Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

Význam transformujícího růstového faktoru beta 1 a endoglinu v aterogenezi

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2010 Kateřina Šumberová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal/a, řádně cituji.”

datum *podpis*

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce PhDr. Zdeňce Kudláčkové, Ph. D. za podporu, cenné rady a čas strávený konzultacemi a úpravami diplomové práce.

Abstrakt

Autor: Kateřina Šumberová
Název: Význam transformujícího růstového faktoru beta 1 a endoglinu v aterogenezi
Diplomová práce
Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Studijní obor: Farmacie

Cíl: Cílem této diplomové práce je rešerše dostupných odborných poznatků o ateroskleróze, TGF – β_1 (transformačním růstovém faktoru beta 1) a endoglinu a jejich roli v aterogenezi.

Hlavní poznatky: TGF – β_1 podporuje stabilitu aterosklerotického plátu, působí protizánětlivě a zabraňuje tak rozvoji a progresi aterosklerózy. TGF – β_1 zároveň však omezuje regenerační schopnost endotelu, snižuje produkci vazodilatačních látek a naopak podporuje tvorbu vazokonstriktorů v cévní stěně. TGF – β_1 podporuje vznik a rozvoj hypertenze, což přispívá k rychlejší aterogenezi. Endoglin je transmembránový protein, tvoří součást receptoru pro TGF - β a reguluje jeho signalizaci. Podle aktuálních poznatků se uvažuje o antiaterogenním působení endoglinu na cévní endotel.

Závěry: Tyto výsledky naznačují, že role TGF – β_1 a endoglinu v aterogenezi zůstává stále nejednoznačná. Pro určení přesných mechanismů a významů TGF - β_1 a endoglinu v rozvoji a progresi aterosklerózy je nutný další výzkum.

KLÍČOVÁ SLOVA: Ateroskleróza, TGF – β_1, endoglin

Abstract

Author: Kateřina Šumberová
Title of diploma thesis: Význam transformujícího růstového faktoru beta 1 a endoglinu v aterogenezi
Diplomová práce
Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Field: Pharmacy

Background: Objective of this diploma thesis is background research using available knowledge about atherosclerosis, TGF – β_1 **(**Transforming growth factor – β_1) and endoglin and about their roles in atherogenesis.

Main findings: TGF – β_1 promotes atherosclerotic plaque stability, acts as antiinflammatory agent and prevents from development and progression of atherosclerosis. However, at the same time TGF – β_1 restricts endothelial regeneration, lowers production of vasodilators whereas TGF – β_1 promotes production of vasoconstrictors in blood vessel wall. TGF – β_1 supports initiation and progression of hypertension contributing to more progressive atherogenesis. Endoglin is a transmembrane protein, a component of the TGF – β receptor komplex and modulates its signalisation. According to recent studies is considered antiatherogenic action of endoglin to blood-vessel endothelium.

Conclusions: These results demonstrate that the role of TGF – β_1 and endoglin in atherogenesis remains still unclear. Further investigation is neccesary for determination of exact mechanisms and roles of TGF - β_1 and endoglin in development and progression of atherosclerosis.

KEY WORDS : Atherosclerosis, TGF – β_1, endoglin

Abstrakt 4
Abstract 5
1 Úvod a cíl práce 8
2 Ateroskleróza 10
2.1 Endoteliální dysfunkce 10
2.1.1 Funkční význam cévního endotelu 11
2.1.2 Vazoregulace 12
2.1.3 Vazoaktivní látky uvolňované endotelem 12
2.1.4 Podíl endotelu na regulaci rovnováhy mezi trombogenezí a fibrinolýzou 15
2.1.5 Vliv endotelu na imunitní systém 15
2.1.6 Angioneogeneze a reparační pochody 16
2.1.7 Vznik aterosklerotické léze 16
2.2 Zánět jako součást jednotlivých fází aterosklerózy 18
2.3 Rizikové faktory aterosklerózy 22
2.3.1 Vliv kouření na rozvoj a progresi aterosklerózy 23
2.3.2 Význam obezity v rozvoji aterosklerózy 24
2.3.3 Ateroskleróza u pacientů s diabetem mellitem 25
2.3.4 Význam cholesterolu v aterogenezi 27
2.3.5 Role oxidovaných LDL částic v patogenezi aterosklerózy 29
2.3.6 Vliv hodnoty HDL – cholesterolu na aterogenezi 29
2.3.7 Oxysteroly v etiologii aterosklerózy 30
2.4 Klinické hodnocení funkce endotelu 31
2.4.1 Detekce preklinické aterosklerózy 31
2.5 Biomarkery aterosklerózy 38
2.5.1 Kardiomarkery zánětlivé fáze aterotrombózy 39
2.5.2 Kardiomarkery destabilizace aterosklerotického plátu 40
2.5.3 Kardiomarkery ischemie myokardu 42
3 Transformační růstový faktor β1 a endoglin 44
3.1 TGF - β1 44
3.1.1 Struktura 45
3.1.2 Funkce TGF - β 50
3.1.3 Role TGF - β v imunitním systém 52
3.1.4 Význam TGF - β v rozvoji nádorových onemocnění 53

3.1.5 Role TGF - β ve fibrogenezi 55
3.1.6 Genová mutace receptoru pro TGF - β vedoucí k Marfanovu syndromu ... 56
3.2 Endoglin 58
3.2.1 Struktura endoglinu 59
3.2.2 Funkce endoglinu 62
3.2.3 Buněčná signalizace endoglinu a TGF - β 63
4 Význam TGF – β_1 a endoglinu v aterogenezi 70
4.1 TGF - β a stabilita aterosklerotického plátu 71
4.2 TGF - β_1, zánět, imunomodulace a ovlivnění aterosklerózy 73
4.3 Vliv TGF – β_1 na vývoj kardiovaskulárního systému a stimulaci hypertenze 74
4.4 Aktivace TGF - β_1 a jeho suprese v aterosklerotických lézích 75
4.5 Podávání statinů a jejich vliv na TGF - β a endoglin 76
5 Diskuse 79
6 Závěr 81
7 Literatura 82
8 Seznam použitých zkratek 90
9 Přílohy 93

1 Úvod a cíl práce

Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění cévní stěny. Její komplikace bývají nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. Jedná se o dlouhodobý proces charakterizovaný nahromaděním lipidů v cévní stěně, zánětlivou infiltrací a nárůstem fibrózní tkáně v lumén cévy. Na rozvoji aterosklerotické léze se vždy spolupodílí aterogenní lipoproteiny, dysfunkce endotelu a zánětlivá reakce v cévní stěně. Vlastní podstatou aterosklerotického procesu je fibrózně proliferativní zánět vznikající na základě mnoha spolupůsobících faktorů ovlivňujících endotel a hladkosvalové buňky cévní stěny. Fibroproliferativního zánětu se účastní monocytomakrofágový systém a lymfocyty, cévní endotel a hladké svalové buňky medie. Významnou roli v aterogenezi hraje řada látkových faktorů, různé typy cytokinů, růstové faktory a látky s vazoregulační aktivitou [77].

V současné době známe mnoho rizikových faktorů ovlivňujících aterogenezi, řadíme k nim hypercholesterolémii, diabetes mellitus, arteriální hypertenzi, obezitu, kouření cigaret, sedavý způsob života, hyperfibrinogenémii, mužské pohlaví, věk a předčasný výskyt aterosklerózy v rodinné anamnéze. Poměr LDL a HDL - cholesterolu, označovaný jako index aterogenity, umožňuje stanovit prognózu a riziko vzniku onemocnění.

Dnes je předmětem vědeckého výzkumu je vyhledávání vhodných biomarkerů, jejichž výskyt nebo změny hladin v organismu by pomohly včas odkrýt onemocnění ještě před jeho klinickou manifestací. V posledních letech bylo objeveno mnoho nových markerů jednotlivých stádií aterosklerózy - tj. fáze zánětu, fáze destabilizace plátu, ischemie a nekrózy myokardu a následně remodelace levé komory srdeční [58]. Současný vědecký výzkum se také zaměřuje na objasňování biochemických kroků jednotlivých fází aterogeneze. Značná pozornost je věnována funkci jednotlivých působků, které se v těchto stádiích patogeneze aterosklerózy uplatňují.

Cílem této diplomové práce bylo provést rešerši dostupné odborné literatury zabývající se danou problematikou a více specifikovat roli endoglinu a TGF – β_1 v aterogenezi. Role TGF – β_1 a endoglinu je v mnoha patologických procesecech velmi dobře objasněna, jejich význam a mechanismus působení v rozvoji aterosklerózy zůstává však v mnohém stále nejasný.

TGF - β (transforming growth factor beta; transformační růstový faktor beta) je důležitou skupinou růstových faktorů. Reguluje mnoho buněčných procesů, jako např. proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Dalším z jeho hlavních účinků stimulace

fibrogeneze. Jedná se o negativní regulátory buněčné transkripce, dělí se na 2 velké podrodiny TGF - α a TGF - β. U savců se TGF - β rodina vyskytuje ve třech izoformách jako TGF - β_1, TGF-β_2 a TGF-β_3. TGF - β_1 má zásadní roli ve vývoji, fyziologických i patologických procesech vaskulárního systému.

Endoglin je transmembránový glykoprotein, nachází se na povrchu buněk, kde je součástí receptorového komplexu TGF - β a ovlivňuje jeho signalizaci. Je klíčový pro signalizaci TGF - β_1 v buňkách endotelu.

Diplomová práce má 4 hlavní části. První část diplomové práce se věnuje současnému pojetí aterosklerózy. Popisuje vliv endotelu a jím produkovaných vazoaktivních látek na průběh aterogeneze. V textu jsou zmíněny rizikové faktory a možnosti jejich ovlivnění. Dále jsou uvedeny aktuálně používané metody k hodnocení funkce cévního endotelu a nové biomarkery aterosklerózy. Druhá část této práce se zabývá strukturou a funkcí TGF – β_1. Podrobněji je rozebrán význam TGF – β_1 v regulaci imunitního systému a nádorových onemocnění, dále charaktika jeho fibrogenních vlastností a vliv na vznik onemocnění zv. Marfanův syndrom. Následující kapitola popisuje endoglin, jeho strukturu, funkci a účast v buněčné signalizaci TGF - β. Poslední část rešeršní diplomové práce se věnuje shrnutí rolí TGF – β_1 a endoglinu v aterogenezi. Je zde charakterizována jejich role a jejich vliv na fyziologické a patologické procesy kardiovaskulárního systému. Součástí práce je rovněž i kapitola přiblížující význam TGF – β_1 a endoglinu v zánětlivých procesech ovlivňujících aterogenezi, vliv na stabilitu aterosklerotického plátu a možné ovlivnění TGF - β_1 a endoglinu hypolipidemickou léčbou.

2 Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění charakterizované degenerativním postižením cévní stěny, způsobené nahromaděním lipidů, zánětlivou infiltrací a zmnožením fibrózní tkáně v cévní stěně. Počáteční stadia aterosklerózy vznikají na základě zvýšeného prostupováním aterogenních lipoproteinů a zánětlivých buněk z krve přes endoteliální výstelku a jejich akumulací v subendoteliálním prostoru. Na zvýšenou depozici lipidů a zánětlivou infiltraci cévní stěny reagují v dalších fázích aterogeneze, fibroproduktivní a degenerativní procesy. Na rozvoji aterosklerotické léze se vždy současně podílejí aterogenní lipoproteiny, dysfunkce endotelu a zánětlivé mechanizmy. V různých situacích se podíl těchto složek liší; všechny tyto činitelé jsou navíc ve vzájemných složitých interakcích a navzájem se podporují.

