

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Hradec Králové 2008

Barbora Tlapalová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Sledování exprese vybraných cytokinů u myšího
modelu aterosklerózy.

Studying of cytokine expression in mouse model
of atherosclerosis.

Školitel: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové 2008

Barbora Tlapalová

Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D., za odborné vedení rigorózní 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 na této katedře.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. ATEROSKLERÓZA	9
2.1.1. Lokalizace aterosklerózy	9
2.1.2. Patogeneze aterosklerózy	10
2.1.3. Vývojové stupně aterosklerózy	16
2.1.4. Teorie vzniku aterosklerózy	19
2.1.5. Rizikové faktory aterosklerózy	21
2.2. STATINY V LÉČBĚ HYPERCHOLESTEROLÉMIE	26
2.2.1. Mechanismus účinku	26
2.2.2. Indikace statinů	27
2.2.3. Nelipidové (pleiotropní) účinky statinů	28
2.2.4. Atorvastatin	30
2.3. ENDOGLIN	32
2.4. SMAD	35
3. CÍL PRÁCE	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA	37
4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	38
4.3. IMUNOHISTOCHEMIE	38
4.4. STATISTICKÁ ANALÝZA	42
5. VÝSLEDKY	43
5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	43
5.2. IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA	47
5.2.1. Imunohistochemické barvení SMAD 2 v oblasti aortálního sinu	47
5.2.2. Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu	49
5.3. WESTERN BLOT ANALÝZA	51
5.3.1. Western blot analýza exprese endoglinu	51
5.3.2. Western blot analýza exprese SMAD 2	52
6. DISKUSE	53
7. ZÁVĚR	57
8. ABSTRAKT	58
9. ABSTRACT	60
10. LITERATURA	62

Seznam použitých zkratk

ALK	activin like kinase
apoE	apolipoprotein E
BMP	bone morphogenetic factor, kostní morfogenetický faktor
bFGF	basic fibroblast growth factor, základní fibroblastový růstový faktor
CAM	cell adhesion molecules, buněčné adhezivní molekuly
CD	cytosolická doména
CMP	cévní mozková příhoda
CMV	cytomegalovirus
CRP	C – reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
DM2	diabetes mellitus 2. typu
EBV	virus Epsteinova a Barrova
EDGF	endothelium-derived growth factor, růstový faktor produkovaný endotelem
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
eNOS	syntáza NO
Hb	hemoglobin
HDL	high density lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě
HHT1	hereditární hemorrhagická teleangiektáza
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A
ICAM-1	intercellular cell adhesion molekule-1, adhezivní molekula
IDL	intermediate density lipoproteins, lipoproteiny o střední hustotě
ICHS	ischemická choroba srdeční

ICMP	ischemická cévní mozková příhoda
IgG	imunoglobulin G
IL-1, 6, 8	interleukin 1, 6, 8
IR	inzulinová rezistence
LDL	low density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě
LPS	lipopolysacharidy
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor, růstový hormon pro makrofágy
MDGF	monocyte-derived growth factor, růstový faktor monocytů
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
OSA	obstrukční spánková apnoe
OxLDL	oxidované LDL částice
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBS	fosfátový pufr
PDGF	platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor
TAG	triacylglyceroly
TGF β	transforming growth factor β , transformující růstový faktor β
TIMP-1	tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1
TNF α	tumor necrosis factor α , tkáňový nekrotizující faktor α
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1, adhezní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě

1. ÚVOD

Ateroskleróza je degenerativní onemocnění tepen (tzv. kornatění) charakterizované ukládáním tukových částic do cévní stěny. Výsledkem tohoto procesu je poškození cévní stěny, ztráta pružnosti cévní stěny. Dochází k tunutí cévní stěny s postupným zužováním jejího průsvitu. Může dojít k jejímu úplnému uzávěru s následnou ischemií příslušné části cévního řečiště. Tyto změny jsou nejvíce patrné na věnčitých tepnách srdce (ischemická choroba srdeční), tepnách dolních končetin (ischemická choroba dolních končetin) a mozkových tepnách (cévní mozkové příhody). Ateroskleróza se vyvíjí pomalu a nenápadně, jde o dlouhodobý zánětlivý proces (Ross 1999).

Velký rozvoj této nemoci je způsoben současným životním stylem většiny obyvatelstva. Špatné stravovací návyky, nedostatek pohybu, kouření, obezita, psychický stres a některá další onemocnění jako hypertenze, cukrovka vedou ke zhoršování zdravotního stavu a patří mezi rizikové faktory vzniku tohoto onemocnění. Současná data ze Světové zdravotnické organizace ukazují, že kardiovaskulární onemocnění jsou zodpovědná asi za 30 % celkové mortality na celém světě. Z toho je 42 % způsobeno ischemickou chorobou srdeční (ICHS) a 32 % onemocněními mozkových cév. V průmyslově vyspělých zemích jsou kardiovaskulární choroby hlavní příčinou úmrtí dospělé populace (Strutt et al 2004).

V České republice je úmrtnost na tato onemocnění jedna z nejvyšších v Evropě, i když v posledních letech začala konečně klesat. Nejčastější příčinou kardiovaskulární mortality je ICHS způsobena aterosklerózou. Léčba již vzniklých změn na tepnách je velice obtížná a proto je nutné tomuto onemocnění předcházet. S prevencí aterosklerózy by se mělo začít již v dětství.

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 (Wang 2005).

V této rigorózní práci jsme se snažili zjistit výskyt endoglinu a SMAD 2 v aterosklerotických plátech a popsat expresi endoglinu a SMAD 2 u apoE/LDL-receptor deficientních myší. Dále jsme sledovali, jak jsou tyto proteiny ovlivněny podáváním atorvastatinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění charakterizované endoteliální dysfunkcí a subendotelovou kumulací aterogenních lipoproteinů bohatých na cholesterol. Zánětlivého procesu se účastní již zmíněné modifikované lipoproteiny, makrofágy, T-lymfocyty, endotelové buňky a buňky hladkého svalstva. Výsledkem zánětu je vznik komplexních lézí v cévní stěně. Tyto léze, označované jako plaky, jsou příčinou zužujícího se průsvitu cév a mohou vést až k úplnému ucpaní cévy.

Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění, které se vyvíjí pomalu v závislosti na rizikových faktorech. Čím více je rizikových faktorů, tím je progresse ale i klinická manifestace nemoci rychlejší (Keaney 2000).

2.1.1. Lokalizace aterosklerózy

Při ateroskleróze je průtok krve ovlivněn zejména u cév koronárního řečiště, mozkových cév a cév dolních končetin. Postiženy jsou nejvíce velké a střední artérie a to především v určitých predispozičních (predilekčních) místech. K těm patří koronární artérie (jejich hlavní kmeny blízko větvení), femorální, tibiální a popliteální artérie v místech větvení. Dalšími predilekčními místy jsou oblouk aorty a odstupy velkých krčních artérií, bifurkace břišní aorty, interní a externí karotidy a cerebrální artérie (Stary et al 1994). Výskyt aterosklerózy v artériích je podmíněn rozdílnými hemodynamickými poměry vzhledem k vénám a odlišnou citlivostí endotelu.

2.1.2. Patogeneze aterosklerózy

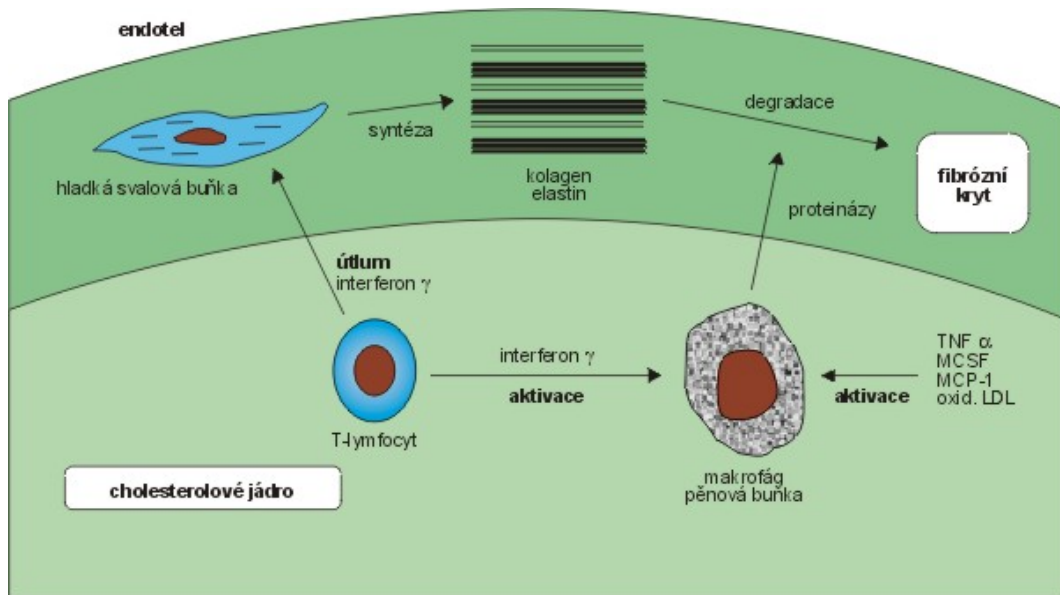
Podkladem pro vznik aterosklerózy je již zmíněná dysfunkce cévního endotelu. Nejprve dochází k *aktivaci endoteliálních buněk* (vlivem kouření, LDL, hemodynamického stresu atd.). Takto aktivované buňky produkují růstové faktory (PDGF, bFGF, MCP-1) a cytokiny (IL-1, TNF- α), na povrchu endotelu je zvýšena exprese buněčných adhezních molekul (CAM) mezi které patří např. VCAM-1 a ICAM-1 (Jang et al 1994). Díky změně permeability a vyšší expresi CAM, pronikají LDL částice do intimy. Následuje jejich oxidace (prostupem přes endotel, stykem s monocyty, makrofágy, hladkosvalovými buňkami a T-lymfocyty) a další poškození endotelu. Cytokiny přitahují do místa léze monocyty a T-lymfocyty z krevní cirkulace, dochází k jejich prostupu do intimy a jejich aktivaci. Monocyty se v intimě přeměňují na makrofágy (působením EDGF, M-CSF). OxLDL jsou vychytávány makrofágy vazbou na receptory pro OxLDL nebo tzv. scavengerové receptory. Příjem OxLDL pomocí scavengerových receptorů není zpětnovazebně regulován a díky zvýšené kumulaci cholesterolu vznikají pěnové buňky (Ross 1999). Pěnové buňky mohou v menší míře vznikat i z buněk hladkých svalů bohatých na lipidy. Nahromaděním pěnových buněk se vytvářejí *tukové proužky* (fatty streaks). Jsou makroskopicky viditelné a mají definovanou histologickou strukturu. Vznikají v místech se zvýšeným obsahem lipoproteinů v intimě díky jejich zvýšené vazbě na makromolekuly extracelulární matrix. Toto stádium není sice klinicky významné, ale může se dále vyvíjet ve fibrózní plak (Shantaram 1999).

Makrofágy také produkují růstové faktory (PDGF, MCP-1) a cytokiny (IL-1, TNF- α), které zvyšují chemotaxi a kumulaci dalších makrofágů a T-lymfocytů. Dále produkují společně s endotelem PDGF (destičkový růstový faktor), MDGF (monocytový růstový faktor) a zánětlivé mediátory (IL-8). Tyto látky způsobují

změnu fenotypu hladkých svalových buněk. Fenotyp kontraktilní se mění na fenotyp sekreční. Kontraktilní fenotyp udržuje cévní tonus a podílí se na reparaci při poškozeních. Fenotyp sekreční produkuje růstové faktory, cytokiny, elastin a kolagen. Dochází k proliferaci a migraci hladkosvalových elementů do intimy. Cytokiny přitahují další hladké svalové buňky, které syntetizují kolagenní matrix a vytváří tzv. fibrózní čepičku. Makrofágy dále pohlcují lipoproteinové částice (ve zvýšené míře volný cholesterol) a dochází k jejich kumulaci zejména ve střední části plátu. Volný cholesterol způsobuje nekrózu a apoptózu makrofágů. Výsledkem těchto procesů je vznik ateromového plátu (Mangge et al 2004).

Fibrózní ateromový plát je pevná světlešedivá vyvýšenina v lumen cévy. Můžeme na něm rozlišit fibrózní čepičku a protrombogenní jádro. Nejsvrchnější vrstvu čepičky tvoří endotel, pod ním jsou proliferované hladkosvalové buňky a zánětlivé buňky T-lymfocyty, makrofágy, pěnové buňky a extracelulární matrix (Yla-Herttuala 1991). Jádro plaku je složeno z buněčné drtě extracelulárních lipidů s krystalky cholesterolu a pěnových buněk.

