopatii, v těhotenství a v období laktace. Statiny se nedoporučuje podávat dětem do 18 let [46].

Statiny jsou léky, které mohou mít závažné komplikace. Opatrnosti je třeba dbát zejména při kombinacích s některými léky. Komplikace však nejsou časté a závažné komplikace jsou vzácné. Jejich riziko můžeme omezit správnou indikací, opatrností při kombinaci s jinými léky. Nezbytné jsou také pravidelné kontroly jaterních testů a u pacientů se symptomy svalového postižení také kreatinkinázy. Při dodržení těchto pravidel efekt statinů vysoce převyšuje jejich riziko a jsou nepostradatelným prostředkem v boji s kardiovaskulárními nemocemi.

CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo detekovat a kvantifikovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a endoglinu ve stěně cévy u apoE deficientních myší, 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.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samci kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}), vážící 15-20 gramů, byli laskavě poskytnuti Prof. Polednem (IKEM, Praha, Česká Republika), byli ustájeni v SEMEDu (Praha, Česká Republika).

ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Všechny myši byly v 5 týdnech života ostaveny od matky, náhodně rozděleny do 2 skupin.

ApoE deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení standardní laboratorní stravou 4 týdny (apoE^{-/-} neléčená 9 týdenní skupina). V atorvastatinové skupině byly myši krmeny standardní laboratorní stravou, do níž byl přidáván atorvastatin v dávce 10mg/kg/den další 4 týdny po odstavení (apoE^{-/-} atorvastatinová 9 týdenní skupina).

Každá z myší v atorvastatinové skupině byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

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 při - 80°C.

BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol v 510 nm, triglyceridy, v 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce (7 μm) na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, které byly předem upravené 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 destilované vody, následně se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). V další fázi byly na sklíčka napipetovány roztoky anti avidinu a anti biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do roztoku 3% H_2O_2 (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) – goat anti-hamster IgG a goat anti-rat IgG (Vector Laboratories), které byly značeny biotinem a opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dále byl na sklíčka

nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratoriem). 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) a sklíčka zamontována do eukittu.

Byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) zředění 1/50.

Všechny protilátky byly zakoupeny ve firmě BD Pharmingen (California, USA)

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	

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE A VELIKOST LÉZÍ

Plochy endoteliální exprese endoglinu, VCAM-1 a PECAM-1 byly kvantifikovány pomocí stereologických metod (54). 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 byl pro každé imunohistochemické barvení vybrán náhodně, a pak se vybral každý jedenáctý řez, takže bylo pro každé barvení použito pět řezů 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 (55). 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 endoglinu a VCAM-1 v endotelu byla vztažena k expresi PECAM-1 a vypočítána jako:

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

kde x je plocha endoglinu, nebo VCAM-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).

STATISTICKÁ ANALÝZA

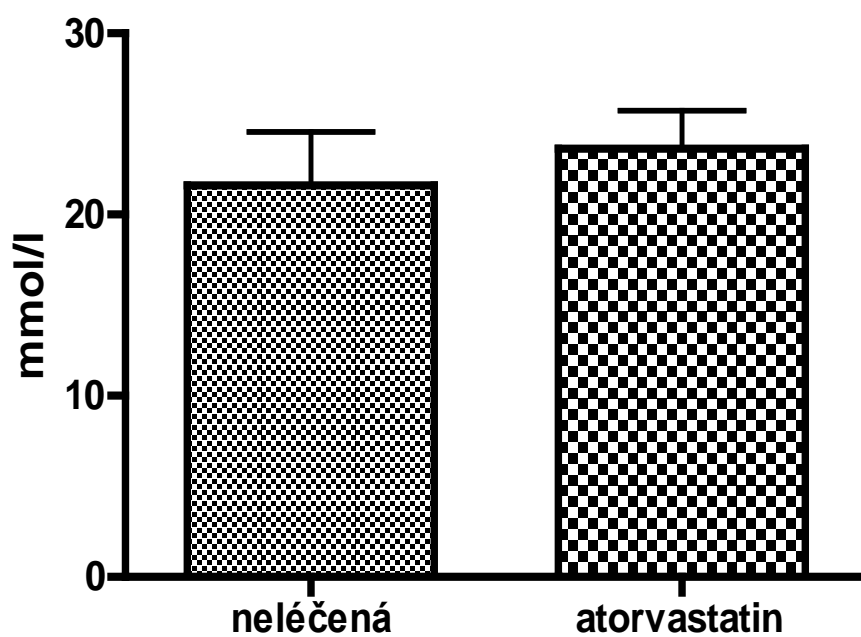
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$ kde $\alpha=0,05$.