Ateroskleróza je podmíněna remodelací cévní stěny, hlavní roli v tomto procesu hrají remodelace svaloviny medie, změny endotelu a následující tepenná trombóza nasedající na zúžení. Aterosklerotický proces zahrnuje nejprve tvorbu lipoidních proužků, pak fibro-lipoidních lézí a fibrózních plátů, které předchází a provází zánětlivý proces cévní stěny [77].

Ateroskléroza je onemocnění známé více jak 3500 let. Poprvé bylo objeveno na egyptských mumiích a stejné patologické rysy aterosklerotický změněných cév jsou pozorovány do dnes [54].

2.1 Endoteliální dysfunkce

První stádium aterosklerózy bývá označováno jako endoteliální dysfunkce. Jedná se o poruchu funkce endotelu vedoucí ke zvýšení propustnosti cévní stěny a se vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními mechanismy a hemokoagulačními působky. Důsledkem této dysharmonie převažují v cévách vazokonstrikční, protrombotické a aterogenní mechanismy K nejčastějším příčinám vzniku dysfunkce endotelu patří dyslipidémie, arteriální hypertenze, inzulínová rezistence a hyperglykémie a kouření - tedy velmi dobře známé rizikové faktory všech kardiovaskulárních onemocnění. Pokud u pacienta nalézáme tyto a další rizika je rozvoj endoteliální dysfunkce velmi pravděpodobný [57].

2.1.1 Funkční význam cévního endotelu

Endotel je významným orgánem, který u člověka o hmotnosti 70 kg pokrývá až 700 m^2 a váží 1 – 1,5 kg. Je představován vrstvou buněk vystýlající vnitřní povrch cév, kryje srdeční chlopně a řadu tělesných dutin [57].

Zdravý endotel má mnoho fyziologických funkcí. Funguje jako hlavní regulátor cévní homeostáze. Podílí se na udržování permeability, vazoregulace - udržuje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí. Zasahuje do zánětlivých a imunitních dějů organismu, účastní se oxidace LDL, reparačních pochodů a angiogeneze. Endotel reguluje inhibici a stimulaci migrace a proliferaci hladkosvalových buněk, ovlivňuje také trombogenezi a fibrinolýzu. Pokud dojde k narušení rovnováhy, projeví se ED (endoteliální dysfunkce), způsobující dále narušení cévní stěny [30].

Endotel leží na rozhraní krve a ostatních vrstev cévní stěny. Je tedy v přímém kontaktu s krví a se všemi látkami, které jsou unášeny krevním řečištěm, jako např. hormony, lipoproteiny, cytokiny, bílkoviny krevního srážení. Permeabilita endotelu je řízena oběma směry. Semipermeabilní membrána využívá k přenosu paracelulární i transcelulární transportní mechanismy. Díky vazoadhezivním molekulám (ICAM, VCAM) a selektinům se uskutečňuje transfer monocytů a lymfocytů, vody, elektrolytů, živin a aktivních substancí léčiva z makromolekul zejména proteinů a lipoproteinů. K transcelulárnímu přenosu přes mezibuněčné spoje může docházet vlivem krevního tlaku a vazoaktivních látek (např. histamin při zánětu) [56].

Endotel je jednovrstevná výstelka cév, tvoří selektivní bariéru pro různé molekuly a buňky. Některé endoteliální produkty působí antagonisticky, a proto je za fyziologických podmínek udržována rovnováha mezi těmito látkami [57].

Působením rizikových faktorů dochází k posunu rovnováhy směrem k aterogenezi. Dochází ke zvýšení permeability pro řadu molekul, např. včetně cytoadhezivních molekul, dochází k prokoagulačnímu stavu. Tento stav se nazývá endoteliální dysfunkce.

Vlivem dysfunkce endotelu dochází obvykle v místech s nízkým smykovým napětím k rozvoji a nárůstu aterosklerotického plátu. Vznikají zcela nové pláty, již vzniklé pláty progredují. Zlepšení funkce endotelu lze dosáhnout kontrolou arteriální hypertenze, ukončením kouření, hypolipidemiky apod.

2.1.2 Vazoregulace

Endotel reguluje vazodilataci a vazokonstrikci a tím zajišťuje optimální krevní průtok tkání. Vazoregulace je umožněna syntézou, aktivací a degradací vazoaktivních působků, dále pak také uspořádáním endotelu po směru toku krve. Na povrchu endotelu dochází k navázání různých substrátů. Pokud není funkce endotelu narušena, vede uvolnění serotoninu či acetylcholinu k tvorbě NO (oxidu dusnatého) nebo prostacyklinu, což vyvolá vazodilataci. V dysfunkčním endotelu dochází vlivem těchto podnětů k vazokonstrikci a snadněji dochází ke spuštění koagulační krevní kaskády. Při fyziologické funkci endotelu navozuje vazodilataci také krevní tok a to jako adaptační mechanismus při fyzické zátěži [30].

2.1.3 Vazoaktivní látky uvolňované endotelem

Endotel produkuje vazoaktivní látky, čímž zajišťuje udržení cévního tonu. Hlavním vazodilatátorem produkovaným endotelem je NO, původně označovaný jako EDRF (endothelium-derived relaxing factor; endotelem uvolňovaný relaxační faktor). Dalšími od endotelu derivovanými vazodilatačními látkami jsou prostacyklin a bradykinin. Prostacyklin účinkuje synergicky s NO – inhibuje agregaci trombocytů. Bradykinin podporuje uvolňování NO, prostacyklinu, a EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor; endotelem uvolňovaný hyperpolarizační faktor. Bradykinin také stimuluje produkci t - PA (tissue plasminogen activator; tkáňový aktivátor plazminogenu), který hraje důležitou roli v procesu fibrinolýzy. Endotel produkuje také vazokonstrikční působky, jako endotelin (nejmohutnější endogenní vazokonstriktor) a angiotensin II. Angiotensin II účinkuje jako vazokonstriktor, podporuje tvorbu endotelinu a současně funguje také jako prooxidant. Endotelin a angiotensin II stimulují proliferaci buněk hladké svaloviny cév a podílejí se tak na vzniku aterosklerotických lézí. Aktivované makrofágy a hladkosvalové buňky, charakteristické buněčné komponenty aterosklerotických lézí, produkují velké množství endotelinu [56].

2.1.3.1 NO - Oxid dusnatý

V roce 1998 obdrželi doktoři Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro a Ferid Murad Nobelovu cenu ve fyziologii a lékařství za objev signální molekuly NO (nitric oxyde; oxid dusnatý) v kardiovaskulárním systému. Dříve byl také nazýván jako EDRF (endothelium-derived relaxing factor; endotelem uvolňovaný relaxační faktor). NO působí

vazodilatačně, inhibuje adhezi a agregaci trombocytů, zamezuje proliferativním procesům v cévní stěně svým protizánětlivým působením [56].

Jedná se o lipofilní molekulu, která snadno a rychle difunduje přes membrány. Z chemického hlediska je NO nestabilní volný radikál, jeho poločas rozpadu trvá jen několik sekund, přesto je schopen při svém šíření z místa zdroje ovlivnit okolní tkáň až do vzdálenosti 170 nm [55].

NO vzniká přeměnou L - argininu pomocí enzymu NOS (Nitric oxide synthese; NO syntáza), na jejíž aktivitě tvorba vazodilatátoru závisí. K správnému fungování NOS je potřeba řada kofaktorů - FAD (flavindinukleotid), FMD (flavinmononukleotid), BH[4] (tetrahydropterin), NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; nukleotidreduktáza) a kalmodulin. Vlastní relaxace nastává potom, co vzniklý NO difunduje do hladkosvalových buněk, kde dochází k aktivaci enzymu guanylát cyklázy a přeměně GTP (guanosine 5' - triphosphate; guanosin 5' - trifosfát) na cGMP (cyclic 3´,5´- guanosine monophosphate; cyklický 3´,5´- guanosin monofosfát). Hemoglobin inaktivuje NO. NO působí vazodilatačně, inhibuje adhezi a agregaci trombocytů, zamezuje proliferativním procesům v cévní stěně protizánětlivým působením. Vzestup intracelulární koncentrace Ca^{2+} vyvolaný působením acetylcholinu, bradykininu nebo vlivem střižného napětí na membránu endotelu podnítí tvorbu NOS.

V lidském těle se tvoří 3 izoformy NO syntázy. Typ I - nNOS je lokalizovaná v neuronech a podílí se na neurotransmisi, typ II - iNOS je přítomna v makrofázích a buňkách imunitního systému a typ III - eNOS v buňkách endotelu. Aktivita nNOS a eNOS je zprostředkována látkami, které zvyšují intracelulární koncentraci Ca^{2+}, acetylcholinem a bradykininem. Typ II - iNOS je aktivována cytokiny nebo endotoxiny a uplatňuje se v boji s infekcí a nádorovými buňkami. NO syntáza a tím také tvorba NO je inhibována různými faktory – např. vysokou hladinou aterogenních lipidů, hypertenzí, kouřením, hyperglykemií, oxidativním stresem, vlastním aterosklerotickým postižením, asymetrickým dimetylargininem (jehož hladina bývá zvýšená u diabetiků, u nemocných s renálním selháním a hypercholesterolémií), vysokou hladinou homocysteinu a hemoglobinu [55].

K dalším funkcím NO kromě cévní vazodilatace patří inhibice adheze trombocytů, bránění nadměrnému hromadění leukocytů ve vrstvě subendotelu, snížení permeability pro aterogenní makromolekuly (LDL, fibrinogen a myocyty z médie), apoptóza endoteliálních buněk.

2.1.3.2 Prostacyklin PGI

Prostacyklin je derivátem kyseliny arachidonové, zesiluje působení NO a účinkuje jako antagonista tromboxanu. Je uvolňovaný při tkáňové hypoxii, zvýšeným průtokem krve a řadou působků. Prostacyklin zvyšuje hladinu cAMP (cyclic 3´,5´- adenosine monophosphate; cyklický 3´,5´- adenosin monofosfát) v buňkách hladké svaloviny a v trombocytech. Působí tedy nejen relaxačně, ale především ovlivňuje patologicky zvýšenou aktivitu trombocytů. Tromboxan vzniká v krevních destičkách. Rovnováha mezi tromboxanem a prostacyklinem udržuje lokální agregaci trombocytů a následnou tvorbu sraženiny, zabraňuje nadměrnému rozsahu sraženiny a udržuje kolem ní průtok krve. Prostacyklin působí ve tkáních i v cirkulaci několik málo minut [51].

2.1.3.3 Endotelin

Endoteliny ET - 1, ET - 2, ET - 3 jsou tři podobné polypeptidy skládající se z 21 AK. Po narození se podílejí na uzávěru ductus arteriosus. Syntézu ET - 1 stimuluje trombin, oxidovaný LDL, bradykinin, angiotensin II a střižné napětí (neboli shear stress). Jeho základní rolí je vazokonstrikce, dále pak proliferace myocytů v srdečním svalu a v cévní stěně, modulace účinku neurohumorálních regulačních mechanismů. V neporušených cévách působí bimodálně. Vazokonstrikce je zmírněna současnou stimulací NO a PGI [51], až v případě poškození endotelu se projeví plná vazokonstrikce. ET - 2 je tvořen především ve střevě a ledvinách, ET - 3 mimo jiné i v mozku.