Obr. 1 Zjednodušené schéma tvorby a degradace fibrózního krytu aterosklerotického plátu (<http://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=673>)



Pokud se plát vyklenuje do cévního lumen, může to mít hemodynamické důsledky pro průtok krve za stenózou. Omezení průtoku je dáno velikostí stenózy a spazmy cév. Takový plát se manifestuje ischemickými příznaky (stabilní anginou pectoris..) (Boyle 2005).

V plaku nebo na jeho okraji může dojít k vytvoření fisury, která bývá zdrojem ruptury s následným vznikem trombu. K ruptuře plátu obvykle dochází v místě aktivního zánětu, kde jsou nahromaděny makrofágy a T-lymfocyty. Ruptura aterosklerotického plátu je způsobena především mechanickými silami působícími na plát a sníženou mechanickou odolností plátu. Na jejím snížení se podílejí makrofágy produkcí proteolytických enzymů metaloproteináz, které ztenčují fibrózní čepičku a aktivované T-lymfocyty, které snižují produkci kolagenu (pomocí interferonu C) (Boyle 2005).

Trombus vzniká u plátu, který má slabý fibrózní kryt (čepičku). Největší protrombogenní vlastnosti má lipidové jádro (zřejmě díky vysokému obsahu tkáňového faktoru). Dochází k obnažení subendoteliálních prostor, adhezi trombocytů a tím ke spuštění koagulační kaskády. Trombus může ještě více snížit průtok krve cévou, nebo může dojít k jeho odtržení a embolizaci. Ruptura plátu (viz Obr. 5) s nasedající trombózou se klinicky manifestuje jako infarkt myokardu nebo nestabilní angina pectoris (Trostdorf et al 2005).

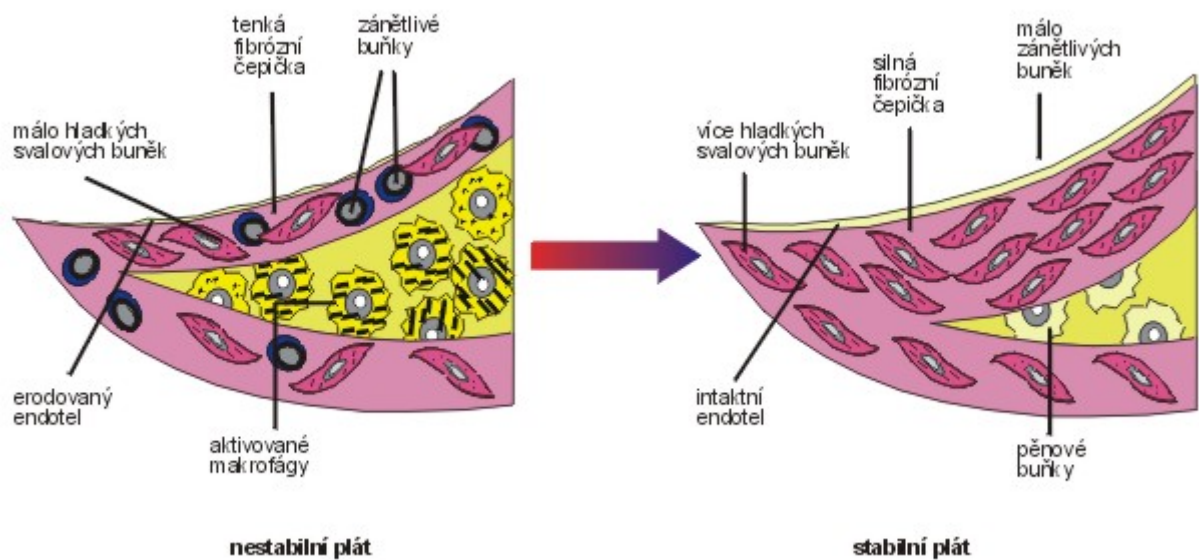
Plát náchylný k ruptuře se označuje jako plát vulnerabilní, nebo nestabilní. O stabilitě plátu rozhoduje velikost a konzistence ateromatózního jádra, hrubost a integrita fibrózní čepičky, zánětlivé změny a snížení odolnosti čepičky (Stehbens 2002).

Vulnerabilní plát bývá měkký s velkým polotekutým lipidovým jádrem. Jádro je složeno převážně z esterů cholesterolu, pěnových buněk a T-lymfocytů. Obsahuje velké množství zánětlivých buněk s malým množstvím kolagenu a hladkých svalových buněk. Tyto pláty bývají „mladé“ a nezjistitelné na angiografickém vyšetření (viz Obr. 2, Obr. 3) (Yuan et al 2002).

Stabilní plát na rozdíl od nestabilního obsahuje velké množství hladkých svalových buněk a kolagenu. Skládá se z lipidového jádra a malého množství zánětlivých buněk. Fibrózní čepička je silná a neporušená. Metaloproteinázy produkované makrofágy mohou způsobit její ztenčení. Tyto pláty jsou „starší“, hemodynamicky významné, ale po řadu let stálé (viz Obr. 2, Obr. 4) (Mallat et al 2001).

U pokročilých stádií aterosklerózy dochází k ukládání pevných sloučenin vápníku do okolí nekrotického jádra. Je zde určitá závislost mezi množstvím vápníku a závažností koronární aterosklerózy. Studie ukázaly, že kalcifikace zvyšuje riziko koronárních příhod.

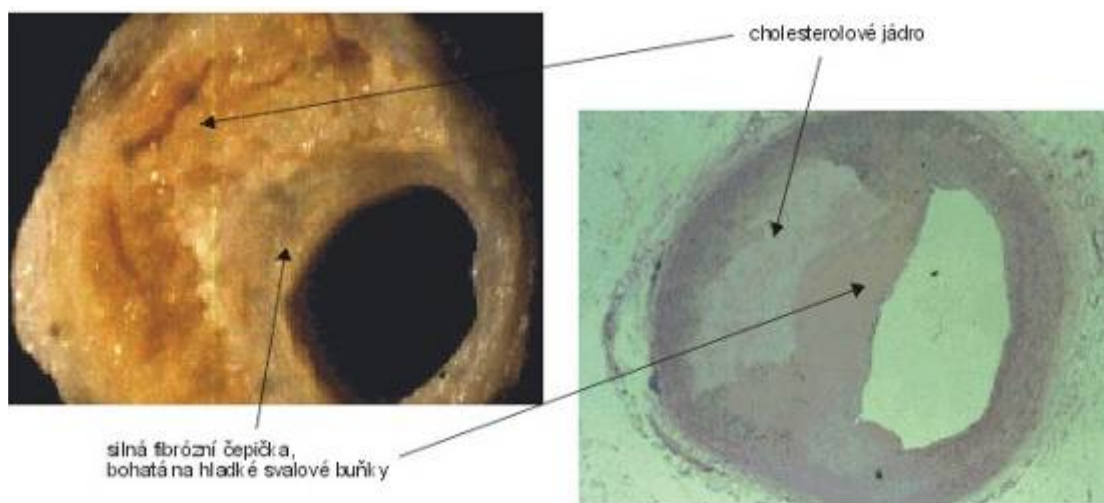
Obr. 2 Schéma stabilního a nestabilního aterosklerotického plátu (Libby, 1995; materiál "IMPACT", BMS ČR)



Obr. 3. Nestabilní aterosklerotický plát (Sary, 1995; materiál "IMPPACT", BMS ČR)



Obr. 4. Stabilní aterosklerotický plát (Sary, 1995; materiál "IMPPACT", BMS ČR)



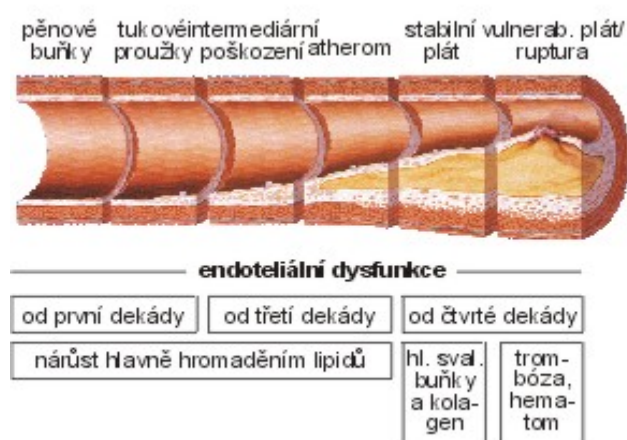
Obr. 5. Ruptura aterosklerotického plátu (Sary, 1995; materiál "IMPPACT", BMS ČR)



2.1.3. Vývojové stupně aterosklerózy

Z hlediska morfologického můžeme rozlišit 6 stupňů rozvoje aterosklerotické léze podle jejich závažnosti (dle American Heart Association) (viz. Obr. 3) (Stary et al 1994).

Obr.6 Vývoj aterosklerózy(Stary 1995; materiál "IMPACT", BMS ČR)



Typ I – izolované pěnové buňky

V intimě jsou přítomny skupiny makrofágů obsahujících v cytoplasmě kapénky lipidů. Toto stádium můžeme nalézt v koronárních artériích již v dětském věku.

Typ II – tukové proužky (fatty streaks)

Jedná se o vrstvu makrofágů změněných v pěnové buňky. Hladké svalové buňky v intimě také mohou obsahovat kapénky lipidů, ale ty se vyskytují především v makrofázích. Mohou se nacházet i ojedinělé T-lymfocyty. Tukové proužky se nalézají zejména v oblastech bifurkací a odstupů artérií. Jsou dvojího typu: I a ty

většinou progredují, obsahují více hladkých svalových buněk, makrofágů a pěnových buněk s kumulací lipoproteinů. Typ IIb progreduje buď velmi pomalu (u osob se zvýšeným obsahem lipoproteinů v krvi) nebo vůbec.

Typ III - přechodný

Pod proužky makrofágů a pěnových buněk se nachází separovaný pool extracelulárně uložených lipidů. Lipidy obsahují více volného cholesterolu, mastných kyselin, triacylglycerolů než typ II.

Typ IV – aterom

Rozvinuté stádium III s hustým nahromaděním extracelulárních lipidů. Rozpadem pěnových buněk vzniká tzv. lipidové jádro, které obsahuje krystaly cholesterolu a depozita kalcia. Mezi endotelem a lipidovým jádrem jsou v intimě makrofágy a hladké svalové buňky s kapénkami tuků. Tento typ se nachází u lidí ve věku kolem 30 let. Většinou neovlivňuje průtok krve a je tedy klinicky němý.

Typ V

Léze obsahují vystupující pojivovou tkáň, mají zvýšený obsah kolagenu a hladkých svalových buněk. Na okrajích lipidového jádra, a někdy i v nově vytvořené pojivové tkáni jsou kapiláry. Tento typ se dále dělí na další podtypy. Podtyp Va má měkké tukové jádro a slabou fibrózní čepičku, u které může dojít k ruptuře. Podtyp Vb má naopak malé tukové jádro, fibrózní čepička je odolná a méně náchylná k prasknutí.

Typ VI – komplexní poškození

Jedná se o lézi, která je modifikovaná disrupcí povrchu, hematodem, hemorragií nebo trombózou, a která může vést k okluzi. Při ruptuře aterosklerotické léze je aktivována koagulační kaskáda, dochází k agregaci trombocytů s tvorbou trombu. Ten se může inkorporovat do léze, nebo okludovat artérii a způsobit ischemii. Trombóza, nasedající na aterosklerotickou lézi, je příčinou akutní koronární symptomatologie infarktu myokardu, nestabilní anginy pectoris nebo náhlé smrti (Stary 1989).

2.1.4. Teorie vzniku aterosklerózy

Ateroskleróza je velice složitý zánětlivý proces a mechanismy jejího vzniku nejsou zatím přesně známy. Snahu o vysvětlení přináší několik teorií (Semenkovich & Heinecke 1997).

Lipidová teorie

Předpokladem je, že primární příčinou aterosklerózy je kumulace lipidů (především LDL, ale i IDL, VLDL). Zvýšený průnik do endotelu je dán jejich vysokou koncentrací v krvi. V endotelu dochází k jejich vychytávání makrofágy a buňkami hladké svaloviny a přeměně na pěnové buňky, které se stávají ložiskem aterosklerotického procesu (Semenkovich & Heinecke 1997).

Teorie endoteliálního poškození

Podle této teorie je primární příčinou rozvoje aterosklerózy poškození cévního endotelu. Na něj adherují trombocyty, které uvolňují řadu faktorů (např. PDGF) a stimulují proliferaci hladkých svalových buněk a syntézu extracelulární matrix. Chemoatraktanty přitahují monocyty, ty se mění v makrofágy a spolu s hladkosvalovými buňkami samy produkují PDGF. Ukládání lipidů je podle této teorie záležitostí sekundární (Cannon 1998).