VÝSLEDKY

BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu. Čtyřtýdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladinu celkového cholesterolu u devítitýdenní skupiny ve srovnání s neléčenými zvířaty ($21,62 \pm 2,94$ vs. $23,65 \pm 2,09$ mmol/l, $P = 0,558$) (viz obr. 10).

Obrázek 10. Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Čtyřtýdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ($P=0,587$)



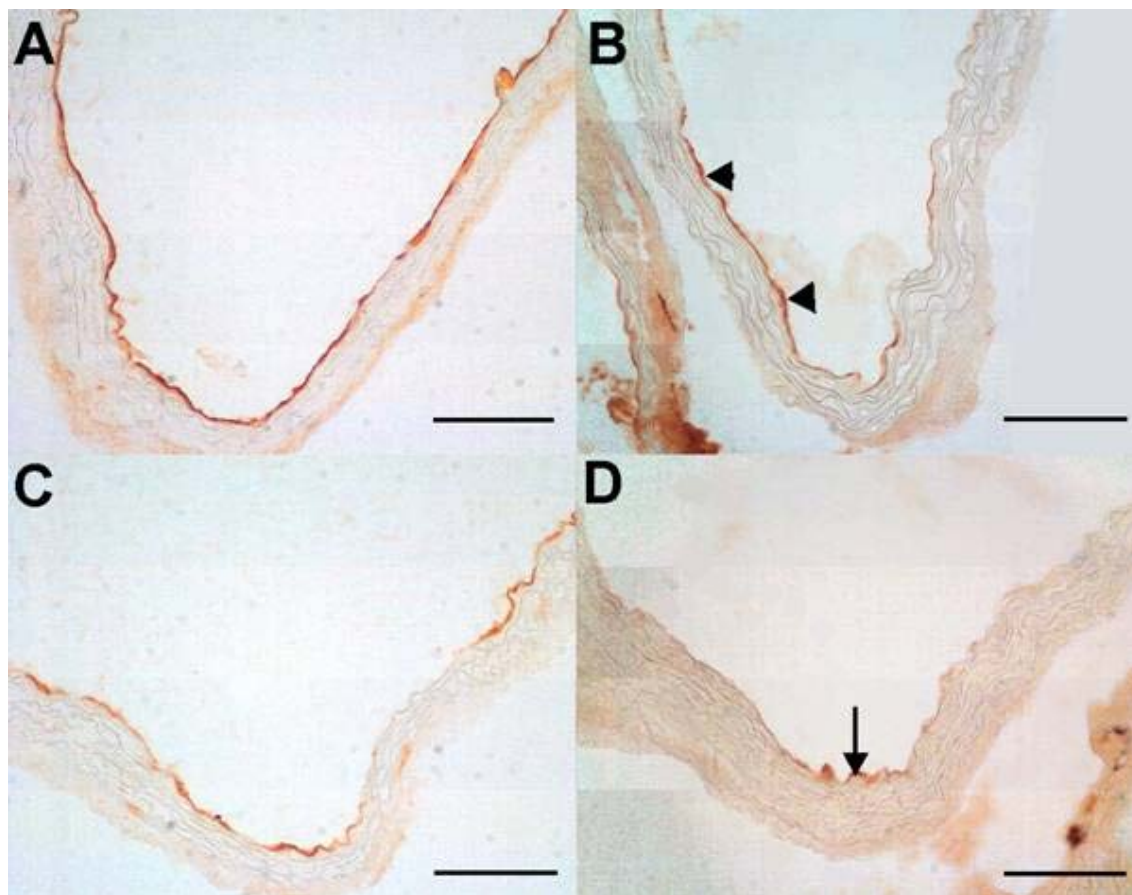
Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu

V oblasti aortálního sinu a oblouku nebyly u žádné z myší přítomny aterosklerotické léze nebo jiné morfologické abnormality. Exprese 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.