2.1.3.4 Složky renin - angiotenzinového systému

Na povrchu endotelu se nachází ACE (angiotensin konvertující enzym), který přeměňuje neaktivní angiotensin I na angiotensin II podílející se na vazokonstrikci. Angiotensin II (hlavní produkt renin-angiotensinového systému RAAS), působí jako vazokonstriktor, navozuje hypertenzi a přispívá k rozvoji aterogeneze stimulací proliferace hladkosvalových buněk cév. Váže se na specifický receptor (AT - 1), čímž dochází k uvolnění RONS (Reactive oxygen and nitrogen species; reaktivní formy kyslíku a dusíku) ve stěnách arteriálních buněk. Oxidační stres vyvolává adhezi a následně aktivaci monocytů. Cestou superoxidového aniontu je stimulována tvorba ICAM -1 a VCAM - 1 v endotelových buňkách. Dochází k aktivaci PLC (phospholipase C; fosfolipáza C), k nárůstu koncentrace intracelulárního Ca^{2+} a nakonec ke kontrakci hladké svaloviny. Narůstá také proteosyntéza a hladká svalovina stěny cév hypertrofuje. Receptor angiotensinu II také ovlivňuje aktivitu

lipooxygenázy v buňkách hladkého svalu, podporuje zánět a lipoperoxidaci LDL částic, exprimuje receptor pro oxLDL – LOX receptor. Angiotensin II prostřednictvím aktivace svého receptoru AT-1 podporuje aterogenezi ve všech stádiích vývoje aterosklerotické léze [72].

2.1.4 Podíl endotelu na regulaci rovnováhy mezi trombogenezí a fibrinolýzou

Endotel reguluje rovnováhu mezi koagulací krve a fibrinolýzou. Jeho povrch je dokonale nesmáčivý vzhledem k negativnímu elektrostatickému náboji a tvorbě vazodilatačních působků. Při poškození endotelu odkryté místo přijímá von Willebrandův faktor a vyvolává adhezi trombocytů. Při stagnaci krve k tomuto ději nedochází a přilnutí trombocytů je minimální. Dochází k aktivaci destiček a jejich degranulaci, mimo jiné s uvolněním tromboxanu A.

Vyvolané strukturní změny za pomoci fibrinogenu způsobují vzájemné nasedání krevních destiček a urychlení koagulační kaskády. Vytváří se tak destičková zátka, která obnoví integritu cévy a později se stane zátkou fibrinovou, přeměnou z rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Funkční stav endotelu, vedle hemokoagulačního a fibrinolytického systému, rozhoduje o tom, zda fibrinová zátka povede k uzavření lumen cévy. Neporušený endotel stabilizuje trombus blokádou fosfolipázy C, produkcí prostacyklinu a NO. V dysfunkčním endotelu naopak převažuje produkce serotoninu a TX(A) [37] a dochází k vazospasmu. Aktivní složkou fibrinolýzy je plazmin rozkládající fibrin a fibrinogen. Plazmin snižuje plazmatické hladiny trombin, čímž zabraňuje trombóze.

2.1.5 Vliv endotelu na imunitní systém

Mezi fyziologické funkce endotelu patří inhibice adheze leukocytů, čímž znemožňuje spuštění zánětlivé reakce a poškození cévy. Neutrofily jako první migrují do místa začínajícího zánětu. Nejdříve musí překonat hemodynamické síly, dostat se na okraj krevního toku, kde jsou unášeny po endotelu [55]. Dále se přichytí k endotelu a prostupují přes bazální membránu do místa tkáňového poškození. Leukocyty a endotel jsou aktivovány působením zánětlivých mediátorů – např. TNF - α, IL - 1, IL - 6 a dalších.

Endotel má na svém povrchu receptory pro mnoho cytokinů, což způsobuje, že může přijímat signály z imunitního systému pro spuštění produkce vazoaktivních látek či regulátorů

homeostázy. Endotel tvoří tedy i významnou část imunitního systému jako sekretor, fungující v mnohých směrech jako makrofág [76].

2.1.6 Angioneogeneze a reparační pochody

Důležitou roli v procesu aterogeneze hraje proliferace hladké svaloviny. Podnětem pro proliferaci bývají TGF - β, fibroblastový a destičkový růstový faktor, interleukin - 1 a endotelin - 1. Buňky hladké svaloviny migrují do subendoteliálního prostoru, čímž dochází k hyperplazii intimy a hypertrofii cévní stěny. Významným inhibitorem tohoto děje je vazodilatátor NO [76].

Novotvorba kapilár či větších cév probíhá na základě impulzů k vytvoření kolaterály a jeho zachycení endotelem větší tepny. Jedním z podnětů pro angioneogenezi je jistě ischemie. Při bujení vzniká endotelový pupen, který díky enzymové sekreci rozrušuje okolní extracelulární matrix a prodírá si tak cestu k dané cévě. U cév většího průměru se vytváří lumen.

V reparačních pochodech je kontrola zajišťována řadou cytokinů uvolňovaných endotelem, makrofágy, trombocyty a myocyty.

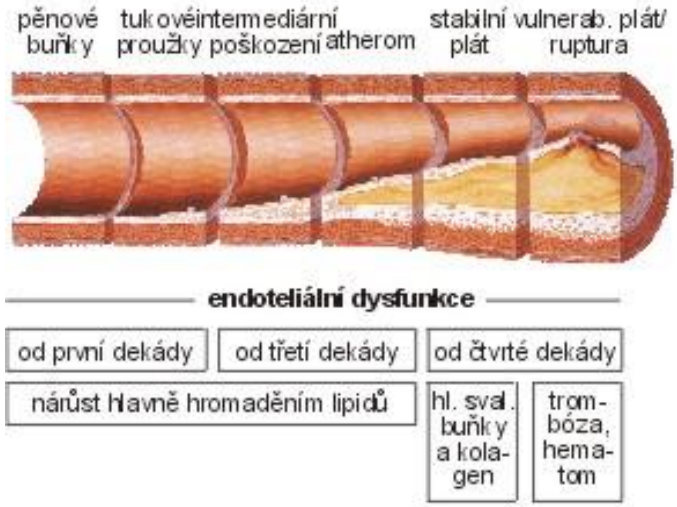
2.1.7 Vznik aterosklerotické léze

Mechanizmus aterosklerózy není dosud plně objasněn. Nejrozšířenější je tzv. response - to - injury teorie. Předpokládá se, že endoteliální dysfunkce navodí zánět s následnou fibroproliferací cévy. Cirkulující monocyty přestupují do intimy, kde pohlcují cholesterol a mění se v pěnové buňky. Tyto makrofágy vytvářejí množství působků, z nichž některé mohou endotel poškozovat, některé působí jako růstové faktory a stimulují hladké svalové buňky k proliferaci.

Místa vzniku aterosklerotických lézí jsou předvídatelná. Typický výskyt plátů bývá v místech bifurkací, zakřivení tepen a tam, kde dochází k rychlým změnám toku krevního proudu. Turbulence také napomáhá aterogenezi.

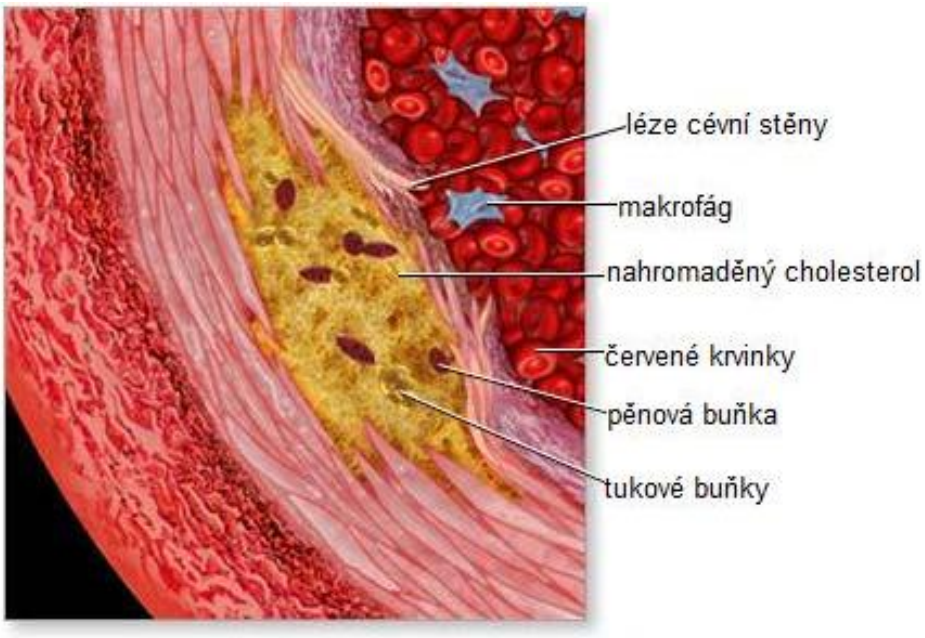
Ateroskleróza může postihovat tepny mozku, srdce, ledvin, dalších orgánů a také končetin [76].

Obrázek č. 1 Endoteliální dysfunkce [74]



Nejdříve detekovatelné aterosklerotické léze jsou lipoidní proužky. Tvoří je seskupení makrofágů bohatých na lipidy a T - lymfocyty uvnitř intimy. Lipoidní proužky vznikají již v dětském věku. Lze je pozorovat na koronárním řečišti u poloviny dětí již ve věku 10 - 14 let. Lipoidní proužky jsou stádiem ještě reverzibilním, mohou vymizet nebo dále narůstat do fibromuskulárních lézí či fibrózních plátů. Postupem času dochází v cévách k difuznímu ztluštění intimy [54]. Průchod tepnou nebývá zcela uzavřený, na histologickém nálezu je však patrné zmnožení hladkosvalových buněk a vaziva v intimě. Fibrózní pláty částečně ucpávají cévní lumen a způsobují jejich bělavé zabarvení. Stádium fibrózních plátů nalézáme již u mladých pacientů, pláty jsou složeny z vrstvy hladkého svalstva, obsahují cholesterol, makrofágy, pěnové buňky, často aktivované T - lymfocyty a zbytněné vazivo. Tyto léze již mohou výrazně ovlivnit průtok krve. Rozvojem fibrózních plátů vznikají pak komplexní léze – tzn. fibrózní pláty komplikované trombózou, krvácením nebo kalcifikací.

Obrázek č. 2 Aterosklerotická léze [80]



Vlastní podstatou aterosklerotického procesu je fibrózně proliferativní zánět vznikající na základě mnoha spolupůsobících faktorů na endotel a hladkosvalové buňky cévní stěny. Na fibroproliferativním zánětu spolupůsobí klasické složky zánětlivé reakce - monocytomakrofágový systém a lymfocyty, dále pak cévní endotel a hladké svalové buňky medie, z látkových faktorů pak různé typy cytokinů, růstové faktory a látky s vazoregulační aktivitou [72].