Sjednocená teorie aterosklerózy

Vychází z předpokladu, že základním krokem v rozvoji aterosklerózy je endoteliální dysfunkce. Postižení endotelu je lokalizované, není porušena jeho

integrita, ale jsou poškozeny některé jeho funkce. Endoteliální buňky mají vyšší obrat a je zvýšena permeabilita. Vzniká nerovnováha mezi vasoaktivními mechanismy a hemokoagulačními působky. Výsledkem je převaha vasokonstrikčních a protrombotických pochodů, dochází k aktivaci zánětlivých a proliferačních dějů. Je zvýšena adherence a agregace trombocytů, uvolňování růstových a proliferačních faktorů. Chemoatraktanty přitahují další monocyty, které se mění na makrofágy. Lipoproteiny pronikají poškozeným endotelem, infiltrují cévní stěnu, jsou oxidovány a aktivují další makrofágy.

Infekční teorie

Tato teorie předpokládá, že základním etiologickým agens, vyvolávajícím endoteliální dysfunkci a zánětlivou reakci, jsou chronické bakteriální a virové infekce. Ty vedou k aktivaci imunitního systému, zvýšené tvorbě imunitních komplexů způsobujících dysfunkci endotelu a zánětlivou reakci. Po poškození následuje akumulace lipidů, makrofágů, uvolňování proliferačních a chemotaktických působků a progresse aterosklerózy. Za možná infekční agens jsou v dnešní době považována Chlamydia pneumoniae, Cytomegalovirus, Helicobacter pylori, herpetické viry a další (Laurila et al 1997).

2.1.5. Rizikové faktory aterosklerózy

Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění. Rizikové faktory se podílí nejen na vzniku, ale i na její progresi (Muntner et al 2005). Poškozují cévní endotel a způsobují jeho dysfunkci. Ty hlavní můžeme rozdělit na tzv. modifikovatelné a nemodifikovatelné. Jejich přehled je v tabulce.

Modifikovatelné rizikové faktory	Nemodifikovatelné rizikové faktory
Hypercholesterolemie	věk > 45 let muži, > 55 let ženy
Kouření	rodinná anamnéza (předčasná ICHS)
Hypertenze	mužské pohlaví
diabetes mellitus	
fyzická inaktivita	
Obezita	

K dalším neméně důležitým rizikovým faktorům patří *metabolický syndrom*, *zvýšená hladina triacylglycerolů*, *snížená hladina HDL cholesterolu*, *obstrukční spánková apnoe*, *zvýšená hladina C-reaktivního proteinu*, *psychický stres* a *některá infekční agens (Iacoviello et al 2001)*.

Hypercholesterolémie

Pro rozvoj aterosklerózy má hlavní úlohu vysoká hladina tzv. sérového cholesterolu (VLDL a LDL), který můžeme nalézt v lipoproteinových částicích (Sacks et al 2000). Úlohou sérového cholesterolu je transportovat lipidy z potravy, nebo endogenně vytvořené, do periferních tkání. Existuje několik typů lipoproteinů. Chylomikrony jsou důležité pro transport lipidů z diety, zatímco VLDL, IDL, LDL a HDL jsou zásadní pro transport endogenních lipidů. VLDL jsou bohaté na triacylglyceroly, po jejich rozpadu vznikají LDL částice, které představují největší podíl sérového cholesterolu a z tohoto důvodu jsou rozhodující pro transport lipidů k periferním tkáním (normální hladina v krvi by měla být $< 2,6$ mmol/l). Hladinu LDL určuje rychlost vazby na LDL receptory v játrech. Vysoké hladiny LDL cholesterolu negativně ovlivňují endoteliální dysfunkci (zvyšují permeabilitu), způsobují vyšší migraci monocytů do subendoteliálních prostor, aktivaci endoteliálních buněk a následnou vyšší expresi adhezivních molekul. Na rozdíl od LDL, HDL cholesterol brání rozvoji endoteliální dysfunkce a aterosklerózy. HDL částice pronikají do intimy, zajišťují reflux přebytečného cholesterolu, chrání LDL před oxidací, stimulují syntézu NO, inhibují adhezi monocytů, agregaci trombocytů, snižují krevní viskozitu a tlumí aktivitu t-PA a PAI-1. Hladina HDL by měla být nad 1,0 mmol/l.

Hypertenze

Dalším velice důležitým rizikovým faktorem je vysoký krevní tlak. Způsobuje mechanické poškození endotelu. Zvýšení systolického krevního tlaku je významnější, než zvýšení diastolického krevního tlaku. Hodnoty krevního tlaku nad 140/90 mm Hg (u diabetiků 135/85 mmHg) vedou ke zvýšené koncentraci angiotenzinu II. Angiotenzin II ovlivňuje aktivitu endotelových buněk,

hladkosvalových buněk a makrofágů. V endotelových buňkách stimuluje tvorbu NF- κ B (faktor spouštějící transkripci zánětlivých genů), dochází ke zvýšené adhezi leukocytů, expresi adhezivních molekul a tvorbě superoxidu (reaguje s NO a způsobuje dysfunkci endotelu). Dále angiotenzin působí na růst a kontrakci cévních hladkosvalových buněk a zvyšuje jejich lipooxygenázovou aktivitu. Zvýšení této aktivity způsobuje vyšší produkci leukotrienů a lipoperoxidů s následnou oxidací LDL a tvorbou pěnových buněk. Léčba hypertenze snižuje incidenci CMP, ICHS a srdečního selhávání (Catena et al 2005).

Diabetes mellitus

Hyperglykémie způsobuje vyšší glykaci proteinů, včetně lipoproteinů LDL (za vzniku tzv. AGEs). Tyto glykované LDL snáze podléhají oxidaci a jsou rozpoznávány i scavengerovými receptory makrofágů, mohou aktivovat leukocyty a endoteliální buňky a navodit zánětlivý proces. Zvyšuje se produkce superoxidového radikálu, který inaktivuje NO. U diabetiků je tedy snížena tvorba NO, ale naopak zvýšena produkce vasokonstrikčních prostaglandinů a narušena endotel-dependentní vasodilatace. Dochází ke snížené syntéze prostacyklinu, vyšší tvorbě PAI-1 a vyšší expresi adhezivních molekul. Ateroskleróza u pacientů s kolísavými a vysokými hladinami krevního cukru, tedy špatně kompenzovanou cukrovkou, probíhá rychleji s častějšími zdravotními následky (D'Agostino et al 2004).

Obezita

Obezita je dlouho známý rizikový faktor aterosklerózy. V současné době přibývá důkazů, že není tak důležitá obezita jako taková, ale spíše její typ. Zvýšené riziko aterosklerózy představuje intraabdominální kumulace tuku. Dobrým parametrem určujícím rozsah tohoto druhu obezity je obvod pasu (u mužů > 102 cm a u žen > 88 cm). Intraabdominální tukové buňky nejsou jen zásobárnou tuku, ale produkují prozánětlivé a prokoagulační faktory (Coniglio et al 1997).

Fyzická inaktivita

Studiemi bylo prokázáno, že pravidelná fyzická aktivita snižuje riziko ICHS, kardiovaskulární i celkové mortality u mužů i u žen. Riziko ICHS u mužů se sedavým způsobem života je asi dvakrát větší než u mužů s pravidelnou fyzickou aktivitou. U nemocných s ICHS, kteří začali po hospitalizaci s pravidelnou fyzickou aktivitou, došlo k poklesu kardiovaskulární i celkové mortality ve srovnání s těmi, kteří svůj životní styl nezměnili (Smith 1997).

Kouření

Kouření poškozuje endotel a způsobuje endoteliální dysfunkci, snižuje HDL cholesterol, způsobuje hemodynamický stres, zvyšuje koagulační pohotovost, má proarytmogenní účinek, způsobuje relativní hypoxii (CO redukuje kapacitu Hb pro kyslík) a snižuje toleranci k fyzické zátěži. Zvyšuje tvorbu superoxidového radikálu, který inaktivuje NO a oxiduje LDL. Kouření je tedy komplexně působící agresivní rizikový faktor rozvoje aterosklerózy (McGill et al 2001).

C-reaktivní protein

Jedná se o velmi nespecifický, ale velmi citlivý marker zánětlivé reakce. Po stimulaci mediátory zánětu (IL-6, IL-8, TNF- α) je produkován nejen hepatocyty, ale také endoteliálními buňkami, hladkosvalovými buňkami a makrofágy. Spolupodílí se na rozvoji aterosklerózy díky poškození fyziologické funkce endotelu, posílení prozánětlivého a prokoagulačního stavu (Iacoviello et al 2001).

Infekce

Předpokládá se, že infekční agens mohou spustit, nebo se podílet na progresi aterosklerózy. Ovlivňují lipidové spektrum (zvyšují VLDL, TAG, snižují HDL), indukují tvorbu volných radikálů v cévní stěně, aktivují prozánětlivé a prokoagulační faktory, zvyšují expresi CAM a hladinu CRP. V aterosklerotických lézích byla nalezena řada patogenů např. Chlamydia pneumoniae, P. gingivalis, CMV (cytomegalovirus), EBV (virus Epstein-Barr) a Helicobacter pylori (Laurila et al 1997).

Obstrukční spánková apnoe

Za jeden z novějších rizikových faktorů aterosklerózy je považována obstrukční spánková apnoe (OSA). Přítomnost OSA je spojena s řadou proaterogenních jevů např. se *stimulací sympatiku* (projevuje se vyšší klidovou srdeční frekvencí, vyšší variabilitou krevního tlaku), s *prokoagulačním stavem* (je zvýšen fibrinogen, snížena fibrinolytická aktivita, zvýšena aktivace a agregabilita trombocytů), s *prozánětlivým stavem* (je zvýšena hladina CRP a fibrinogenu), a s *endoteliální dysfunkcí*. Léčba OSA vede k rychlé normalizaci uvedených patologických důsledků. Obstrukční spánková apnoe je považována za významný nezávislý rizikový faktor rozvoje hypertenze.

2.2. STATINY V LÉČBĚ HYPERCHOLESTEROLÉMIE

Statiny (nazývané též vastatiny) patří v dnešní době mezi nejúčinnější hypocholesterolemika.

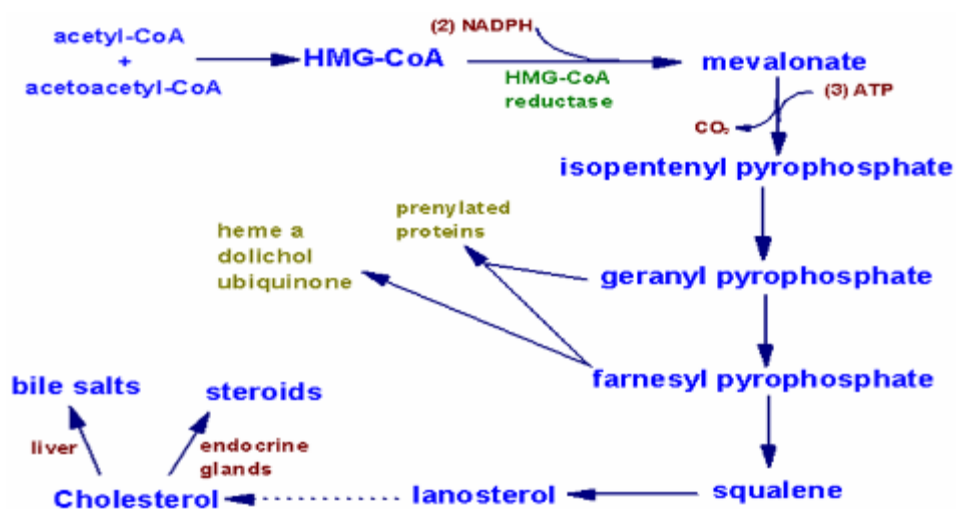
Statiny jsou kompetitivními inhibitory enzymu HMG-CoA reductázy. Místem jejich působení jsou játra. Základní dávka statinů snižuje LDL-cholesterol asi o 27%, její zdvojnásobení vždy o dalších asi 7%. Syntéza endogenního cholesterolu je nejvyšší v noci, proto bývá doporučováno brát statiny na noc.

2.2.1. Mechanismus účinku

Statiny způsobují inhibici klíčového enzymu syntézy cholesterolu HMG-CoA reductázy (3hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reductázy). Tento enzym katalyzuje v játrech přeměnu HMG-CoA na mevalonát (viz Obr. 7). Jeho inhibicí dochází k bloádě endogenní biosyntézy cholesterolu. Kyselina mevalonová je prekurzorem nejen cholesterolu, ale i mnoha nesteroidních isoprenoidních sloučenin, které se účastní procesu buněčného metabolismu a mezibuněčné komunikace (Vaughan et al 2000). Snížení hladiny cholesterolu vede k jeho depleci zejména v hepatocytech, díky tomu dochází ke zvýšené transkripci LDL receptorového genu a zvýšené expresi LDL receptorů. Následkem zvýšení počtu receptorů je rychlejší odstraňování LDL cholesterolu z krevního oběhu. Pokles hladiny cholesterolu vede ke zmenšení velikosti aterosklerotických plátů a snížení rizika jejich ruptury a k méně častým projevům ischemie (Czuriga & Edes 2006). Statiny ovlivňují také hladiny triglyceridů vylučováním VLDL cholesterolu, nepřímo působí i na zvýšení hladiny HDL (Ahmed & Griffiths 2004).