Exprese VCAM-1 byla pozorována převážně v endotelu aorty u obou skupin zvířat. (viz obr. 11) 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. 11).

Exprese 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. Exprese endoglinu byla podobná z hlediska lokalizace u všech myší v experimentu. Podávání atorvastatinu zřetelně snížilo expresi endoglinu v endotelu aorty. (viz obr. 11).

Obrázek 11. Exprese VCAM-1 a endoglinu v endotelu aortálního sinu cholesterolové skupiny zvířat (A, C) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B, D). Exprese je pozorována pouze v endoteliálních buňkách (viz. šipky). Z obrázku je patrné, že podávání atorvastatinu snížilo endoteliální expresi VCAM-1 (B), i endoteliální expresi endoglinu (D). Zvětšení 100x.

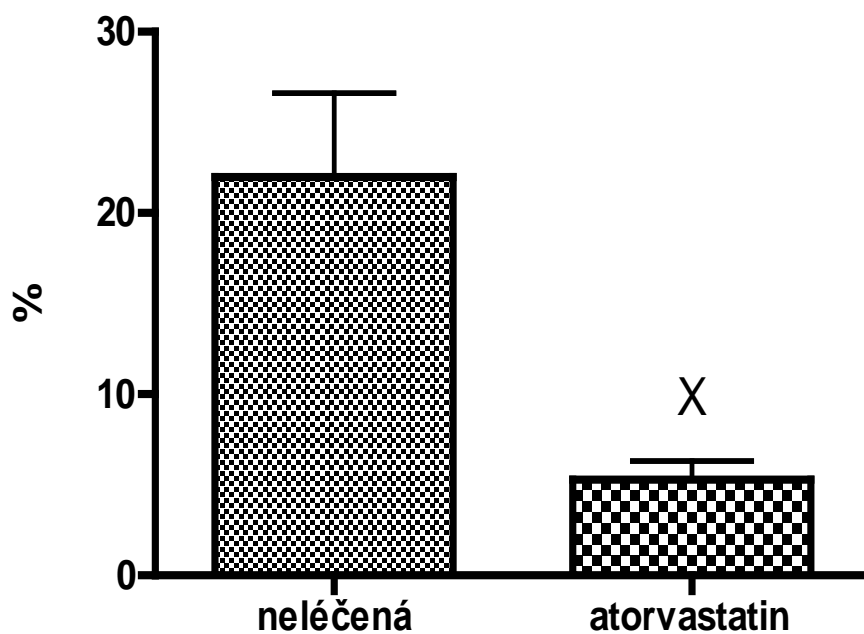


STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE ENDOGLINU U APO E DEFICIENTNÍCH MYŠÍ

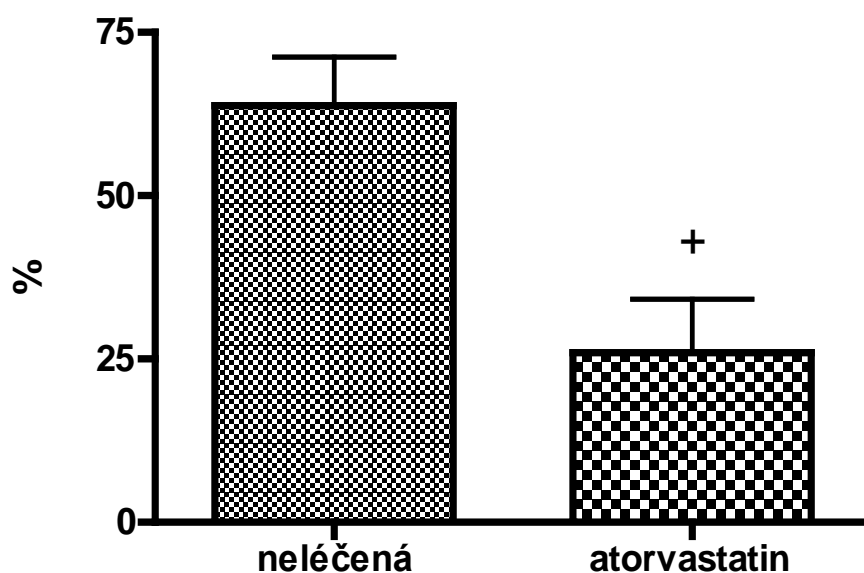
Stereologická analýza imunohistochemického barvení endoglinu prokázala signifikantní snížení jeho exprese po čtyřech týdnech podávání atorvastatinu ve srovnání s devítitýdenní neléčenou skupinou. ($22,0 \pm 4,5$ vs. $5,3 \pm 1,2$ %, $P^+ = 0,013$)