2.2 Zánět jako součást jednotlivých fází aterosklerózy

Zánět je součástí všech fází rozvoje aterosklerózy, od endotelové dysfunkce až po stádium nestabilního aterosklerotického plátu. Endotel, makrofágy i tuková tkáň jsou místem vzniku cytoadhezivních molekul a prozánětlivých cytokinů. CRP (C reactive protein; C reaktivní protein) je ukazatelem mírného systémového zánětu. V 80. letech 20. století byl poprvé CRP identifikován ve sklerotických plátech intimy aorty. Tato bílkovina odráží nejen aktivitu zánětu v aterosklerotickém plátu, ale souvisí i s expresí adhezivních molekul a chemokinů v buňkách cévního endotelu. Koncentrace CRP v plazmě se při ateroskleróze pohybuje v rozmezí 0,5 – 10 mg/l [84].

Infiltrace subendoteliálního prostoru leukocyty hraje v procesu aterogeneze důležitou úlohu. Leukocyty jsou podkladem pro vznik pěnových buněk, zhoršují endoteliální dysfunkci,

vytvářejí a udržují zánětlivou infiltraci plátu a ovlivňují myointimální proliferaci. Podílejí se také na vzniku akutních aterotrombotických komplikací - v určité fázi vzniku aterosklerotického plátu produkují proteolytické enzymy. Tyto enzymy rozrušují aterosklerotický plát, narušují jeho stabilitu a zvyšují riziko jeho ruptury. Aterogenní lipoproteiny a četné mediátory parakrinně i apokrinně působící ovlivňují leukocytární migraci endotelelem.

Nejdříve leukocyty adherují k endotelovým buňkám. Leukocytární adheze a transendoteliální migrace bílých krvinek je zprostředkována interakcí mezi endoteliálními a leukocytárními cytoadhezivními molekulami – jako např. E - a P - selektin, ICAM – 1 (inter - cellular adhesion molecule; mezibuněčné adhezivní molekula) a PECAM (platelet endothelial cell adhesion molekule; destičková adhezivní molekula) na buňkách endotelu a L - selektin, ICAM - 1 a integriny na leukocytech. Dosud se předpokládalo, že celý tento proces je regulován především díky adhezivním molekulám endotelu. Novější práce však nasvědčují tomu, že se na tomto procesu významně podílí též modulace exprese cytoadhezivních molekul na leukocytech. Makrofágy v subendoteliálním prostoru vychytávají nativní i modifikované LDL – částice. Vychytávání nativních LDL - částic makrofágy zprostředkovává LDL - receptor, celý proces podléhá zpětnovazebné regulaci. Jakmile makrofágy nahromadí přiměřené množství cholesterolu, vycestují do cirkulace. Vychytávání oxidovaných LDL - částic probíhá přes scavengerové receptory, které významnější zpětnovazebné regulaci nepodléhají. Pokud se tyto částice vyskytují ve větší míře, jsou proto v makrofázích akumulovány v nadbytku. Makrofágy s nadbytkem cholesterolu již nejsou schopny migrace do krevní cirkulace a zůstávají spolu s akumulovaným cholesterolem v subendoteliálním prostoru, kde se mění na tzv. pěnové buňky. Pěnové buňky jsou základem pro vznik lipidového jádra budoucího aterosklerotického plátu. Makrofágy a pěnové buňky také zdrojem cytokinů, které fungují jako chemoatraktanty pro další monocyty a T - lymfocyty. V prostoru subendotelu se tak udržuje a prohlubuje zánět a progreduje aterosklerotický plát [56].

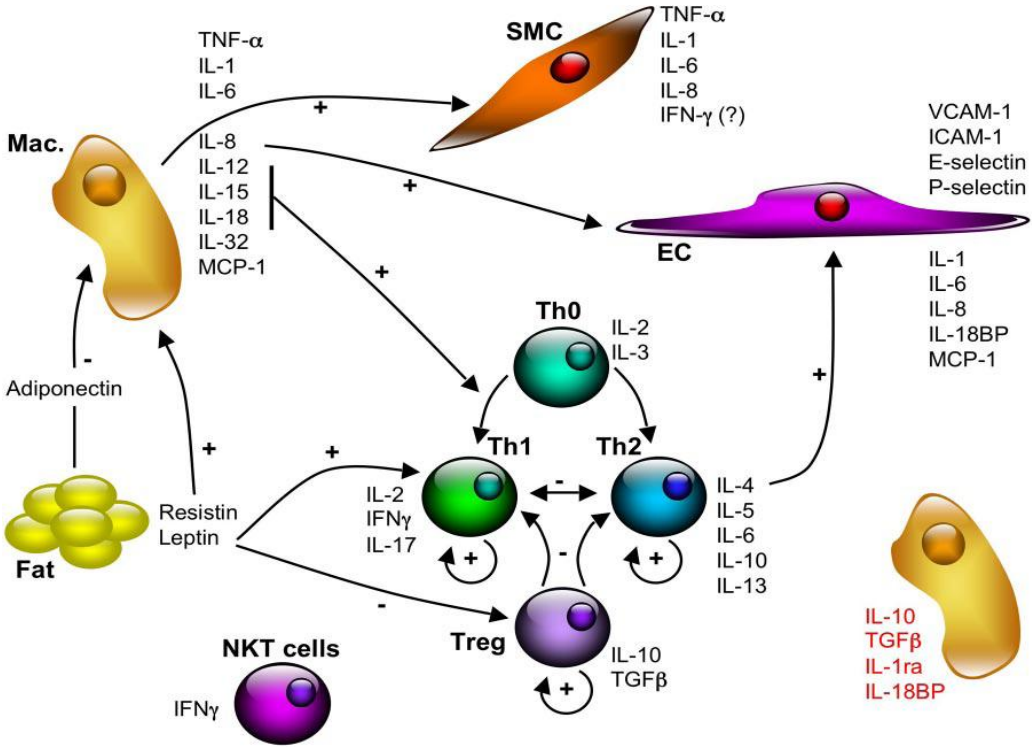
Zánětlivé buňky produkují další mediátory prohlubující endoteliální dysfunkci a usnadňující průnik dalších LDL - částic do subendoteliálního prostoru. Kromě toho se také samy podílejí na oxidaci LDL - částic. Mediátory pěnových buněk spolu s oxidovanými LDL - částicemi vyvolávají migraci VSMC (vascular smooth muscle cells; hladkosvalové cévní buňky) z medie do subendoteliálních vrstev, jejich proliferaci a nakonec transformaci v sekreční buňky tvořící kolagen. Z transformovaných VSMC a okolní extracelulární matrix se tak nad lipidovým jádrem plátu vytváří fibrózní kryt [54].

Cytokiny (mediátory zánětu a imunitních reakcí) vyvolávají buněčnou proliferaci a chemotaxi buněk. Cytokiny a růstové faktory často účinkují společně a někdy je nemožné jeden od druhého oddělit. V procesu aterogeneze působí některé z mediátorů jako regulátory zánětu i růstu. Růstové regulační molekuly mohou vyvolat mnoho různých, někdy i zdánlivě protichůdných účinků. Velké množství proliferačních látek účinkují současně jako chemoatraktanty.

Mezi nejvýznamnější proliferační faktory buněk patří: PDGF (Platelet - derived growth factor; destičkový růstový faktor), bFGF (basic fibroblast growth factor; základní fibroblastový růstový faktor), HB - EGF (heparin vázající epidermální růstový faktor podobný růstovému faktoru), IGF-1 (insulin – like growth factor; inzulínu podobný růstový faktor), IL - 1 (interleukin 1), TNF - α (tumor necrosis factor alfa; faktor nekrotizující tumory alfa), TGF – β (transforming growth factor beta; transformující růstový faktor beta). Některé z růstových faktorů účinkují jako mitogeny, zároveň způsobují i chemoatrakci, jež je velmi důležitá při rozvoji aterosklerotických lézí. Chemotaxe účinkuje i na vzniku restenóz po angioplastikách a po aortokoronárním by - passu. Je nezbytná pro vniknutí leukocytů do stěny artérie, dále se podílí na vniknutí hladkosvalových buněk medie dointimy arterie. Chemotaxi monocytů a transmigraci endotelem indukují tyto faktory: CSFs (colony stimulating factors; kolonie stimulující faktory), MCPO 1 (monocyte chemotactic protein; monocytový chemotaktický protein), oxLDL (oxidized low-density lipoprotein; oxidované LDL), TGF - β (transforming growth factor beta; transformující růstový faktor beta). Chemotaxi hladkosvalových buněk medie pak indukují PDGF a IGF - 1. Základní fibroblastový růstový faktor přítomný v cytosolu většiny buněk se také nachází v bazální membráně, je uvolňován v důsledku buněčného poškození. Jedná se o silný mitogen a chemoatraktant pro endotel a mitogenem pro hladké svalstvo medie. Cytokiny IL - 1, TNF - α, IFN - γ a IL - 2 spolu s CSFs jsou modulátory zánětlivé odpovědi, ke které dochází tehdy, když byl endotel vystaven účinku faktorů poškození. Všechny tyto faktory ovlivňují aterogenezi společně, žádný z nich nepůsobí izolovaně. V důsledku síťovitého uspořádání buněčných interakcí vede uvolnění jedné molekuly k expresi dalších molekul v cílové buňce. Tak pak může dále působit parakrinně nasousední buňky sousední, nebo autokrinně uvnitř dané buňky.

Monocyty/makrofágy jsou přítomny ve všech stadiích aterogeneze. Makrofágy nefungují jen jako APB – antigen prezentující buňky pro T - lymfocyty, ale jsou také scavengerovou buňkou odstraňující cizorodý materiál a dále buňkou produkující růstové faktory a cytokiny.

Obrázek č. 3 Cytokiny v aterogenezi [66]



Vedoucí faktory ovlivňující imunitní děje v procesu aterogeneze jsou oxLDL (oxidované lipoproteiny), HSP (heat shock proteins), PC (phosphorylcholine), apoptotické působky, aj. Mohou indukovat jak Th1, tak Th2 buněčné odpovědi. Zrání APC (antigen presenting cell; antigen prezentující buňka) je nezbytné pro funkci T - buněk. Signalizační cesta CD40/CD40L je klíčová pro diferenciaci Th1. Interleukiny IL - 6 a IL - 13 přispívají k indukci Th2 buněčného typu. Oba IFN - γ (Th1) a IL-4 (Th2) podporují aterogenezi. Produkce IL - 5 Th2 buňkami je důležitá pro o produkci protilátek B lymfocyty. Produkce IL - 2 patogenními Th1buňkami je zásadní pro udržení těchto Treg část na periferii. Ostatní Treg buňky nemohou exprimovat Foxp3 a jsou zvláště indukovány na periferii jako odpověď na antigenní stimulaci. Oba typy Treg buněk využívají IL - 10 a/nebo TGF - β k potlačení proliferační T – buněčné aktivity in vivo. IL - 6, produkovaný jako odpověď na TLR stimulaci, přispívá k potlačení funkce Treg.

Makrofág představuje v ateromatozním plátu základní buňku zánětlivého procesu. Makrofágy internalizují oxidované částice LDL dvojím způsobem: jednak přes receptory pro oxLDL, jednak přes své scavengerové receptory. Samy mohou oxidovat LDL několika cestami včetně cesty lipooxygenázové. Během tohoto procesu procházejí mastné kyseliny peroxidačním procesem, jehož produkty jsou různé aldehydy s krátkým řetězcem, ketony a další látky, které se stávají kovalentně vázané na apo-LDL - částice. OxLDL vedou ke stimulaci produkce cytokinů a růstových faktorů makrofágem. Makrofágy jsou tedy nejen

buněčné elementy významné pro odstraňování cizorodých látek (scavengerový účinek), ale současně mají velmi významnou roli ve fibroproliferativním procesu zejména díky schopnosti produkovat řadu růstových faktorů, zejména PDGF, IL - 1 a TNF - α. Což může vyvolat sekundární expresi genu pro PDGF v buňkách hladkého svalstva tepny a v endotelech [76].