Podle klinické účinnosti můžeme statiny srovnat takto rosuvastatin, atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin, pravastatin (od neúčinnějšího k nejméně účinnému) (Duriez 2003).

Obrázek 7 Schéma syntézy cholesterolu
(<http://web.indstate.edu/thcme/mwking/cholesterol.html>)



2.2.2. Indikace statinů

Hlavní indikací statinů je hypercholesterolemie nebo smíšená dyslipidémie s převahou hypercholesterolemie u pacientů s manifestní aterosklerózou, nebo ve vysokém riziku aterotrombotických komplikací. Statiny snižují riziko kardiovaskulárních příhod o 61% a riziko ICMP o 17%. Hlavním cílem léčby není snížení hladin lipidů na určitou hranici, ale snížení rizik kardiovaskulárních příhod.

2.2.3. Nelipidové (pleiotropní) účinky statinů

Podle randomizovaných klinických studií se statiny podílejí na snížení incidence infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhody u pacientů s hypercholesterolémií. Klinický prospěch je dán nejen jejich schopností snižovat hladiny plazmatických lipidů, ale i jejich pleiotropními účinky, které jsou nezávislé na snížení hladin lipidů. Statiny inhibicí HMG-CoA reductázy blokují nejen vznik cholesterolu, ale i dalších nesteroidních isoprenoidních sloučenin, jejichž prekurzorem je kyselina mevalonová. Isoprenoidy se účastní procesů buněčného metabolismu a mezibuněčné komunikace. Snížením jejich syntézy jsou ovlivněny různé patologické procesy. Mezi významné extralipidové účinky patří ovlivnění zánětlivé reakce, endoteliální dysfunkce, tvorby trombů, stability plátů, inzulínové rezistence a kostní formace, což jsou mechanismy a procesy uplatňující se v patofyziologii aterosklerózy, ischemické cévní mozkové příhody, demence, diabetes mellitus nebo osteoporózy (Mehta 2003).

Protizánětlivé účinky jsou dány zejména snížením hladiny CRP, inhibicí interakce endotelových buněk a leukocytů, snížením počtu zánětlivých buněk v aterosklerotickém plátu a snížením exprese CAM (Mori & Saito 2002).

Příznivé působení na *endoteliální dysfunkci* spočívá nejspíš v jejich schopnosti zvyšovat expresi a aktivitu endoteliální NO syntázy (eNOS) (Wierzbicki et al 2003). Statiny tedy ovlivňují posttranskripční a posttranslační děje. Ovlivněním syntézy NO je snížena progresse aterosklerózy.

Dalším pleiotropním účinkem je *inhibice migrace a proliferace buněk hladkého svalstva*. Je pozorován především u lipofilních derivátů (Corsini et al 1995). Statiny navíc inhibují expresi tkáňového faktoru lidských makrofágů,

důsledkem může být snížení intenzity trombózy při ruptuře plátu. Stabilizační účinek na aterosklerotický plát je výsledkem schopnosti statinů redukovat hladiny lipidů, inhibovat jejich oxidaci, snižovat zánět, buněčnou smrt, syntézu metaloproteináz (způsobují oslabení fibrózní čepičky), zvyšovat hladiny tkáňového inhibitoru metaloproteinázy-1 (TIMP-1) a obsah kolagenu v plátu (Comparato et al 2001).

U lidí trpících *Alzheimerovou demencí* dochází ke kumulaci neurotoxického β -amyloidu v mozku a zvýšení hladiny sérového cholesterolu. V experimentálních studiích bylo po podávání statinů zjištěno snížení intracelulárních a extracelulárních hladin β -amyloidu. Omezení tvorby β -amyloidních plaků je následkem snížení membránového cholesterolu. Statiny jsou také schopny inhibovat lidské cholinesterázy, zejména butyrylcholinesterázu (její hladina je u Alzheimerovy nemoci zvýšená). Cholinesterázy hrají roli v patogenezi a progresi nemoci (jejich inhibitory se používají k léčbě symptomů) (LaRosa 2001).

Pleiotropní účinky statinů hrají roli i v rozvoji *inzulinové rezistence* a následné klinické manifestaci *diabetu mellitu typu 2*. Inzulinová rezistence (IR) je charakterizována sníženou schopností periferních tkání reagovat na cirkulující inzulin, dochází ke snížení vstupu glukózy do buněk a ke kompenzační hyperinzulinémii. Vývoj IR je spojen s dalšími rizikovými faktory jako např. obezita, hypertenze a dyslipidémie (souhrnně označované jako metabolický syndrom) (Semenkovich & Heinecke 1997). Statiny ovlivněním zvýšené hladiny triglyceridů, zánětlivé reakce a endoteliální dysfunkce mají vliv na vývoj IR a následně i na rozvoj DM2.

V poslední době byl prokázán příznivý vliv statinů i na *kostní denzitu* a snížení rizika fraktur. Statiny mají stejný účinek na aktivitu osteoklastů jako bifosfonáty (omezují kostní resorpci inhibicí farnesylypyrofosfátsyntázy, enzymu

účastníciho se i syntézy cholesterolu). Inhibitory HMG-CoA reductázy působí také při novotvorbě kostní hmoty. Zvyšují expresi genu pro kostní morfogenetický protein-2. Tento protein je růstovým faktorem umožňující proliferaci a zrání osteoblastů a novotvorbu kostí (Tonolo et al 2003).

Tyto pleiotropní účinky (spojené s lokální modulací biosyntézy mevalonátu) přispívají ke snížení rizika aterosklerotických komplikací a mohly by být využity i v dalších indikacích. Například při snižování rizika nového vývoje diabetes mellitus typu 2, demence a osteoporózy. Použití statinů v jiných, než hypolipidemických indikacích, brání nedostatek randomizovaných klinických studií sledujících terapeutickou účinnost v nových indikacích.

Díky tomu obecně platí názor, že extralipidové účinky mají pouze doplňující funkci k hlavnímu hypolipidemickému efektu (Calabro & Yeh 2005).

2.2.4. Atorvastatin

Atorvastatin patří podle původu do III. generace statinů s největší účinností při snižování celkového a LDL cholesterolu. Je využíván jak v monoterapii tak i v kombinantní léčbě spolu s fibráty. V klinické studii bylo prokázáno, že atorvastatin snížil hodnotu celkového cholesterolu o 30-46%, LDL cholesterolu o 41-61%, apolipoproteinu B (o 34-50%) a triglyceridů (o 14-33%).

Je indikován u nemocných s izolovanou hypercholesterolémií nebo u nemocných se smíšenou (kombinovanou) hyperlipoproteinémií s převahou hypercholesterolémie a jen mírným zvýšením triglyceridů.

Atorvastatin je lipofilní, snadno prostupuje hematoencefalickou bariérou, což může vést k ovlivnění centrálního nervového systému.

Farmakokinetika

Atorvastatin je po perorálním podání rychle absorbován. Absorpce klesá při podání s potravou. Většina dávky je vycytána z krve v játrech v průběhu jediného průchodu tímto orgánem. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 1-2 hodinách. Z 98% se váže na plazmatické proteiny. Atorvastatin je metabolizován cytochromem P450 3A4 na biologicky aktivní metabolity. Po hepatální a extrahepatální metabolizaci je vylučován žlučí. Poločas inhibiční aktivity HMG-CoA reduktázy je asi 20-30 hodin. Vzhledem ke svému delšímu biologickému poločasu může být atorvastatin podán v kteroukoliv denní dobu.

Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky jsou velmi řídké kolem 1%. Nejčastěji k nim dochází při podání atorvastatinu v kombinaci s jiným interagujícím lékem. K nejběžnějším nežádoucím účinkům patří gastrointestinální poruchy (zácpa, nadýmání, dyspepsie, bolesti břicha, průjem), bolesti hlavy, insomnie, myalgie a vyrážka.

Atorvastatin je kontraindikován v graviditě, u kojících žen, u lidí s myalgií a jaterním onemocněním v aktivním stavu.

Obvyklá denní dávka atorvastatinu je 10 mg, úprava dávkování se provádí s odstupem 4 týdnů podle výsledků LDL cholesterolu v krevním séru. Maximální denní dávka je 80 mg. (Bellosa et al 2000).

2.3. ENDOGLIN

Endoglin, nazývaný také molekulou CD150, je 180kD velký homodimerní transmembránový glykoprotein. Je exprimovaný převážně na endoteliálních buňkách, v menší míře i na ostatních typech buněk (Obreo et al 2004). Endoglin funguje jako pomocný receptor (typ III) pro několik členů superrodiny TGF- β receptorů (transformující růstové faktory typu β).

Endoglin moduluje signalizaci vzájemně se ovlivňujících TGF- β receptorů typu I a II. (Guerrero-Esteo et al 1999). Mutace genů kódujících endoglin je spojena s výskytem hereditární (vrozené) hemorrhagické teleangiektázy typu 1 (HHT1). Jedná se o autosomálně dominantně dědičnou cévní chorobu, charakterizovanou ohniskovou teleangiektázou a arteriovenózními malformacemi (Rius et al 1998).

Endoglin je up-regulován ve tkáních u kterých probíhá angiogeneze a *in vitro* inhibicí jeho exprese na endoteliálních buňkách u nichž je poškozena proliferace a schopnost přežití (van Laake et al 2006).

Studie prokázali, že takzvané Eng-null myši (eng -/-) umírají během gravidity kvůli poškozené angiogenezi a kardiovaskulárním abnormalitám. Naproti tomu heterozygotní myši jsou schopny přežít, ale mají predispozici k rozvoji cévních abnormalit např. HHT. (Bourdeau et al 2000).

Tyto výsledky naznačují vliv endoglinu v remodelaci cév a homeostáze. Potvrzením tohoto názoru jsou informace, že u těchto myši je poškozena syntéza NO díky snížené expresi eNOS (endoteliální syntáza oxidu dusného). (Jerkic et al 2004). Mimoto u izolovaných endoteliálních buněk myši typu Eng +/- je snížena proliferace a migrace, poškozena tvorba kapilár a snížena aktivita eNOS a sekrece VEGF (vaskular endothelial growth factor). (Jerkic et al 2004) Tyto změny, spojené

s redukovanou tvorbou krevních cév u modelů angiogeneze *in vivo*, ukazují hlavní roli endoglinu v angiogenezi. (Duff et al 2003).

Podle výsledků studií *in vitro* spočívá význam rozpustného endoglinu v inhibici signálu TGF- β 1 a blokádě aktivace eNOS endoteliálních buněk zprostředkovanou TGF- β 1. (Toporsian et al 2005).

U člověka je v současné době známo sedm typů skupiny I a pět typů skupiny II TGF- β receptorů (Lebrin et al 2005). TGF- β receptory typu I a II jsou serinové/threoninové kinázy (S/T-kinázy), přenášejí signál pomocí SMAD proteinů. Jejich význam ve fosforylaci TGF- β receptorů (serinový versus threoninový typ) není zatím znám.

Do skupiny I TGF- β receptorů patří ALK1 (activin-like kinase) a T β RI nazýván také jako ALK5. ALK1 a ALK5 jsou spojeny s typem II TGF- β (T β RII) (van Laake et al 2006). Vazba mezi TGF- β ligandem a T β RII receptorem vyvolá spojení mezi receptorem typu I s T β RII, umožní později fosforylaci receptoru typu I a následnou aktivitu jeho kinázové domény (Jerkic et al 2004). Aktivovaný receptor typu I šíří signál fosforylace Smad proteinů pomocí transkripce korepresorů a koaktivátorů. (Lebrin et al 2005) Endoglin je typem III TGF- β receptorů, je substrátem pro T β RII a ALK5 katalyzovanou fosforylaci (van Laake et al 2006). Zatím ale nebyl dokázán význam fosforylace endoglinu a jeho schopnost sloužit jako substrát pro ALK1.

Fosforylace lidského endoglinu probíhá u endoteliálních buněk a u myších fibroblastů (Letamendia et al 1998). Studiemi bylo prokázáno, že endoglin je fosforylován na serinových a threoninových zbytcích. T β RII a ALK5 interagují s endoglinem, výsledkem této interakce je fosforylace endoglinu na jeho cytosolické doméně (CD) (Piao & Tokunaga 2006). V žádné předchozí studii nebyly

identifikovány specifické zbytky molekuly endoglinu u kterých proběhla fosforylace. Byla zkoumána také specifčnost rozdílných typů receptorů TGF- β s endoglinem, nebo jednotlivé kroky fosforylace endoglinu.

2.4. SMAD

SMAD jsou intracelulární proteiny podílející se na transdukci signálu. Přenášejí signál z cytoplasmy do jádra a tím regulují aktivitu cílových genů. K tomu aby se dostaly do jádra potřebují kofaktory, označované jako Co-Smad (Lebrin et al 2005).

U člověka a u myši je známo 8 typů Smad proteinů, u *Drosophily* 4 a u *C. elegans* 3 typy. Pouze 5 savčích Smad (Smad 1, 2, 3, 5, 8) slouží jako substrát pro rodinu receptorů TGF- β , popisované obvykle jako Smad regulující receptory, nebo RSmads (Santibanez et al 2007).