(Obr. 12). Také stereologická analýza exprese VCAM-1 ukázala signifikantní snížení endoteliální exprese VCAM-1 ($14,82 \pm 1,83$ vs. $2,11 \pm 0,98\%$, $P < 0,001$) po podávání atorvastatinu v porovnání s neléčenými myšmi. (Obr. 13).

Obrázek 12. Procento aktivovaných endoteliálních buněk pro endoglin v aortálním sinu a oblouku. Exprese endoglinu se signifikantně snížila po čtyřech týdnech podávání atorvastatinu ($^X P=0,013$).



Obrázek 13. Procento aktivovaných endoteliálních buněk pro VCAM-1 v aortálním sinu a oblouku. Exprese VCAM-1 se signifikantně snížila po čtyřech týdnech podávání atorvastatinu ($^+P=0,005$).



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 (1).

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky statiny. Statiny (někde uváděny též pod názvem vastatiny)

jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktázy). Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením, tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizací ateromatózních plátů aj (56). Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myší 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 a po několika měsících se u vybraných kmenů myší začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (57).

Ačkoli se tento model zprvu vyvíjel slibně, měl dva zásadní problémy. Oproti lidským aterosklerotickým lézím, které se vyskytují ve větvích hlavních cév, kde pláty progredují, myší léze jsou malé, vyskytují se pouze v oblastech aortálního oblouku a nedochází k jejich progresi. Strava, kterou jsou myši krmeny, je nefyziologická, obsahuje 10 – 20x více cholesterolu a žlučových kyselin. Tato strava vyvolá chronický zánět pouze u citlivých kmenů myší, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohadu, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myší jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE) (58). ApoE jsou tvořeny

primárně v játrech, mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myší se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneurysmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly (59).

Tato diplomová práce byla zaměřena studium exprese endoglinu a VCAM-1 v cévním endotelu u apoE-deficientního kmene myší po podávání atorvastatinu. Cílem bylo zjistit, jestli různě dlouhé podávání atorvastatinu ovlivňuje endoteliální expresi endoglinu a VCAM-1, a případně zda je toto ovlivnění spjato s hladinami celkového cholesterolu.

CD 105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu TGF- β . (60) Expresi endoglinu převládá na

endoteliálních buňkách, makrofázích, fibroblastech a hladkých svalových buňkách medie. (37)

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. (61)

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.

Adhezní molekula VCAM-1 je považována za marker endoteliální dysfunkce a to jak v časných a tak i pokročilejších stádiích aterogeneze. Její exprese se zvyšuje při hypercholesterolemii a je zásadní pro prostup makrofágů a lymfocytů do cévní intimy, čímž se výrazně podílejí na progresi aterosklerotických změn. (62).

Statiny kompetitivně inhibují HMG-CoA reduktázu, enzym, který katalyzuje biosyntézu cholesterolu. Kromě toho současné experimentální a klinické důkazy naznačují, že další účinky nezávislé na cholesterolu (pleiotropní), zahrnují zlepšení a obnovu endoteliálních funkcí, zvýšení stability aterosklerotického plátu, snížení oxidativního stresu a zánětu, útlum trombogenních reakcí ve stěně cév. (63)

ApoE deficitní myš je v současnosti velmi používaný zvířecí model pro studium aterosklerózy, přičemž tento model vykazuje určité podobnosti s hyperlipoproteinemií typu III. u člověka. Mimoto bylo prokázáno, že podávání statinů a tohoto modelu nevede k očekávanému hypolipidemickému účinku a tudíž je možné tento model považovat za vhodný ke studiu pleiotropních účinků statinů. (64) V souladu s těmito autory bylo v této diplomové práci prokázáno, že čtyřtýdenní podávání atorvastatinu neovlivnilo hladiny cholesterolu u apoE deficientních myší.