Tímto mechanismem dochází zřejmě k akceleraci aterosklerózy v koronárních arteriích u některých pacientů po transplantaci srdce. Na rozdíl od embryonálního původu endotelu, který je zřejmě odvozen od embryonální vaskulatury, která invadovala orgány, buňky hladkých svalů tepen jsou v průběhu embryogeneze pravděpodobně odvozeny lokálně a to z parenchymu jednotlivých orgánů. Buňky hladkých svalů jednotlivých arterií se od sebe mohou lišit, z čehož vyplývá, že mohou také různě odpovídat na různé noxy.

Na základě distribuce myosinových filament a množství proteosyntetických struktur (drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát) se rozlišují dva fenotypy hladkých svalových buněk: kontraktilní a sekreční. Buňky kontraktilního fenotypu jsou schopny odpovídat na vazoaktivní látky (katecholaminy, endotelin, PGE, PGI2, neuropeptidy, leukotrieny a NO). Oproti tomu hladké svalové buňky syntetického resp. sekrečního fenotypou produkují růstové faktory a cytokiny (VEGF, bFGF, TGF - β, IL - 1, TNF - α) a samy jsou schopné reagovat na různé růstové faktory syntézou příslušných receptorů a tvořit extracelulární matrix. Trombocyty se účastní zejména na rozvoji komplikací aterosklerózy tepennou trombózou, jednak produkcí faktorů PD - ECGF, EGF/TGF - α a TGF - β, které stimulují endotelové buňky a jednak aktivací koagulační kaskády a tvorbou trombu.

2.3 Rizikové faktory aterosklerózy

Mezi rizikové faktory aterosklerózy řadíme hypercholesterolémii, diabetes mellitus, arteriální hypertenzi, obezitu, kouření cigaret, sedavý způsob života, hyperfibrinogenémii, typ osobnosti A, mužské pohlaví, věk a předčasný výskyt aterosklerózy v rodinné anamnéze. Podstatná část těchto faktorů je ovlivnitelná, řada z nich je jednoznačně spojena s látkovou přeměnou a výživou. Za významný rizikový faktor aterosklerózy se považuje hyperinzulinismus - zvýšená plazmatická hladina bazálního a zvláště pak stimulovaného inzulinu. Hyperinzulinismus má přímý vztah k obezitě a k hypertenzi. Zcela jistě patří do jeho kontextu i celkový přívod energie. Pravděpodobně je spoluodpovědný za zvýšenou oxidaci LDL [65].

2.3.1 Vliv kouření na rozvoj a progresi aterosklerózy

Kouření patří k nejovlivnitelnějším rizikovým faktorům aterosklerózy vůbec. Tabákový kouř je obsahuje přes 4000 plynných (92%) i hmotných (8%) látek. Obsahuje 64 kancerogenů, z nichž 11 je prokázaných lidských kancerogenů, 6 pravděpodobných a 46 možných lidských kancerogenů, např. dibenzantracen, benz[a]pyren, dimetylnitrosamin, dietylnitrosamin, metylnitrosamino-butanon, nitrosonornikotin, vinylchlorid, hydrazin, arzén. Další látky obsažené v tabákovém kouři jsou mutageny, alergeny, toxické látky. Nezanedbatelný je i vysoký obsah oxidu uhelnatého (běžně 5 - 10% COHb u kuřáků), který má afinitu k hemoglobinu vyšší než kyslík, který vytěsňuje. Krev kuřáků pak přenáší méně kyslíku. Velmi silní kuřáci (2 krabičky cigaret denně) mohou mít sníženou schopnost krve přenášet kyslík až o 15 procent. Cigarety s nižším obsahem dehtů mohou sice nepatrně snížit riziko např. epidermoidní rakoviny plic, ale riziko KVO (kardiovaskulárních onemocnění) zůstává stejné. Kouření je příčinou zhruba každého pátého úmrtí na kardiovaskulární onemocnění, což představuje v České republice každoročně 15 000 úmrtí. Vzhledem k tomu, že vztah dávky cigaretového kouře a účinku není u aterosklerózy tak výrazný jako u nádorových onemocnění, tedy k poškození kardiovaskulárního systému stačí i malá dávka, je podstatný i vliv pasivního kouření. Ročně umírají v ČR v důsledku pasivního kouření řádově stovky nekuřáků (extrapolace údajů z USA). Jsou to především úmrtí na KVO a na rakovinu plic u nekuřáků [82].

Kouření se podílí na vzniku aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění, působí endoteliální dysfunkci. Podle současných představ je endoteliální dysfunkce prvním z dějů, jejichž výsledkem je manifestní aterosklerotický plát. Souvislá endoteliální vrstva se pod vlivem tabákového kouře mění v „síto“. Tato změna morfologie je provázena i celou řadou funkčních změn vedoucích k endoteliální dysfunkci. Podle současných představ je endoteliální dysfunkce prvním z dějů, jejichž výsledkem je aterosklerotická léze. Nikotin, účinná látka cigaretového kouře, na niž vzniká závislost, usnadňuje uvolňování řady vazoaktivních látek – jako např. katecholaminů, acetylcholinu, serotoninu, vasopresinu, aj. Naopak se snižuje uvoňování NO. Kouření snižuje hladinu HDL - cholesterolu a zároveň přispívá k nárůstu TAG a LDL - částic [27]. Kouření negativně ovlivňuje proces hemokoagulace. Zvyšuje se agregabilita trombocytů, stoupá hladina fibrinogenu, zvyšuje se produkce PAI - I a řady dalších prokoagulačně působících cytokinů. Dochází tak vychýlení rovnováhy mezi prokoagulačními a antikoagulačními mechanizmy.

Hodnotíme-li celkové kardiovaskulární riziko pacienta, kuřáctví spojené s jednotlivými rizikovými faktory se nesčítá, ale násobí. Kuřák s hypercholesterolemií má riziko akutního infarktu myokardu 6krát vyšší než zdravý nekuřák. Bude-li zmíněný pacient mít současně arteriální hypertenzi, bude jeho riziko již šestnáctkrát vyšší [27].

2.3.2 Význam obezity v rozvoji aterosklerózy

Obezita bývá považována za epidemii 21. století, způsobuje mnoho vážných zdravotních a psychických problémů. Obezita je podle klinických studií nejvýznamnějším ovlivnitelným rizikovým faktorem rozvoje diabetu mellitu 2. typu. Množství tělesného tuku bezprostředně ovlivňuje úmrtnost na kardiovaskulární, nádorové a další onemocnění. Konkrétní patofyziologické děje vysvětlující vztahy mezi tukovou tkání a zvýšenou morbiditou a mortalitou, nejsou dosud uspokojivě objasněny [51].

Tukové buňky – adipocyty jsou však v přiměřeném množství, lokalizaci a kvalitě pro naše zdraví nezbytné. Ostatní tkáně lidského organizmu nejsou přizpůsobeny k ukládání energetických přebytků a i malé množství lipidů uložených mimo tukovou tkáň působí dysfunkci či apoptózu takto postižených buněk [61]. U pacientů s lipoatrofií, u kterých se tuková tkáň v organismu vůbec nevytvořila, dochází k rozvoji diabetu mellitu, co jen dokazuje nepostradatelnost funkční tukové tkáně.

Tuková tkáň je aktivním sekrečním orgánem. Do cirkulace uvolňuje volné mastné kyseliny a mnoho endokrinně aktivních látek – tzv. adipokinů neboli adipocytokinů. Některé účinkují parakrinně, působí lokálně na adipocyty a další buňky přítomné v tukové tkáni (makrofágy, fibroblasty, endotelie). Většina adipokinů je však uvolňována do cirkulace a ovlivňuje vzdálené cílové orgány (svalové buňky, játra, mozek, endotel). Dnes známe několik desítek adipocytokinů s různými účinky – podílejí se na regulaci intermediárního metabolizmu, inzulinové senzitivity, aterogeneze, imunitních reakcí, hemokoagulaci, angiogenezi, aj. K nejvýznamnějším adipokinům patří leptin, adiponektin, visutin, vaspin, rezistin, cytokiny a chemokiny jako např. interleukiny, TNF - α [4].

Leptin se významně podílí na regulaci tělesné hmotnosti, ovlivňuje centrum sytosti v hypotalamu a působí snížení příjmu potravy a současně stimuluje energetický výdej. Nemocní s mutovaným genem pro leptin nebo leptinový receptor se fenotypicky manifestují obezitou, dyslipidemií a inzulinovou rezistencí.

Je pravděpodobné, že tuková tkáň u obézních i viscerální tuk u nemocných s nadváhou a normální hmotností se podílí na patogenezi metabolického syndromu a jeho komplikací.

Tuková tkáň vysvětluje také spojitost mezi obezitou a hypertenzí. Především angiotenzinogen je působkem adipocytů, který se přímo podílí na hypertenzi a na rozvoji následného orgánového postižení.

Ovlivnění receptorů PPAR – γ v tukové tkáni (tzv. inzulinovými senzitizéry) rovněž ovlivňuje i krevní tlak zejména v experimentu. Aterogenita a koagulační poruchy vázané na obezitu souvisí zejména s uvolňováním inhibitoru aktivace plazminogenu a interleukinů v tukové tkáni. Tuková tkáň obézního pacienta vydává do krevního oběhu vyšší množství tukových látek než u štíhlého. Účinek hodnoty BMI na krevní lipidy je částečně překryt efektem redistribuce tělesného tuku. Centrální uložení tuku je těsně svázáno s vysokou koncentrací triglyceridů a sníženou hladinou HDL – cholesterolu v plazmě nalačno [50]. V plazmě obézních pacientů a nemocných s inzulinovou rezistencí jsou přítomny některé cytokiny ve zvýšeném množství, např. IL - 6, TNF - α a IL - 1. Přispívají tak k navození prozánětlivého stavu organizmu a tím k rozvoji onemocnění spojovaných s obezitou – zejména aterosklerózy a diabetu mellitu 2. typu. Tuková tkáň je složena z mnoha druhů buněk - endotelií, fibroblastů, nediferencovaných adipocytů a imunokompetentních buňek (především makrofágů, které během rozvoje obezity osidlují tukovou tkáň ve zvýšené míře). IL - 6 je prozánětlivý cytokin produkovaný imunitními buňkami, fibroblasty, buňkami endotelu, myocyty a dalšími typy buněk. Na celkové koncentraci IL - 6 v plazmě se za fyziologických podmínek podílí produkce v tukové tkáně cca 30 % a koncentrace. IL - 6 v plazmě i jeho produkce tukovou tkání je pozitivně asociována s parametry inzulinové rezistence. V lidské tukové tkáni má IL - 6 lipolytický efekt s následným zvýšením koncentrace volných mastných kyselin v cirkulaci. IL - 6 je během těžké fyzické zátěže ve značném množství produkován svalovou tkání a zprostředkovává důležitý tok informací od pracujícího svalu směrem k tukové tkáni, kde je působením IL - 6 umocněna lipolýza a tím přísun volných mastných kyselin k pokrytí energetických potřeb myocytu. TNF - α vyvolává na zvířecím modelu a in vitro inzulinovou rezistenci, což vede ke zvýšení hladiny volných mastných kyselin. Z klinického hlediska je povzbudivé, že plazmatické hladiny IL - 6 i TNF - α stejně jako jejich produkci tukovou tkání lze ovlivnit dietou a dostatečným pohybovým režimem, které jsou doporučované k redukci tělesné hmotnosti [59].