Smad 1, 5 a 8 slouží jako substráty pro BMP (bone morphogenetic proteins) a anti-Muellerian receptory. Smad 2 a 3 pro TGF- β receptory, activinové a Nodal receptory.

Smad 4, popisován také jako tzv. Co-Smad, slouží jako běžný partner pro všechny RSmad.

Smad 6 a 7 jsou inhibitory Smad sloužící tzv. „návnada“ interakcí mezi Smad a receptorem a mezi jednotlivými molekulami Smad.

TGF- β hraje důležitou roli v regulaci řady buněčných funkcí jako je růst, diferenciace, apoptóza, adheze a motilita. Účinkuje cestou signální transdukce za účasti Smad proteinů. TGF- β se nejprve váže na transmembránový receptor (TGF- β -R), dochází k fosforylaci a aktivaci Smad proteinů (SMAD 2, 3) a vytvoření heteromerního komplexu se SMAD 4, tím je umožněn přenos do jádra a regulace (inhibice) transkripce cílových genů (pro růst) a tím i tvorba příslušných proteinů (Zhang et al 1996).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit a popsat expresi endoglinu a SMAD 2 v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficientních myší. Dále jsme chtěli zjistit, jak jsou tyto proteiny ovlivněny podáváním atorvastatinu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15-20 gramů, byly zakoupeny v Taconic Europe (Dánsko) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

4.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21 % tuku (11 % nasycených mastných kyselin) a 0,15 % cholesterolu.

Obě skupiny byly krmeny experimentálními dietami po dobu 8 týdnů. Každá z myší 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 bylo provedeno usmrcení předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

4.3. IMUNOHISTOCHEMIE

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na cévách získaných z geneticky modifikovaného kmene myší. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru vážící 15-20 gramů.

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (*Leica, Praha, Česká republika*), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická 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.

Pro detekci exprese SMAD 2 a endoglinu byla použita metodika avidin-biotin s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Primární protilátky

Pro detekci exprese endoglinu v cévní stěně jsme použili pro světelnou i fluorescenční mikroskopii stejnou monoklonální protilátku: Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) ve zředění 1/100 (*Pharmlingen, USA*).

K detekci exprese markeru SMAD 2 v cévní stěně byla použita pro světelnou mikroskopii monoklonální protilátka Rabbit Anti-Mouse CD106 SMAD 2 ve zředění 1/100 (*Pharmlingen, USA*).

Sekundární protilátky

Jako sekundární protilátka byla pro světelnou mikroskopii použita monoklonální protilátka Goat Anti-Rat IgG (*Vector Laboratories*).

Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, *DAKO, Carpinteria, USA*).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (*Vitana Corp., USA*) za pomoci softwaru LUCIA verze 5.0 (*Laboratory Imaging Prague, Česká republika*).

Pracovní postup

EnVision systém – detekce exprese SMAD2

1. sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
2. fixace v acetonu (-20°C; 30min)
3. oschnutí řezů (15min)
4. promytí v PBS (2 x 5 min)
5. aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
6. aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
7. promytí v PBS (2 x 5 min)
8. promytí v 3% H₂O₂ (15 min)
9. promytí v PBS (2 x 5 min)
10. aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
11. promytí v PBS (2 x 5 min)
12. inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (doba inkubace různá pro každou protilátku)
13. oplach řezů v acetonu
14. odvodnění řezů (aceton)
15. odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
16. odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
17. odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
18. montování řezů do Eukittu

ABC systém – detekce endoglinu

Tkáňové řezy byly přeneseny na sklíčka předem upravená v roztoku želatiny. Po oschnutí (60 minut) se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v minus 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. Po patnáctiminutovém usušení se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa třicetiminutovou inkubací s 10% roztokem goat séra (*Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo*) v PBS. V další fázi byly na sklíčka napipetovány roztoky anti-avidinu a anti-biotinu, které zablokovaly reaktivitu těchto látek v myší tkáni.

Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut) a dále do 3% H₂O₂ (15 minut).

Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy 30 minut inkubovaly s biotinylovanou sekundární protilátkou Goat Anti-Rat IgG (*Vector Laboratories*) a opět se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). V další fázi byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (*Vector Laboratories*).

K vizualizaci navázaných protilátek se použil chromogen DAB (*DAKO, Carpinteria, USA*). Na závěr byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton–xylenu (10:1) (3 minuty), aceton–xylenu (1:10) (3 minuty) a v xylenu (3 x 2 minuty). Na závěr byla sklíčka zamontována do Eukittu.

4.4. STATISTICKÁ ANALÝZA

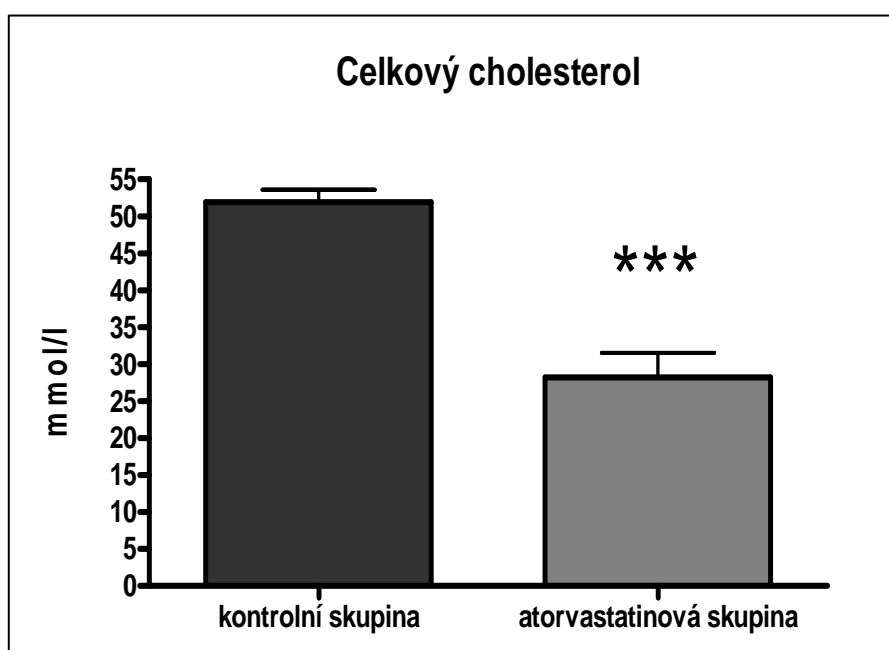
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byl použit neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$.

5. VÝSLEDKY

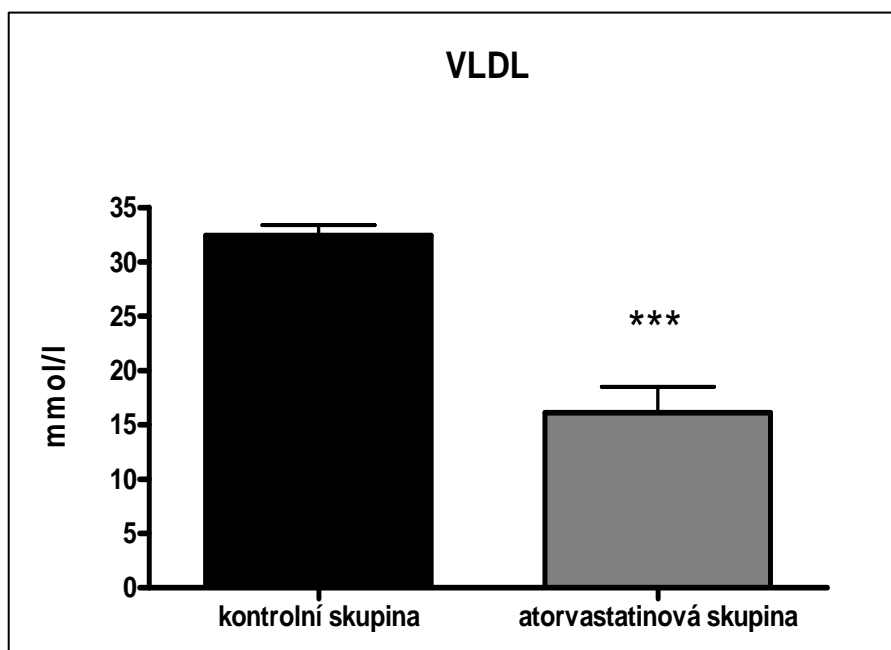
5.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu, VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky prokázaly, že osmítýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL a TAG (viz. graf 1-3,5). Navíc bylo zjištěno, že atorvastatin také zvýšil hladiny HDL cholesterolu (viz. graf 4).

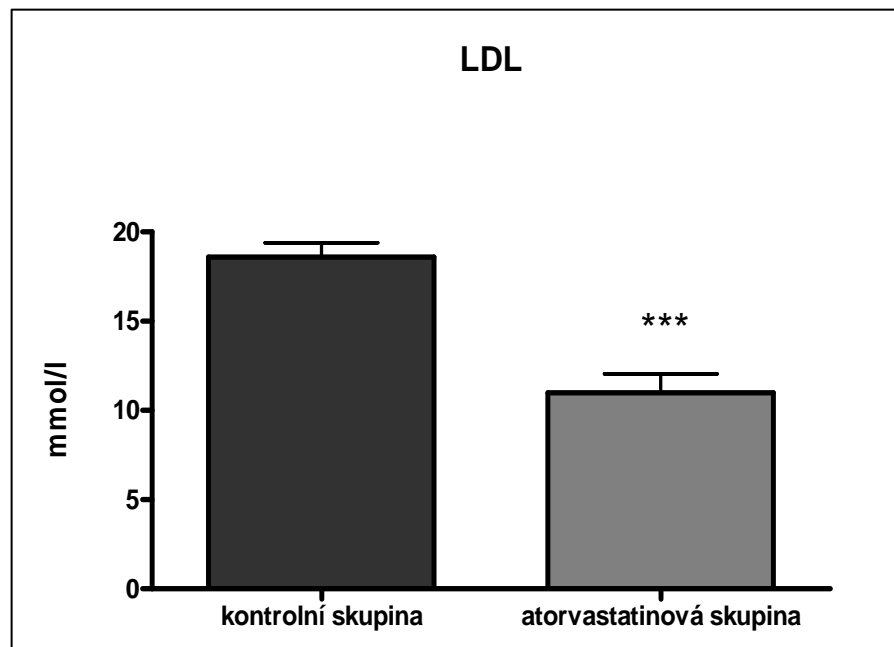
Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (^{xxx} $P \leq 0,001$).



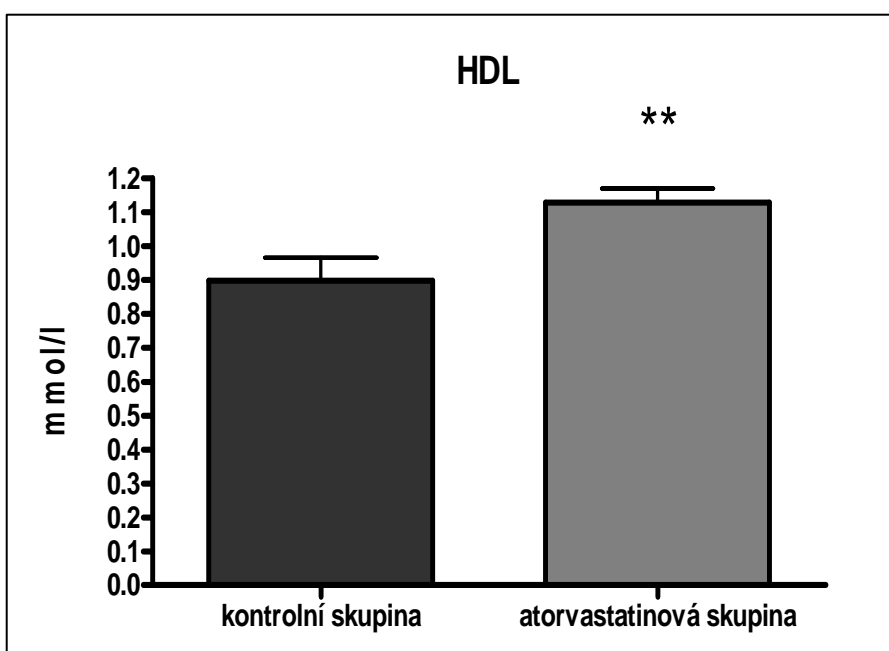
Graf 2: Hladiny VLDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny VLDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (^{xxx} $P \leq 0,001$).