Navzdory tomuto faktu však výsledky stereologické analýzy imunohistochemického barvení endoglinu a VCAM-1 ukázaly signifikantní snížení exprese těchto proteinů ve skupině myší, kterým byl podáván atorvastatin.

Snížení exprese VCAM-1 bez ovlivnění hladiny cholesterolu potvrdilo již známé protizánětlivé účinky tohoto statinu. To bylo prokázáno již dříve u opic a apoE – Leiden myší.

Někteří autoři potvrdili, že pleiotropní účinky atorvastatinu jsou zprostředkované inhibicí transkripčního faktoru NF-kappaB, který se významně podílí na regulaci exprese genů pro VCAM-1, P-selektin nebo MCP-1, které hrají důležitou roli v patogenezi aterosklerózy. (65) Navíc Rius et. al. dokázali, že NF-kappa-B by mohl regulovat i transkripci endoglinu. (66) Dá se tedy předpokládat, že snížení endoteliální exprese jak endoglinu tak VCAM-1 u myší léčených čtyři týdny atorvastinem, je zprostředkováno právě inhibicí NF-kappaB.

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. (51) Vzhledem k tomu, že TGF- β působí protizánětlivě, inhibuje činnost makrofágů a T lymfocytů a snižuje expresi adhezních molekul (67) 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 ovlivňovat aterogenní proces. Tuto hypotézu bude však nutno ještě ověřit v dalších experimentech.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium exprese vybraných markerů endoteliální dysfunkce VCAM-1 a endoglinu v cévní stěně u apoE-deficientního kmene 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 čtyřtýdenním podávání atorvastatinu.

Tato diplomová práce prokázala, že atorvastatin nesnižuje hladinu cholesterolu u apoE-deficientního myšího modelu aterosklerózy.

Exprese endoglinu VCAM-1 byla detekována u všech skupin zvířat v endotelu aortálního sinu a aortálního oblouku a v kapilárách a malých cévách myokardu.

Čtyřtýdenní podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu snížení endoteliální exprese jak endoglinu tak i VCAM-1 ve srovnání s kontrolní skupinou.

Výsledky práce tedy potvrdily protizánětlivé účinky atorvastatinu na cévní endotel a zároveň naznačily jeho další účinky na signalizaci TGF-beta, přičemž tyto účinky budou ještě dále sledovány.

SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-126.
2. Handzha IM. [Viral infection, atherosclerosis, and ischemic heart disease]. *Lik Sprava* 2001(1):65-67.
3. Kriegstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):44S-54S.
4. Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91(10):3527-3561.
5. Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC et al. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002;106(11):1390-1396.
6. van Haelst PL, van Doormaal JJ, Asselbergs FW et al. Correlates of endothelial function and their relationship with inflammation in patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2003;104(6):627-632.
7. McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW et al. Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation* 2001;103(11):1546-1550.
8. Coniglio RI, Colombo O, Vasquez L et al. [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. *Medicina (B Aires)* 1997;57(1):21-28.
9. Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes* 1997;46(3):327-334.
10. Shantaram V. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1999;21(1-2):69-77.

11. Muntner P, He J, Astor BC et al. 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* 2005;16(2):529-538.
12. Daubresse JC. [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux* 2000;21(4):A359-362.
13. Laurila A, Bloigu A, Nayha S et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):2910-2913.
14. Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(6):1217-1225.
15. Zibara K, Chignier E, Covacho C et al. Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(10):2288-2296.
16. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 1998;9(5):471-474.
17. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79(1):181-213.
18. Konstantopoulos K, McIntire LV. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest* 1997;100(11 Suppl):S19-23.
19. Pereira LM, Mandarim-De-Lacerda CA. Myocardial microcirculation stereological changes in rats subjected to nitric oxide synthesis inhibition. *Pathol Res Pract* 1999;195(3):177-181.

20. Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 1997;100(11 Suppl):S87-89.
21. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 2001;52(3):372-386.
22. Shiomi M, Ito T, Tsukada T et al. Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ. An immunohistochemical study. *Arterioscler Thromb* 1994;14(6):931-937.
23. Hackman A, Abe Y, Insull W, Jr. et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 1996;93(7):1334-1338.
24. Maruyama I. Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant; its structure, function and expression. *Jpn Circ J* 1992;56(2):187-191.
25. Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K et al. The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 1998;4(3):135-139.
26. Stehbens WE. The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2002;58(4):359-360.
27. Joseph-Silverstein J, Silverstein RL. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest* 1998;16(3):176-182.
28. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24(7):1591-1601.
29. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol* 1994;144(5):952-961.

30. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998;102(1):145-152.
31. Mareckova Z, Heller S, Horky K. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 1999;45(1):46-50.
32. Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(1):2-10.
33. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 1995;17(3-4):229-244.
34. Bobryshev YV, Lord RS, Watanabe T, Ikezawa T. The cell adhesion molecule E-cadherin is widely expressed in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res* 1998;40(1):191-205.
35. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 1999;252(1):13-19.
36. Li C, Hampson IN, Hampson L et al. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J* 2000;14(1):55-64.
37. Obreo J, Diez-Marques L, Lamas S et al. Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* 2004;14(4-6):301-310.
38. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(1):1-10.
39. Auer J, Berent R, Weber T, Eber B. Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem* 2002;9(20):1831-1850.

40. Davignon J, Mabile L. [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2001;62(1 Pt 2):101-112.
41. Hernandez C, Lecube A, Barbera G et al. Effects of hypolipidemic treatment on serum markers of vascular inflammation in dyslipidemic men. *Med Sci Monit* 2003;9(3):CR114-119.
42. Ikeda U, Shimada K. Pleiotropic effects of statins on the vascular tissue. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2001;1(1):51-58.
43. Duriez P. [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie* 2003;58(1):5-14.
44. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A. The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther* 2003;99(1):95-112.
45. Li W, Asagami T, Matsushita H et al. Rosuvastatin attenuates monocyte-endothelial cell interactions and vascular free radical production in hypercholesterolemic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313(2):557-562.
46. Bea F, Blessing E, Shelley MI et al. Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering: potential role of simvastatin-mediated inhibition of Egr-1 expression and activation. *Atherosclerosis* 2003;167(2):187-194.
47. Arnaud C, Mach F. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98(6):661-666.
48. Bruckert E. [Therapeutic and pleiotropic effects of statins in primary and secondary prevention of atherosclerosis]. *Bull Acad Natl Med* 2001;185(1):49-60; discussion 60-42.

49. Comparato C, Altana C, Bellosta S et al. Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11(5):328-343.
50. Mori S, Saito Y. [Pleiotropic effects of statins]. *Nippon Rinsho* 2002;60(5):875-881.
51. Farmer JA. Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2(3):208-217.
52. Sinzinger H, Wolfram R, Peskar BA. Muscular side effects of statins. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40(2):163-171.
53. Martin Lujan F, Baldrich Justel M, Sola Alberich R, Basora Gallisa J. [About cardiovascular risk assessment in the new clinical trials with statins]. *Med Clin (Barc)* 2004;122(14):559.
54. Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M et al. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 2004;200(3):219-229.
55. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988;96(10):857-881.
56. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P et al. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 2000;102(23):2803-2809.
57. Paigen B, Morrow A, Holmes PA et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68(3):231-240.

58. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Tromb* 1994;14(1):133-140.
59. Hofker MH, Breuer M. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 1998;110:63-78.
60. Raab U, Lastres P, Arevalo MA et al. Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Lett* 1999;459(2):249-254.
61. Behr-Roussel D, Rupin A, Simonet S et al. 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* 2000;102(9):1033-1038.
62. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(10):1255-1262.
63. LaRosa JC. Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. *Am J Cardiol* 2001;88(3):291-293.
64. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(1):115-121.
65. Corsini A, Raiteri M, Soma MR et al. Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Am J Cardiol* 1995;76(2):21A-28A.
66. Letamendia A, Lastres P, Botella LM et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 1998;273(49):33011-33019.

67. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 2001;89(10):930-934.