2.3.3 Ateroskleróza u pacientů s diabetem mellitem

Onemocnění diabetes mellitus předčasně iniciuje a akceleruje aterosklerózu a zvyšuje tak kardiovaskulární morbiditu a mortalitu. Vyšší prevalence aterosklerózy u diabetiků je

asociována s hyperglykemií, inzulinovou rezistencí a dyslipoproteinemií. Diabetes je pravděpodobně jednou z nejvíce aterogenních složek metabolického syndromu. Progrese aterosklerózy u pacientů s diabetem a vyšší riziko trombotických komplikací je podmíněno průvodní dyslipidemií, endoteliální dysfunkcí, zvýšenou agregabilitou destiček, porušením fibrinolytické rovnováhy a poruchou krevního proudu. Diabetici mají výrazný prospěch z léčby hypolipidemiky. Pro pacienty s diabetem je specifická glykace proteinů, včetně proteinů cévní stěny.

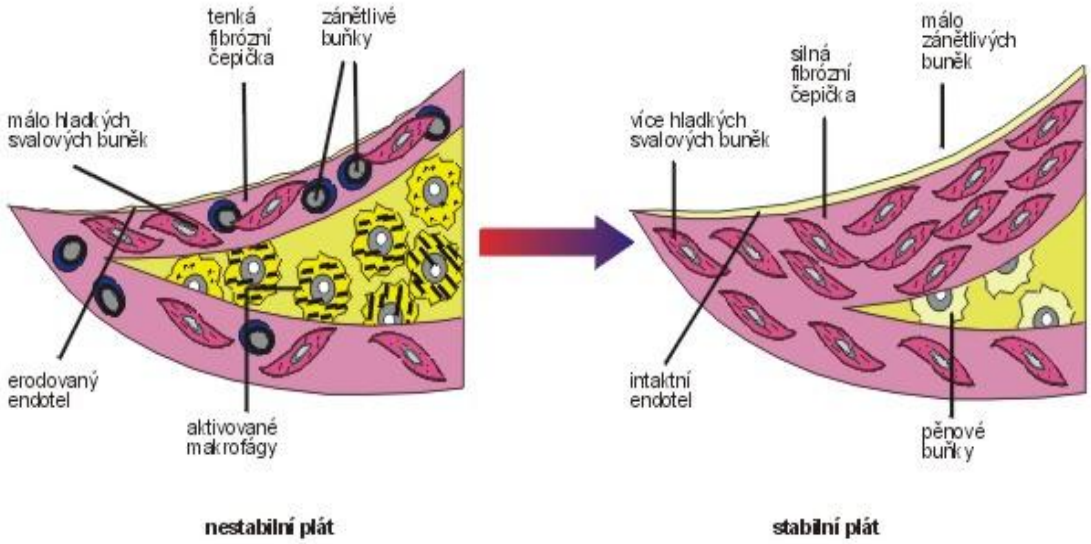
Studie CARDS 2 zabývající se podáním atorvastatinu u diabetiků byla dokonce z etických důvodů předčasně ukončena pro výrazný klinický profit z této léčby vůči placebu [75]. Chronická hyperglykemie vede k dysfunkci endotelu a hladkosvalových buněk cév Dochází k poškození funkce trombocytů a k poruchám koagulace.

Dysfunkce endotelu je spojena se sníženou produkcí NO, který je hlavním vazodilatačním působkem a také tlumí aktivaci destiček, snižuje adhezi leukocytů na endotel a jejich migraci přes cévní stěnu a rovněž inhibuje proliferaci buněk hladkých svalů cévní stěny. Hyperglykemie blokuje aktivaci endoteliální NOS. Dále zvyšuje tvorbu volných kyslíkových radikálů, především superoxidového aniontu, který ovlivňuje funkci zbytkové eNOS. Inzulinová rezistence, která je součástí metabolického syndromu DM, vede k nadměrnému uvolňování volných mastných kyselin tukové tkáně, inhibuje enzymatickou kaskádu eNOS a zvyšuje tvorbu volných kyslíkových radikálů, a tak rovněž tlumí tvorbu NO.

Vytvářené peroxidy poškozují syntézu dalšího prostacyklinu, který působí projektivně na cévní stěnu. Naopak u diabetiků dochází ke zvýšené tvorbě řady vazokonstrikčních látek, zejména endotelinu 1, který mimo jiné stimuluje systém renin – angiotensin a podporuje hypertrofii hladkého svalstva cévní stěny a podílí se na rozvoji hypertenze. Součástí aterogeneze je migrace T – lymfocytů a monocytů do cévní intimy, kde uvolňují cytokiny nebo fagocytují oxLDL, a tak iniciují počátek aterosklerotických lézí a DM tyto patologické pochody urychluje. U pacientů s diabetem bývá narušena stabilita aterosklerotického plátu díky vyšší produkci cytokinů v endoteliích, které snižují syntézu kolagenu v hladkosvalových buňkách cévní stěny a zvýšenou tvorbou matricových enzymů odbourávajících kolagen. Kolagen, který zajišťuje mechanickou stabilitu fibrinové čepičky aterosklerotického plátu, je více odbouráván a jeho syntéza je narušena, což vede k nestabilitě plátu a podpoře tvorby trombů. Dalším okruhem podpory aterogeneze u DM je aktivace proteinkinázy C v hladkých svalových buňkách vlivem hyperglykemie s výslednou zvýšenou tvorbou O_2 a útlum iniciální aterogenezou stimulované migrace buněk hladkého svalstva z cévní medie do vznikajících

lézí cévní intimy. Buňky hladkého svalstva jsou zdrojem kolagenu a stabilizují aterom a snižují riziko jeho ruptury a tvorby trombu.

Obrázek č. 4 Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát[63]



Stabilita či nestabilita aterosklerotického plátu je jeho neměnnou charakteristikou. Může docházet k přeměně jednoho ve druhý v závislosti na na tom, zda převládne aktivita hladkých svalových buněk a tvorba kolagenu, nebo naopak činnost makrofágů a prozánětlivých faktorů.

2.3.4 Význam cholesterolu v aterogenezi

Cholesterol je látka tukové povahy známá od r. 1784, pro lidský organismus nepostradatelná. Je součástí všech živočišných tkání – buněčných membrán, kde je orientována rovnoběžně s řetězci mastných kyselin. V nervové tkáni tvoří cholesterol až 25 % membránových lipidů buněk. Cholesterol je prekurzorem steroidních hormonů (progestageny, glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny a estrogeny), vitaminu D a žlučových kyselin. Ve tkáních a plazmatických lipoproteinech je přítomen jako volný nebo vázaný na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Vlastní syntéza cholesterolu probíhá v játrech z acetyl koenzymu A [8].

Syntéza cholesterolu se odehrává ve třech stupních. Nejprve dochází k syntéze isopentenyldifosfátu, jako aktivní isoprenové jednotky. Následuje kondenzace šesti molekul isopentenyldifosfátu za tvorby skvalenu, posledním krokem je pak cyklizace skvalenu řadou reakcí až na tetracyklický produkt, ten je pak bezprostředně převeden na cholesterol.

Dospělý člověk syntetizuje přibližně 800 mg cholesterolu denně. Syntéza cholesterolu je regulována zpětnovazebně přes aktivitu a množství HMG - CoA reduktasy. Rychlost

syntézy reduktasové mRNA je kontrolována proteinem SREBP (regulatory element binding protein), který funguje jako transkripční faktor. Nízká hladina cholesterolu aktivuje SREBP, vysoká jej inhibuje. Rychlost translace reduktasové mRNA snižují nesteroidní metabolity odvozené od mevalonátu a cholesterolu z potravy. Odbourávání reduktasy – proteolýza se spouští při vysokých koncentracích cholesterolu. Fosforylace snižuje aktivitu reduktasy. AMP aktivovaná proteinkinasa vypíná syntézu cholesterolu. Syntéza se zastavuje při nízkých hladinách ATP.

Příliš vysoká koncentrace cholesterolu v krvi přináší organismu zdravotní rizika, především bývá vysoká hladina cholesterolu spojena s vyšším rizikem vzniku kardiovaskulárního onemocnění.

V rozvoji endoteliální dysfunkce i v další progresi aterosklerotických lézí hrají zásadní roli aterogenní lipoproteiny. Nejvýznamnější z nich jsou LDL - částice, které byly chemicky modifikovány oxidací, glykosylací nebo acetylací. Nativní LDL - částice nemívají na funkci endotelu ani dalších složek cévní stěny výraznější vliv. Oxidace LDL - částic probíhá částečně už v plazmě, především ale po jejich průchodu do subendoteliálního prostoru. LDL - částice pronikají do subendoteliálního prostoru v určité míře i za fyziologických podmínek, jejich oxidace není za těchto okolností výrazná a oxidované LDL - částice jsou v menším množství účinně odstraňovány makrofágy cévní stěny prostřednictvím scavengerového receptoru [65]. Při větší produkci oxidovaných LDL - částic schopnost makrofágů vychytávat je nestačí a tyto částice se hromadí v prostoru intimy, kde způsobují toxické poškození okolních struktur. Pokud nejsou přítomny další faktory, které by endotel poškozovaly, dochází k nadměrné produkci oxidovaných LDL - částic pouze při výraznější hyperlipidemii. Při poškození endotelu dalšími faktory propustnost endotelu stoupá a oxidované LDL - částice se kumulují i při nižších hladinách lipidů [8].

Negativní působení LDL - částic v prostoru intimy má 2 hlavní složky; oxidované LDL - částice působí přímým toxickým vlivem na struktury okolní intimy, dále pak stimulují zánětlivou aktivitu plátu. Přímým účinkem na endotel působí LDL - částice endoteliální dysfunkci s převahou vazokonstrikčního působení, celkovým zvýšením propustnosti a zvýšenou expresí cytoadhezivních a prokoagulačních molekul. Stimulací VSMC vedou oxidované LDL - částice k jejich proliferaci a nadprodukci extracelulární matrix [76]. Kromě přímého toxického vlivu na struktury cévní stěny působí oxidované LDL - částice také poruchu funkce tkáňových makrofágů. LDL - částice působí přímým chemotaktickým způsobem na monocyty; tak zvyšují zánětlivou infiltraci subendoteliálního prostoru jednak přímo, jednak nepřímo přes zvýšení exprese endoteliálních cytoadhezivních molekul. Vazba

modifikovaných LDL - částic na scavengerové receptory makrofágů a pěnových buněk vede k jejich aktivaci a k produkci řady cytokinů a dalších látek, které udržují zánětlivou rekci v subendoteliálním prostoru; degradují okolní extracelulární matrix, stimulují proliferaci VSMC a prohlubují endoteliální dysfunkci [87].