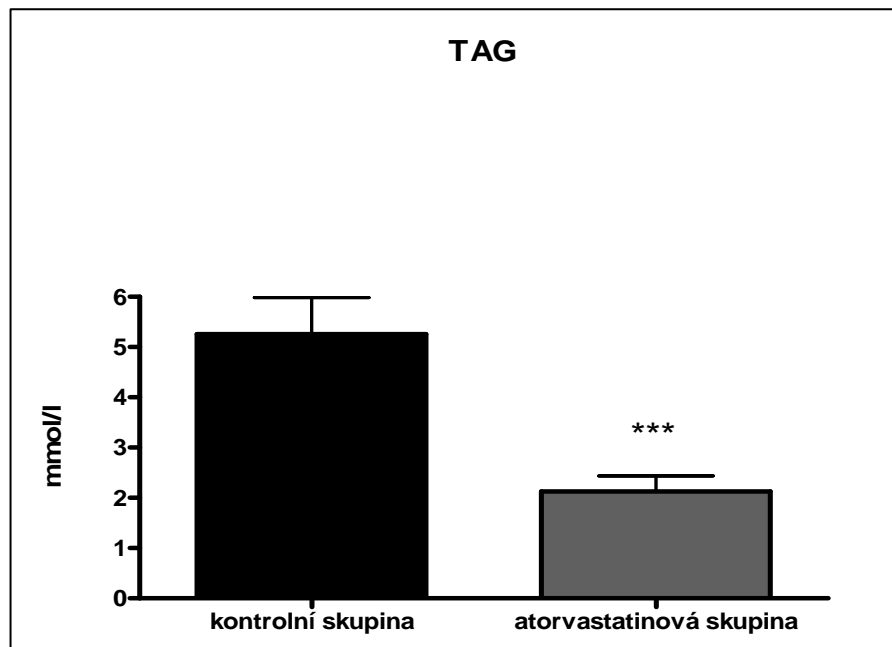
Graf 3: Hladiny LDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (^{xxx} $P \leq 0,001$).



Graf 4: Hladiny HDL cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny HDL cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (^{xx} $P \leq 0,05$).



Graf 5: Hladiny triacylglycerolů u experimentálních myši. Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně snížilo hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou. (^{xxx} $P \leq 0,001$).

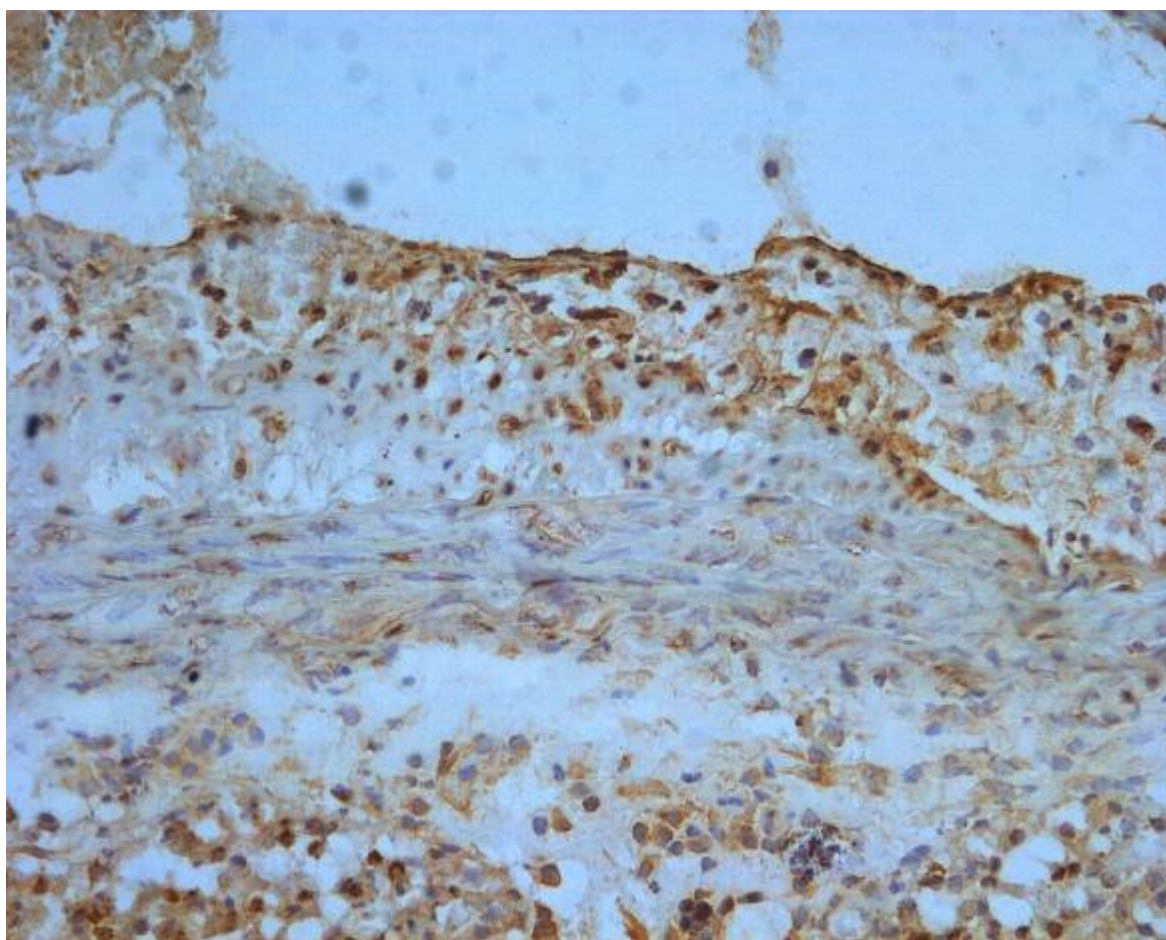


5.2. IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA

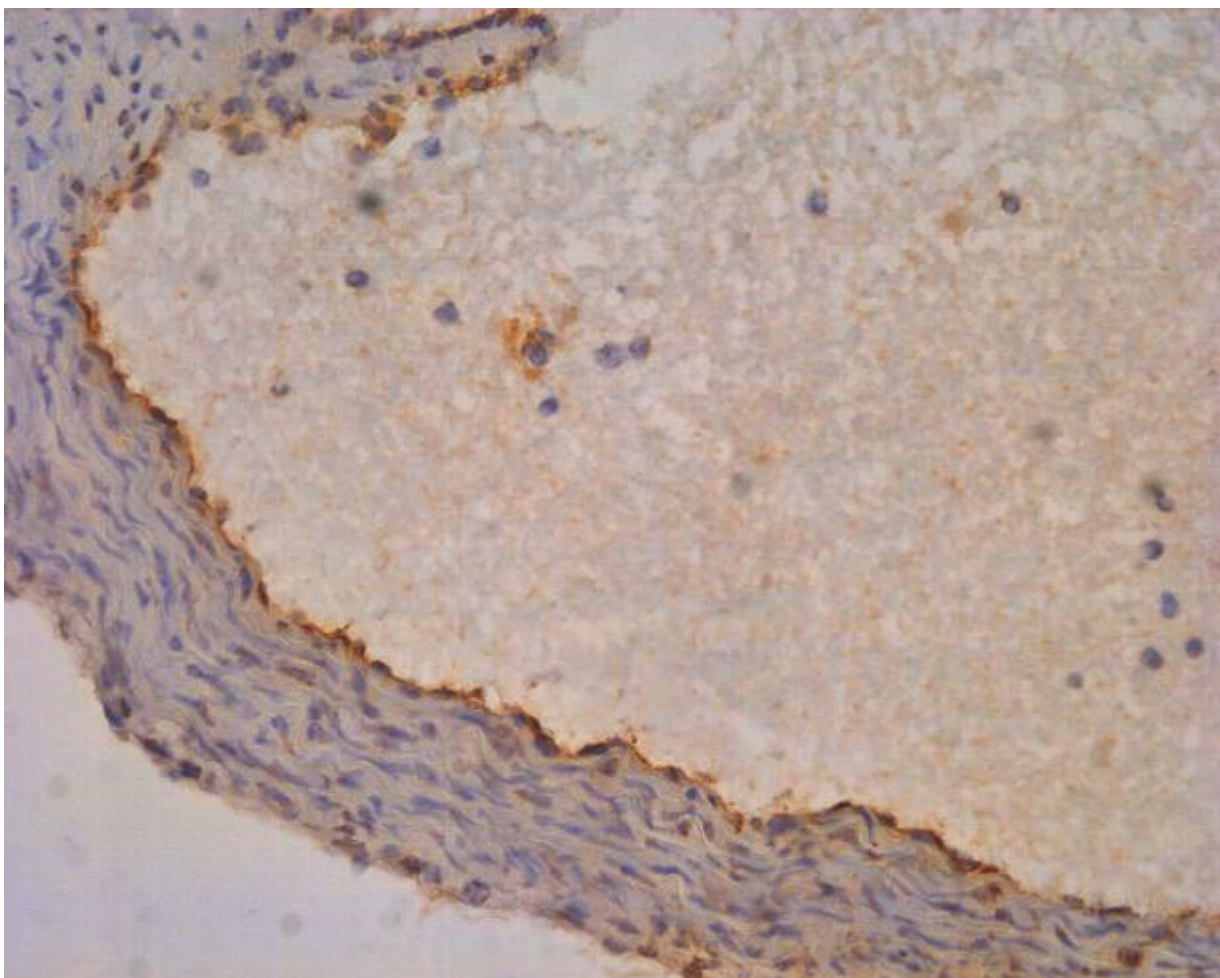
5.2.1. Imunohistochemické barvení SMAD 2 v oblasti aortálního sinu

Imunohistochemická analýza prokázala expresi SMAD 2 v oblasti aterosklerotických plátů. Exprese byla konkrétně nalezena uvnitř plátu, na cévním endotelu plátu i mimo něj. (viz obr. 8 a 9).

Obr. 8. Imunohistochemické barvení SMAD 2; zvětšeno 200x. Silná exprese je pozorována na cévním endotelu, a dále také v celém aterosklerotickém plátu. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.



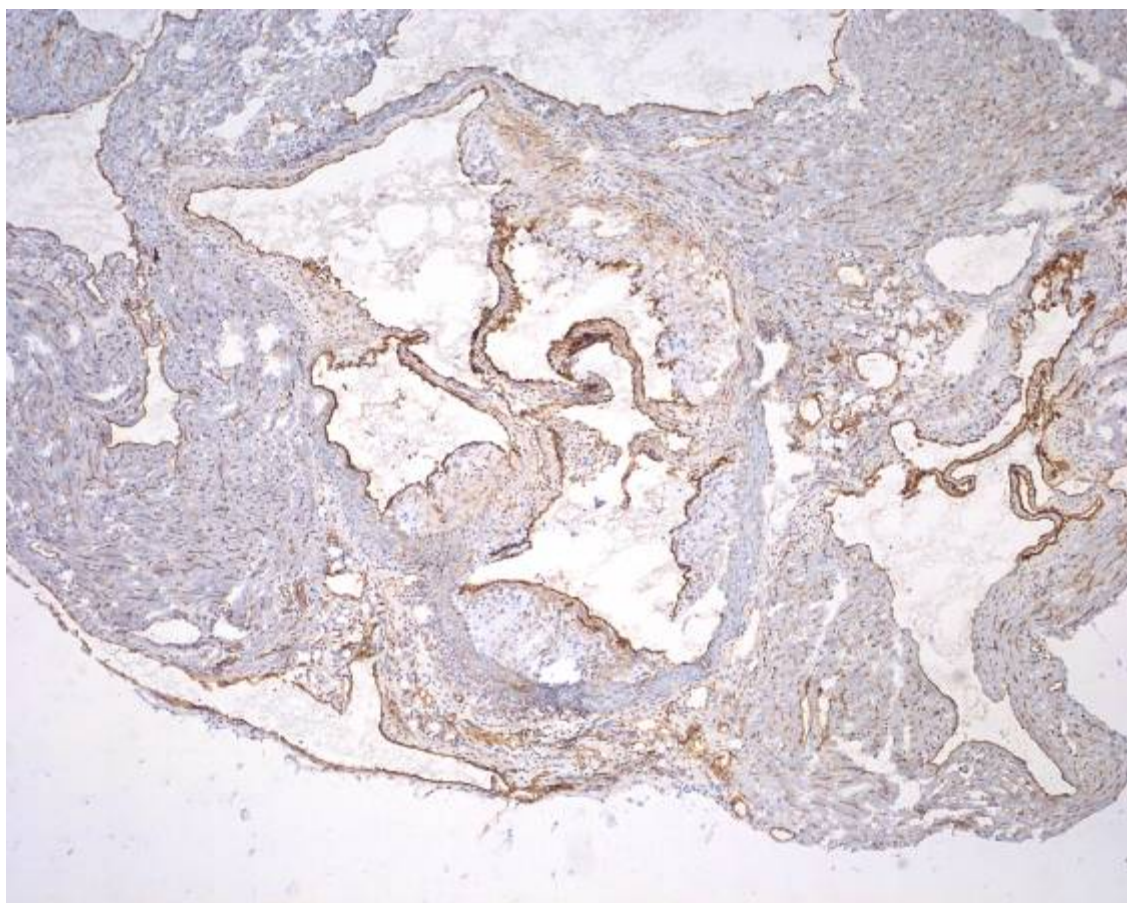
Obr.9. Imunohistochemické barvení SMAD 2; zvětšeno 200x. Silná exprese je pozorována na cévním endotelu mimo aterosklerotický plát. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.



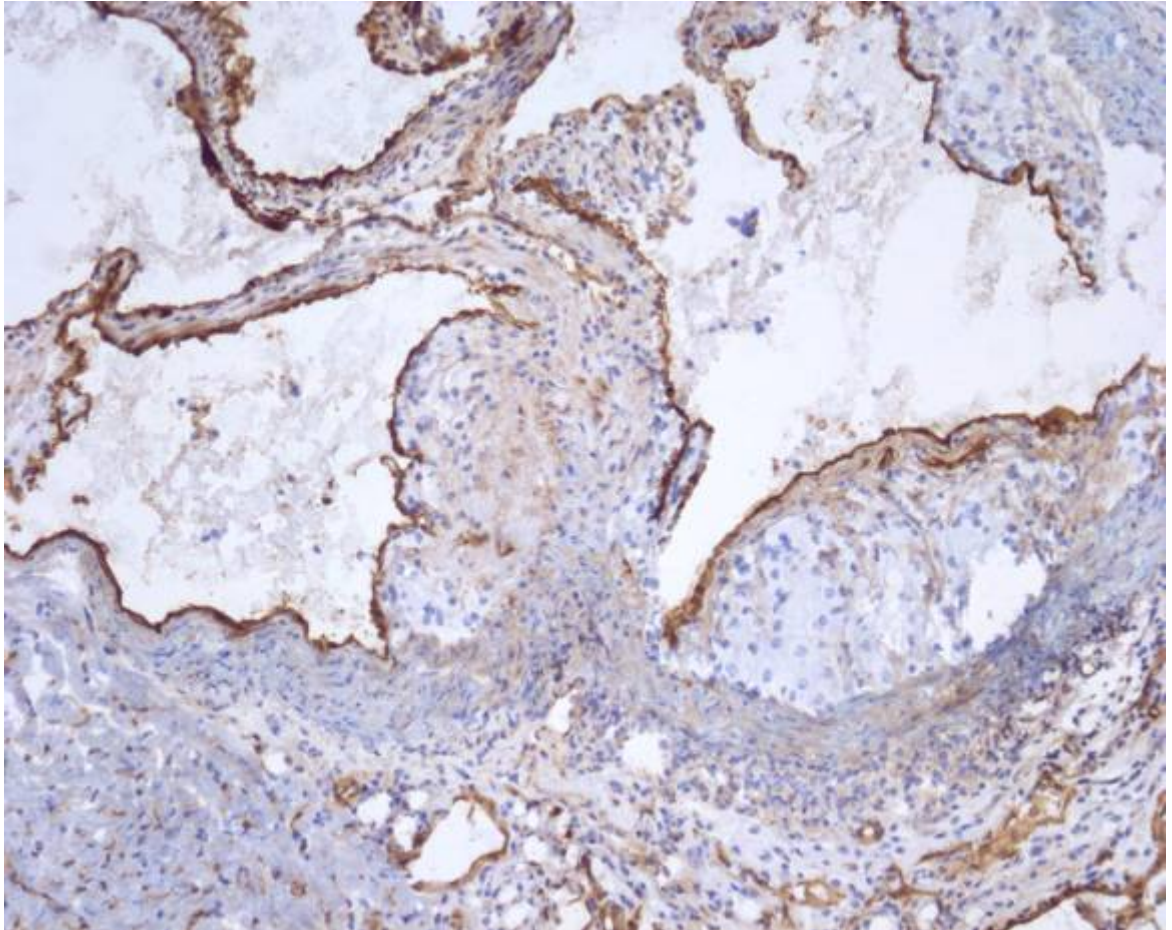
5.2.2. Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu

Expres endoglinu byla pozorována hlavně v cévním endotelu, a to jak v oblasti aorty, tak u menších cév a kapilár v okolním myokardu. U velkých aterosklerotických plátů byla exprese endoglinu na několika místech pozorována i v aterosklerotických plátech. (viz obr. 10 a 11).

Obr.10. Imunohistochemické barvení endoglinu; zvětšeno 40x. Expres endoglinu je detekována na endotelu aorty a také v menších cévách a kapilárách okolního myokardu . Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.



Obr.11. Imunohistochemické barvení endoglinu; zvětšeno 100x. Na detailu cévní stěny můžeme pozorovat endoteliální expresi endoglinu lokalizovanou zejména na povrchu aterosklerotického plátu. Slabou expresi vidíme také uvnitř plátu a v okolním myokardu. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.

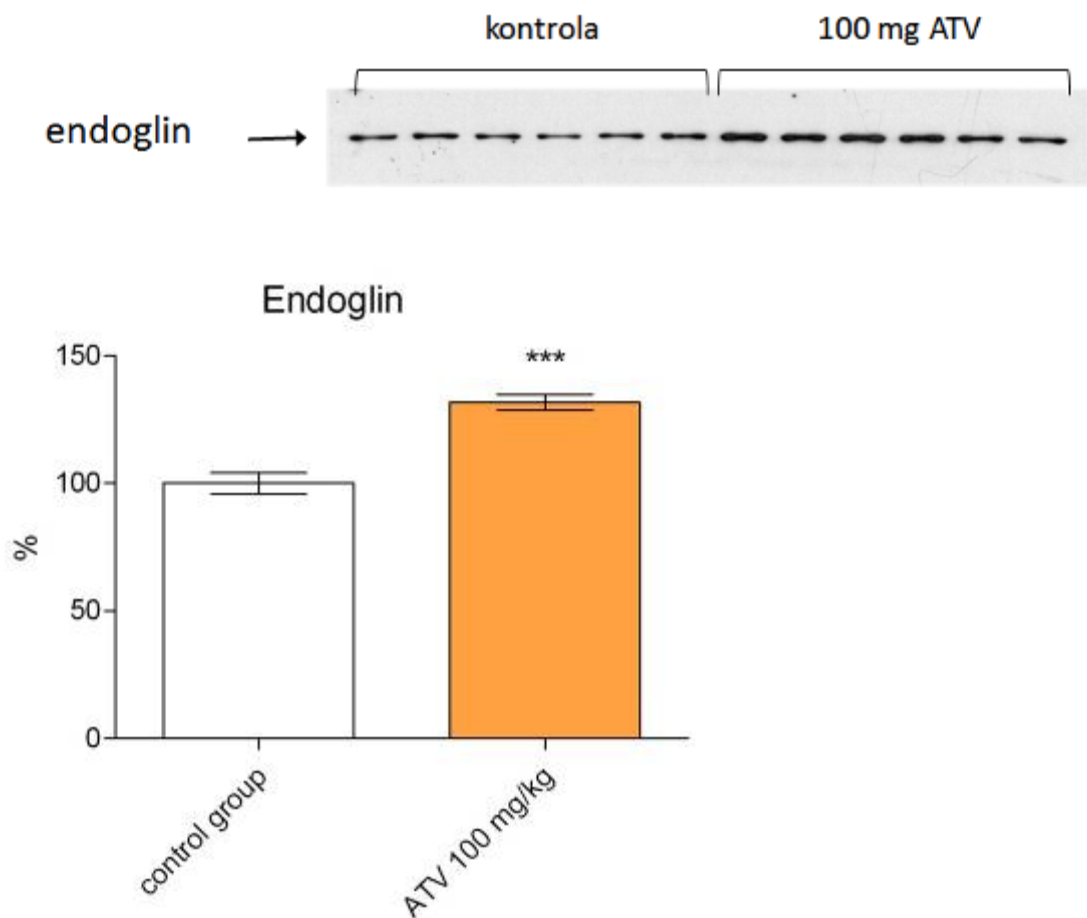


5.3. WESTERN BLOT ANALÝZA

5.3.1. Western blot analýza exprese endoglinu

Western blot analýza exprese endoglinu měla za cíl prokázat celkovou expresi endoglinu ve stěně hrudní a břišní aorty. Výsledky prokázaly statisticky významný nárůst exprese endoglinu po podávání atorvastatinu ve srovnání s kontrolní skupinou. (Obr. 12)

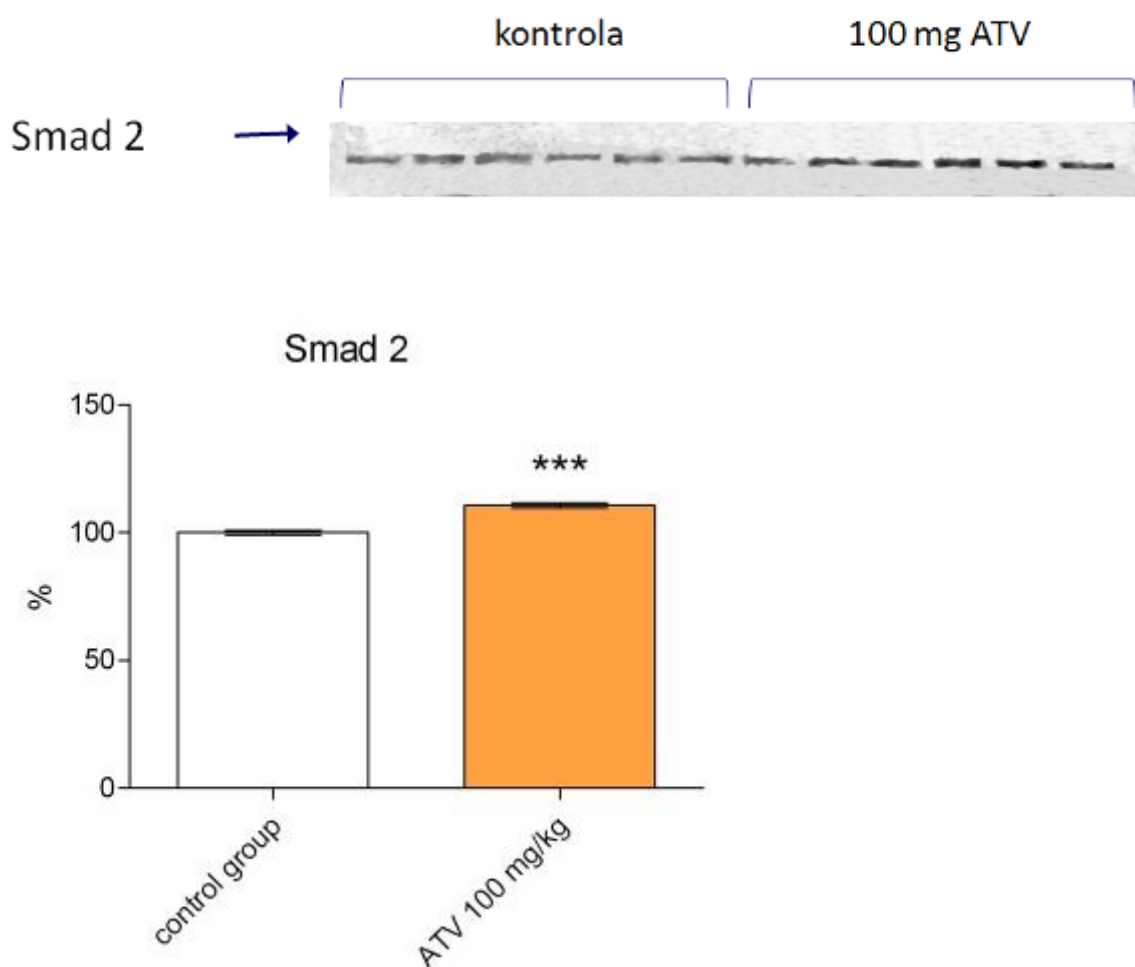
*Obr.12. Western blot analýza exprese endoglinu v oblasti hrudní a břišní aorty u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Výsledky ukazují na statisticky významné zvýšení exprese endoglinu u skupiny, které byl podáván atorvastatin ve srovnání s kontrolní skupinou *** $p < 0.001$.*



5.3.2. Western blot analýza exprese SMAD 2

Western blot analýza exprese SMAD 2 měla za cíl prokázat celkovou expresi SMAD 2 ve stěně hrudní a břišní aorty. Výsledky prokázaly statisticky významný nárůst exprese SMAD 2 po podávání atorvastatinu ve srovnání s kontrolní skupinou. (Obr. 13)

*Obr.13. Western blot analýza exprese SMAD 2 v oblasti hrudní a břišní aorty u kontrolní a atorvastatinové skupiny. Výsledky ukazují na statisticky významný nárůst exprese SMAD 2 u skupiny, které byl podáván atorvastatin ve srovnání s kontrolní skupinou $**p < 0.01$.*



6. 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.

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 (Arnaud & Mach 2005). Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (Paigen et al 1987).

Ačkoli se tento model nejprve 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 myši, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohadu, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myši jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v genu pro apolipoproteinu E (apoE) (Nakashima et al 1994). ApoE apoproteiny 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 myši 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 subklaviálních arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech diety. 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 (Hofker & Breuer 1998).