2.3.5 Role oxidovaných LDL částic v patogenezi aterosklerózy

Oxidované LDL částice mají klíčovou roli v rozvoji aterosklerózi. Vlivem RONS dochází k oxidaci zejména nenasycených mastných kyselin a dále cholesterolu a fosfolipidů na molekule LDL. Apoliprotein B se rozpadá na několik menších fragmentů. Oxidace LDL - lipoproteinů probíhá v arteriální stěně při interakci LDL s monocyty/makrofágy, endoteliemi, buňkami hladkého svalstva, T lymfocyty a komponenty mezibuněčné matrix. Oxidované LDL částice jsou pohlceny makrofágy pomocí scavengerového receptoru a dále přes vlastní oxLDL receptor. V důsledku akumulace oxLDL je makrofág přeměněn na tzv. pěnovou buňku. Pěnové buňky migrují mezi buňky endotelu a dochází v nich k další akumulaci lipidů za vzniku tzv. lipoidních proužků. Kromě toho poškozují oxLDL přímo endotelie, v důsledku čehož jsou z nich více uvolňovány růstové faktory a povrch endotelu se tak stává chemotaktickým.

Měření apolipoproteinů je lepším indikátorem rizika koronárních onemocnění než určování hladin HDL a LDL cholesterolu. Vysoké hladiny Apo B a nízké hladiny Apo A - I značí zvýšené riziko koronárních chorob. Poměr Apo A - I a Apo B je pak ještě signifikantnějším parametrem [76].

2.3.6 Vliv hodnoty HDL – cholesterolu na aterogenezi

Existují jasné doklady o závislosti nízké hodnoty HDL - cholesterolu a rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Dokonce proběhla řada studií věnující se léčbě hypolipidemiky – statiny a jejich vlivu na nárůst HDL - cholesterolu. Dokonce léčba nikotinovou kyselinou, která bývá asociována s nárůstem hodnoty HDL, je povzbudivá. Dosud však neexistuje žádný záznam, který by dokazoval, že přímo nárůst HDL - cholesterolu je odpovědný za nižší výskyt kardiovaskulárních onemocnění. Naopak během klinického zkoušení nového léčiva torcetrapibu - CETP inhibitoru, došlo ke zvýšení rizika KVO. Torcetrapib zpomaluje odbourávání HDL - cholesterolu a zvyšuje tak jeho hodnotu. Efekt inhibitorů CETP (cholesterol - ester transfer protein) na LDL - cholesterol

při monoterapii není veliký, při kombinaci se statinem došlo však k vzájemné potenciaci účinku a poklesu LDL. Z těchto důvodů bylo rozhodnuto, že další vývoj nového léčiva bude zaměřen na fixní kombinaci torcetrapib/atorvastatin, Do dnes víme jen velmi málo o účinku specifické terapeutické elevace HDL - cholesterolu, zvláště pak navozené inhibicí CETP, na riziko vzniku KVO [87].

2.3.7 Oxysteroly v etiologii aterosklerózy

Oxidační produkty cholesterolu mají podstatně vyšší aterogenní potenciál než cholesterol samotný. Vznikají např. nevhodným skladováním potravin obsahujících cholesterol nebo jejich nevhodnou technologickou úpravou. V molekule cholesterolu, která je sama o sobě málo reaktivní, může v daných situacích dojít ke strukturním změnám, které podstatně zvýší jeho reaktivitu a tedy i toxicitu vůči buňkám lidského organizmu. Zdroje plazmatických a tkáňových oxysterolů v organizmu mohou být jak endogenní, tak exogenní (potraviny). Endogenní oxysteroly vznikají enzymaticky (působením hydroxyláz, dehydrogenáz a epoxidáz) nebo neenzymaticky vlivem RONS. Oxysteroly s nejvýznamnějšími biologickými účinky vznikají oxidací B - kruhu, oxidací dvojné vazby a/nebo oxidací bočního řetězce.

Oxysteroly působí toxicky na cévní stěnu, indukují zánět a následně aterogenezi. Modifikované LDL částice pak interagují s receptory cévního endotelu. Následně dochází k akumulaci těchto LDL v cévní stěně. Oxysteroly dále zvyšují expresi adhezních molekul prozánětlivých cytokinů a chemokinů.

Jedním z důležitých faktorů jejich vzniku v potravinách je i přítomnost PUFA (polyunsaturated fatty acids; více nenasycených mastných kyselin). Samotný cholesterol je z chemického hlediska relativně stálý. V přítomnosti PUFA dochází k jeho autooxidaci a to buď intramolekulárně (působením PUFA esterifikovaných na OH-skupině v pozici 3 cholesterolu) nebo intermolekulárně (vlivem sousedících molekul PUFA). Náchylnost cholesterolu k oxidaci roste se zvyšujícím se obsahem PUFA v potravinách. Vznik oxysterolů předpokládáme také u potravin s vysokým obsahem cholesterolu, které byly zpracovány pomocí dehydratace, za vysokých teplot, ionizujícího záření, za přístupu kyslíku. Jedná se především o sušené vaječné obsahy, sušené mléko, vnitřnosti, sýry a konzervované ryby. K dalším faktorům ovlivňujícím vznik oxysterolů v potravinách patří přítomnost přirozených katalyzátorů (myoglobin, hemoglobin), resp. exogenních katalyzátorů (stopy těžkých kovů), způsob balení a skladování potravin [61].

2.4 Klinické hodnocení funkce endotelu

Funkce endotelu může být hodnocena invazivně pomocí použití acetylcholinu, který zprostředkovává endotelem navozenou vazodilataci a hladkosvalovými buňkami zprostředkovanou vazokonstrikci. Ve zdravých koronárních artériích převládá endoteldependentní vazodilatace. Při poškození endotelu, převládá naopak vazokonstrikce. Jiné neinvazivní metody detekce ED využívají vysokorozlišovacího ultrazvuku pro měření průměru brachiální arterie jako odpovědi na reaktivní hyperemii. Reaktivní hyperemie vyvolává vzrůst krevního průtoku a smykové tření, stimuluje uvolňování NO tokem zprostředkovanou vazodilataci, která může být kvantifikována jako index vazomotorické funkce. Systémový charakter aterosklerózy odráží závislost mezi dysfunkcí endotelu na předloktí a koronární endoteliální dysfunkcí.

Tyto objevy také naznačují, že neinvazivní vyšetření periferních arterií může být velmi užitečné pro určení vlivu jednotlivých rizikových faktorů na dysfunkci endotelu nebo při vyhodnocení účinnosti léčby. Funkce endotelu nepřímo koreluje se sérovými hladinami CRP (C - reactive protein; C - reaktivní protein) [33].

2.4.1 Detekce preklinické aterosklerózy

Smyslem metod detekce preklinické aterosklerózy je identifikace nejrizikovějších jedinců. Mezi tyto metody patří stanovení funkce endotelu, měření výšky komplexu intima/media a zjištění přítomnosti aterosklerotických plátů v karotidách, stanovení kotníkového tlaku a do jisté míry ergometrie. Méně rozšířené je určení kalcifikačního skóre pomocí electron-beam-počítačové tomografie.

K rozpoznání aterosklerózy u pacientů bez klinické manifestace choroby bylo vyvinuto mnoho metod. Tyto postupy jsou zatím využívány především ve výzkumu, kde podávají mnoho informací o patogenezi aterosklerózy a o možnostech jejího ovlivnění. Jejich dosavadní klinický přínos je však zatím nepatrný [65].

Časná stadia aterosklerózy lze rozdělit na změny funkční a morfologické. Morfologickými změnami rozumíme již vzniklé aterosklerotické pláty a to v různých stadiích vývoje – od tukových proužků, přes stabilní až po nestabilní aterosklerotické pláty s různým podílem cholesterolu, vápníku, vaziva aj. Ultrasonografické studie z posledních let ukázaly, že i již vyvinutý aterosklerotický plát lze ovlivnit léčbou a dokonce částečně zmenšit. Tyto změny jsou sice sotva zachytitelné a to pouze s použitím nejdokonalejších

technik - např. ve studii REGRESS došlo ve skupině pacientů užívajících pravastatin ke zmenšení tloušťky plátu o setiny milimetru. Významným cílem léčby ateroskleózy je především zpomalení progrese aterosklerotického plátu a změna jeho struktury, která by vedla k jeho destabilizaci. Ve stabilizovaném aterosklerotickém plátu je nižší riziko ruptury, a tedy i náhlých kardiovaskulárních příhod.

Metody detekce preklinické aterosklerózy lze rozdělit na vyšetření funkce endotelu a na diagnostiku již přítomných aterosklerotických lézí [65].

2.4.1.1 Měření funkce endotelu

Funkci endotelu měříme nepřímo, využívá se k tomu 2 skupin metod. První skupina využívá hladiny plazmatických koncentrací různých bílkovin, které jsou produkovány výhradně buňkami endotelu. Do druhé skupiny patří měření změny průsvitu cévy, popř. průtoku cévou po endotel - dependentním stimulu.

K odhadu funkce endotelu se v klinických studiích využívají bílkoviny jak např. vWf (von Willebrandův faktor), ICAM (inter-cellular cytoadhesive molecule), VCAM (vascular cell adhesive molecule) apod. Doporučuje se odebírat krev alespoň 1 hodinu po zavedení kanyly. Výsledky mohou být zkresleny také alergiemi, užívanými léky včetně vitaminů a kontraceptiv, záněty (i lokalizovanými). Skupinou metod založených na měření změny cévního průsvitu, popř. průtoku po endotel-dependentním stimulu lze studovat mnohem více reakcí probíhajícíh v buňkách endotelu. Změna průsvitu tepny nebo průtoku tepnou se měří po podání látek působících primárně na endotel, tzv. endotel - dependentních podnětech, k vazomotorické reakci dochází vlivem zvýšení endoteliální produkce NO. Příkladem může být intraarteriálně podaný acetylcholin, další možností je nefarmakologický podnět – krátkodobá ischemie [65].

Acetylcholin se podává intrakoronárně při tzv. kvantitativní koronarografii. Ve vybraném segmentu tepny se změří její průsvit pomocí speciálního softwaru, který automaticky rozlišuje hranici mezi odlitkem tepny (kontrastní látkou) a okolím, za klidových podmínek a po podání léku.

Další možností je použití intravaskulární ultrasonografie (IVUSG). Rozdíl průsvitu tepny bývá vyjádřen v procentech (tedy o kolik procent se zvětšil/zmenšil průměr tepny). Normální odpovědí na stimul by měla být dilatace tepny. U pacientů s ICHS (ischemickou chorobou srdeční) a často i u pacientů s hyperlipidemií bez klinické manifestace koronární aterosklerózy bývá reakce minimální nebo může dojít až ke konstrikci tepny.

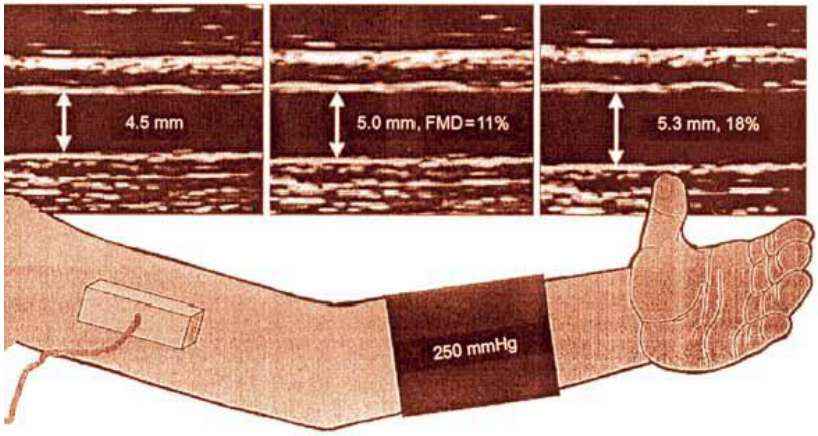
V běžné populaci se častěji používá z důvodů praktických i etických měření funkce endotelu na končetinách – kromě několika výjimek na horní končetině. Na přelomu 80. a 90. let 20. století se začala používat intraarteriální aplikace acetylcholinu – do brachiální arterie. Navozenou změnu průtoku detekujeme pletyzmografií. Změnu průtoku i průsvitu je možno vyšetřit duplexní dopplerovskou ultrasonografií.