ApoE/LDL receptor deficientní myši vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu, již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik (Ishibashi et al 1994).

CD 105 endoglin je homodimerní transmembránový protein o velikosti 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. Toto ovlivnění by se mohlo uskutečnit prostřednictvím rodiny intracelulárních proteinů tzv. SMAD proteinů. Bylo prokázáno, že zejména SMAD 2 protein je zahrnut v reakci endoglinu během zánětlivé reakce (Santibanez et al 2007). Z tohoto důvodu jsme sledovali expresi obou těchto markerů v aterosklerotických plátech ApoE/LDL receptor deficientních myší. Imunohistochemická analýza prokázala expresi obou markerů na cévním endotelu přičemž SMAD 2 byl také ještě exprimován v aterosklerotických plátech. Podávání atorvastatinu vedlo kromě výrazně hypolipidemického efektu k nárůstu exprese jak endoglinu tak SMAD 2 ve stěně cévy. Tyto výsledky jsou v souladu s *in vitro* studii, které byly nedávno publikovány, kde takové zvýšení exprese endoglinu a SMAD 2 vedlo ke zvýšení exprese endoteliální NO syntázy (eNOS), což je základní protektivní molekula pro cévní endotel, její exprese má silně antiaterogenní význam (Santibanez et al 2007).

7. ZÁVĚR

Výsledky této rigorózní práce prokázaly expresi endoglinu a SMAD 2 v aterosklerotických plátech v cévní stěně u apoE/LDLR deficientního myšního modelu aterosklerózy.

Prvním sledovaným markerem byl endoglin, kde jsme chtěli popsat jeho lokalizaci v oblasti aortálního oblouku u použitého experimentálního modelu. Tento potenciálně nový faktor zasahuje do regulace funkcí významného antiaterogenního faktoru TGF- β a změny jeho exprese by tak mohly hrát roli v procesu aterogeneze. Exprese endoglinu byla lokalizována na cévním endotelu, a to jak v aortě, tak i v menších cévách a kapilárách okolního myokardu.

SMAD 2 jako signální protein kaskády, která je spouštěna endoglinem byl exprimován v celém aterosklerotickém plátu, přičemž jeho exprese byla pozorována také na cévním endotelu v plátu i mimo něj.

Podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg/den vedlo k výraznému hypolipidemickému efektu.

Western blot analýza prokázala nárůst exprese jak endoglinu tak SMAD 2 ve stěně cévy.

Tyto výsledky naznačují, že endoglin a SMAD 2 mohou být potenciálním cílem účinku atorvastatinu a zároveň proteiny působící antiaterogenně.

8. ABSTRAKT

Ateroskleróza, neboli „kornatění tepen“ je degenerativním onemocněním cév. Ateroskleróza se někdy označuje jako „nemoc 20. století“.

Dvojnásobně knokautované myši (apoE/LDL – receptor double – knockout) reprezentují nový model pro studium aterogeneze, který je schopen rozvinout závažný stupeň hyperlipidémie a aterosklerózy.

Statiny (nebo-li kompetitivní inhibitory 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A-reduktázy) patří v současné době mezi nejúčinnější a celosvětově nejpoužívanější hypolipidemika s příznivými účinky na hladiny sérových lipidů i na celkovou a kardiovaskulární mortalitu. Snižují především hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu.

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit a popsat expresi endoglinu a SMAD 2 v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficičních myší. Dále jsme chtěli zjistit, jak jsou tyto proteiny ovlivněny podáváním atorvastatinu.

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Výsledky biochemické analýzy prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu mělo výrazně hypolipidemický efekt.

Dále byla prokázána exprese endoglinu na cévním endotelu, a to jak v aortě, tak i v menších cévách a kapilárách okolního myokardu. SMAD 2 exprese byla detekována v celém aterosklerotickém plátu, přičemž jeho exprese byla pozorována také na cévním endotelu v plátu i mimo něj.

Western blot analýza prokázala nárůst exprese jak endoglinu tak SMAD 2 ve stěně cévy po podávání atorvastatinu.

Tyto výsledky naznačují, že endoglin a SMAD 2 mohou být potenciálním cílem účinku atorvastatinu a zároveň proteiny působící antiaterogenně.

9. ABSTRACT

Atherosclerosis, or sclerosis of arteries, is a degenerative disease of arteries. Sometimes it is called „the disease of 20th century“.

ApoE/LDL – receptor double knockout mice represent a new animal model for study of atherogenesis, which is characterized by severe hyperlipidaemia and atherosclerosis.

Statins (or competitive inhibitors 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-coenzym A-reductase) currently belong to the most efficient and the most useful hypolipidemic drugs for all over the world. They decrease mainly levels of total cholesterol and LDL cholesterol.

The aim of this rigorous thesis was to describe the expression of endoglin and SMAD 2 in atherosclerotic plaques in apoE/LDL-receptor deficient mice. Moreover we wanted to determine the effect of atorvastatin treatment on the expression of both endoglin and SMAD 2.

ApoE/LDLR-deficient mice on were subdivided into 2 groups. The control group of animals was fed with the western type diet. The same atherogenic diet was used in ATV group, where atorvastatin was added to the atherogenic diet at the dosage of 100 mg/kg per day.

The results of this thesis confirmed the expression of endoglin and SMAD 2 in atherosclerotic lesions in ApoE/LDLR-deficient mice. The expression of endoglin was located on the aortic vascular endothelium and in other smaller vessels and capillaries of surrounding myocardium. SMAD 2 expression was visible in whole atherosclerotic lesion (intima, and endothelium). Atorvastatin treatment resulted in a strong hypolipidemic effect.

In addition western blot analysis showed significant increase of the expression of both endoglin and SMAD 2 after atorvastatin treatment.

These results indicate that endoglin and SMAD 2 could be potencial target of atorvastatin effect and suggesting these proteins could have antiatherogenic properties.

10. LITERATURA

- AHMED, M., GRIFFITHS, P. (2004) Statins and secondary prevention of coronary heart disease. *British Journal of Community Nursing* 9: 160-5
- ARNAUD, C., MACH, F. (2005) Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98: 661-6
- 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: 1033-8
- 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: B72-8
- BOURDEAU, A., FAUGHNAN, M. E., LETARTE, M. (2000) Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med* 10: 279-85
- BOYLE, J. J. (2005) Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 63-8
- 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: 1809-19
- 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: 1617-31

COMPARATO, C., ALTANA, C., BELLOSTA, S., BAETTA, R., PAOLETTI, R., CORSINI, A. (2001) Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11: 328-43

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: 21-8

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: 323-35

CORSINI, A., RAITERI, M., SOMA, M. R., BERNINI, F., FUMAGALLI, R., PAOLETTI, R. (1995) Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Am J Cardiol* 76: 21A-28A

CZURIGA, I., EDES, I. (2006) [Lowering cholesterol: how low is low enough?]. *Orv Hetil* 147: 1349-56

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: 2234-40

DUFF, S. E., LI, C., GARLAND, J. M., KUMAR, S. (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 17: 984-92

- DURIEZ, P. (2003) [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie* 58: 5-14
- 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: 614-23
- HOFKER, M. H., BREUER, M. (1998) Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 110: 63-78
- 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: 1031-3
- ISHIBASHI, S., HERZ, J., MAEDA, N., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4431-5
- JANG, Y., LINCOFF, A. M., PLOW, E. F., TOPOL, E. J. (1994) Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24: 1591-601
- JERKIC, M., RIVAS-ELENA, J. V., PRIETO, M., CARRON, R., SANZ-RODRIGUEZ, F., PEREZ-BARRIOCANAL, F., RODRIGUEZ-BARBERO, A., BERNABEU, C., LOPEZ-NOVOA, J. M. (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* 18: 609-11
- KEANEY, J. F., JR. (2000) Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 21: 99-166

- LAROSA, J. C. (2001) Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. *Am J Cardiol* 88: 291-3
- 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: 2910-3
- 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: 33011-9
- MALLAT, Z., GOJOVA, A., MARCHIOL-FOURNIGAULT, C., ESPOSITO, B., KAMATE, C., Merval, R., FraDELIZI, D., TEDGUI, A. (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89: 930-4
- MANGGE, H., HUBMANN, H., PILZ, S., SCHAUENSTEIN, K., RENNER, W., MARZ, W. (2004) Beyond cholesterol--inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 42: 467-74
- MCGILL, H. C., JR., MCMAHAN, C. A., ZIESKE, A. W., MALCOM, G. T., TRACY, R. E., STRONG, J. P. (2001) Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation* 103: 1546-50
- MEHTA, J. L. (2003) Pleiotropic effects of statins: how important are they in the prevention of vascular disease? *Endothelium* 10: 3-4
- MORI, S., SAITO, Y. (2002) [Pleiotropic effects of statins]. *Nippon Rinsho* 60: 875-81

- 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: 529-38
- NAKASHIMA, Y., PLUMP, A. S., RAINES, E. W., BRESLOW, J. L., ROSS, R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 133-40
- NILSSON, J. (2005) Regulating protective immunity in atherosclerosis. *Circ Res* 96: 395-7
- 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: 301-10
- PAIGEN, B., MORROW, A., HOLMES, P. A., MITCHELL, D., WILLIAMS, R. A. (1987) Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68: 231-40
- PIAO, M., TOKUNAGA, O. (2006) Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study. *J Atheroscler Thromb* 13: 82-9
- RIUS, C., SMITH, J. D., ALMENDRO, N., LANGA, C., BOTELLA, L. M., MARCHUK, D. A., VARY, C. P., BERNABEU, C. (1998) Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 92: 4677-90

- ROSS, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26
- SACKS, F. M., TONKIN, A. M., SHEPHERD, J., BRAUNWALD, E., COBBE, S., HAWKINS, C. M., KEECH, A., PACKARD, C., SIMES, J., BYINGTON, R., FURBERG, C. D. (2000) Effect of pravastatin on coronary disease events in subgroups defined by coronary risk factors: the Prospective Pravastatin Pooling Project. *Circulation* 102: 1893-900
- SANTIBANEZ, J. F., LETAMENDIA, A., PEREZ-BARRIOCANAL, F., SILVESTRI, C., SAURA, M., VARY, C. P., LOPEZ-NOVOA, J. M., ATTISANO, L., BERNABEU, C. (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210: 456-68
- SEMENKOVICH, C. F., HEINECKE, J. W. (1997) The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes* 46: 327-34
- SHANTARAM, V. (1999) Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 21: 69-77
- SMITH, S. C., JR. (1997) The challenge of risk reduction therapy for cardiovascular disease. *Am Fam Physician* 55: 491-500
- STARY, H. C. (1989) Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9: 119-32
- STARY, H. C., CHANDLER, A. B., GLAGOV, S., GUYTON, J. R., INSULL, W., JR., ROSENFELD, M. E., SCHAFFER, S. A., SCHWARTZ, C. J., WAGNER, W. D., WISSELER, R. W. (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14: 840-56

- STEBBENS, W. E. (2002) The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses* 58: 359-60
- STRUTT, K., CAPLAN, R., HUTCHISON, H., DANE, A., BLASETTO, J. (2004) More Western hypercholesterolemic patients achieve Japan Atherosclerosis Society LDL-C goals with rosuvastatin therapy than with atorvastatin, pravastatin, or simvastatin therapy. *Circ J* 68: 107-13
- TONOLO, G., BRIZZI, P., MELIS, M. G., SECCHI, G., MAIOLI, M. (2003) About the pleiotropic effects of statins in human. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1234
- TOPORSIAN, M., GROS, R., KABIR, M. G., VERA, S., GOVINDARAJU, K., EIDELMAN, D. H., HUSAIN, M., LETARTE, M. (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96: 684-92
- TROSTDORF, F., BUCHKREMER, M., HARMJANZ, A., KABLAU, M., JANDER, S., GEIGER, K., SCHMITZ-RIXEN, T., STEINMETZ, H., SITZER, M. (2005) Fibrous cap thickness and smooth muscle cell apoptosis in high-grade carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29: 528-35
- VAN LAAKE, L. W., VAN DEN DRIESCHE, S., POST, S., FEIJEN, A., JANSEN, M. A., DRIESSENS, M. H., MAGER, J. J., SNIJDER, R. J., WESTERMANN, C. J., DOEVENDANS, P. A., VAN ECHELD, C. J., TEN DIJKE, P., ARTHUR, H. M., GOUMANS, M. J., LEBRIN, F., MUMMERY, C. L. (2006) Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation* 114: 2288-97
- 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
- WANG, Q. (2005) Molecular genetics of coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 20: 182-8

- 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: 561-7
- YUAN, C., ZHANG, S. X., POLISSAR, N. L., ECHELARD, D., ORTIZ, G., DAVIS, J. W., ELLINGTON, E., FERGUSON, M. S., HATSUKAMI, T. S. (2002) Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation* 105: 181-5
- ZHANG, H., SHAW, A. R., MAK, A., LETARTE, M. (1996) Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol* 156: 564-73