V roce 1992 publikoval Celermajer a kolektiv [21] poznatky o metodě využívající měření dilatace tepny navozené přechodným zvýšením průtoku FMD (flow-mediated dilation; ultrazvukové hodnocení funkce cévního endotelu). Tato metoda je založena na stanovení endoteldependentní postischemické vazodilataci tepny. Nejčastěji bývá vyšetřovanou tepnou a. brachialis, popřípadě a. poplitea, u dětí to může být i a. femoralis superficialis [8]. Princip metody spočívá v přesném ultrazvukovém záznamu a. brachialis za klidových podmínek a po 4 – 6 minutové okluzi předloktí manžetou tlakoměru, nafouknutou na suprasystolický tlak. Zamezení přítoku krve do předloktí vyvolá ischemii s následnou vazodilatací a poklesem periferní cévní rezistence v dané končetině. Snížená periferní cévní rezistence je příčinou přechodné hyperemie po uvolnění manžety. Zrychlený tok krve vede ke zvýšení smykového napětí ve vyšetřovaném segmentu s následným uvolněním oxidu dusnatého, což vede k dilataci vyšetřované tepny. Použití FMD pro určení postižení koronárního řečiště se opírá o výsledky prací, které prokázaly, že FMD má vztah k abnormální vazomotorické odpovědi v oblasti koronárních tepen, se stupněm koronární aterosklerózy i s incidencí kardiovaskulárních příhod [22]. Se sníženou hodnotou FMD jsou spojovány i hlavní rizikové faktory aterosklerózy. Již první použití metody Celermajerem prokázalo snížení FMD u dětí s familiární hypercholesterolémií, u kuřáků a u osob s diagnózou koronární nemoci. Také v přítomnosti dalších rizikových faktorů, jako je např. věk, hypertenze, diabetes mellitus, rodinná anamnéza koronární nemoci, menopauza, nedostatek pohybu, hyperhomocysteinémie, obezita byl zaznamenán pokles FMD. FMD byla také použita ke sledování vlivu intervenčních opatření. Výsledky některých studií potvrdily reverzibilitu endoteliální dysfunkce měřenou FMD při léčbě statiny u pacientů s hypercholesterolémií. Také podávání fibrátů i statinů u kombinované hyperlipidémie bylo provázeno nárůstem FMD. Dále bylo prokázáno, že antihypertenzivní terapie ACE inhibitory, zanechání kouření u kuřáků a např. i zvýšení fyzické aktivity u méně pohyblivých pacientů mělo kladný dopad na úpravu FMD [53].

Je známé, že hodnota FMD je závislá na řadě faktorů (bazálním průměru vyšetřované tepny, požití alkoholu, kofeinu, tučného jídla, kouření, předchozí fyzické aktivitě, psychické pohodě, u žen na fázi menstruačního cyklu, užívání různých léků i vitamínů, např. vitaminu

C). Dále záleží na technickém vybavení, způsobu vyhodnocování a erudici vyšetřujícího a zřejmě i na celé řadě dalších faktorů. Není tedy překvapivé, že závěry jednotlivých studií přinášejí velmi rozdílné výsledky hodnot FMD . Stanovení FMD je vyšetřením neinvazivním a minimálně zatěžuje pacienta, přesto se však jedná o stanovení relativně náročné, jak po stránce přístrojového vybavení, tak pokud jde o nároky na odbornost personálu. Někteří autoři považují FMD za metodu umožňující předpovědět riziko vzniku KVO, zatím je však diskutována spolehlivost a výpovědní hodnota výsledků této metody.

Obrázek č. 5 Stanovení FMD na a. brachialis [56]



Obraz arteria brachialis je během vyšetření snímán ultrazvukovou sondou a nahráván na záznamové médium. Záznam se provádí v klidu a během reaktivní hyperémie. Reaktivní hyperémie následuje po periferní ischémii. Periferní ischémie je vyvolána kompresí předloktí manžetou tonometru nafouknutou na suprasystolický tlak. Ischémie podnítí periferní vazodilataci a následné zvýšení průtoku po uvolnění manžety tonometru. Hyperémie zvyšuje lokální produkci NO, čímž dochází k vazodilataci. Změna průměru arteria brachialis je tedy mírou funkce, příp. dysfunkce endotelu.

2.4.1.2 Detekce aterosklerotických plátů

K detekci aterosklerotických plátů používáme jak zobrazovací metody, tak klinická vyšetření zachycující teprve až pláty hemodynamicky významné. Především u rizikových pacientů by pro lékaře mělo být samozřejmostí palpační a auskultační vyšetření karotid a alespoň vyšetření pulzací na dolních končetinách.

- ***RTG***

Již na klasickém rentgenovém snímku bývají často popisovány kalcifikace tepen dolních končetin, aorty apod. Pouze vzácně jde o pouhouou mediokalcinózu, obvykle bývají přítomny i aterosklerotické pláty.

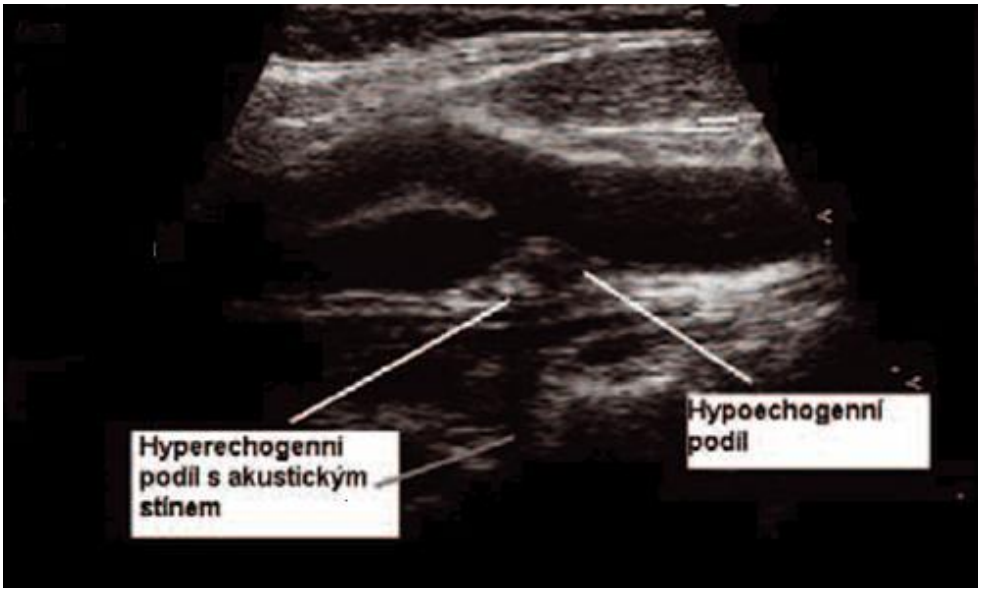
- ***Duplexní dopplerovská ultrasonografie***

Velmi často se metoda využívá k vyšetření krčních tepen nebo k vyšetření tepen dolních končetin. Při tomto vyšetření lze zobrazit již časné stadium ateroskleróz, jako je např. rozšíření intimální vrstvy (ale i všechna pozdější stadia plátů).

Karotidy patří v souvislosti s aterosklerózou mezi nejčastěji vyšetřované tepny a to z mnoha důvodů - zásobují krví centrální mozkový systém, ultrazvukem jsou snadno vyšetřitelné a jejich postižení do značné míry koreluje s aterosklerotickým postižením dalších tepen v lidském těle, zejména s postižením koronárních tepen

K ultrasonografickému vyšetření se využívá lineární vysokofrekvenční sonda (obvykle 7 – 11 MHz) s dopplerovským záznamem. Díky ultrasonografickému záznamu věnčitých cév je možno zachytit nebo naopak vyloučit významné zúžení, které by mohly způsobit ischemickou cévní mozkovou příhodu. Z hlediska prevence je důležité vyloučení nebo potvrzení přítomnosti aterosklerotického plátu, i zatím hemodynamicky nevýznamného. Popsána by měla být velikost plátu, jeho echogenita, homogenita a povrch. Hypoechogenní pláty bývají rizikovější, a proto jsou pacienti s tímto nálezem častěji zváni na kontrolu (přibližně po 6 měsících). Aterosklerotický plát bývá definován obvykle jako lokální ztluštění intimy o více než 1,5 násobek. Někteří autoři užívají arbitrární hodnotu – o plát se jedná, pokud v daném místě intima nebo zachycený útvar převyšuje výšku 1,5 mm.

Obrázek č. 6 Ultrasonografie karotid [65]



Ultasonografické vyšetření - zobrazení aterosklerotického plátu v bifurkaci cévy.

- ***IMT - intima-media thickness***

Jedná se o měření výšky komplexu intima/media, IMT. Metoda vychází z předpokládaného rozšíření intimo-mediální vrstvy jako jednoho z prvních morfologických projevů ateroskleróz. Prostup LDL - cholesterolu, proteinů i buněk cévním endotelem způsobuje postupné rozšiřování intimy až postupně dochází ke vzniku aterosklerotického plátu. K vyšetření se používá lineární sonda s vysokou frekvencí a tedy tím i vyšší rozlišovací schopností. Rozšíření vrstvy intima/media se považuje za známku časné ateroskleróz. K provedení tohoto vyšetření je nutný odborně vyškolený cévní sonografista. Nejčastěji se vyšetření provádí asi 10 mm pod začátkem bifurkace aorty společné karotidy, někdy bývá také hodnota IMT měřena v bifurkacích a proximálních 10 mm a. carotis interna. Evropská doporučení pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění doporučují počítat průměrnou hodnotu z 12 měření. Jako již abnormální hodnota bývá uváděna nad 1, 3 mm [8]. Mezi množstvím studií, které využívaly měření IMT v karotických tepnách zmíníme alespoň následující. Studie PLAC – II (The Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries trial) [10]. Léčba pravastatinem vedla k zpomalení progrese IMT v karotidách a ke snížení počtu klinických „endpointů“. Rotterdamská studie ukázala, že zesílení IMT je v běžné populaci spojeno s téměř dvojnásobným rizikem infarktu myokardu. Metoda měření

IMT je však problematická např. u pacientů s hypertenzí spíše koreluje s hypertrofií levé komory srdeční.

- ***Hodnocení kalcifikace koronárních tepen a počítačová tomografie***

Novějším, neinvazivním vyšetřením je tzv. electron-beam CT, při kterém se určuje kalciové skóre. Rozvíjí se využití magnetické rezonance ve vyšetření cév – jednak klinicky k detekci stenóz a jednak spíše experimentálně – zobrazení struktury plátu.

Kalcifikace koronárních tepen odrážejí téměř stoprocentní přítomnost koronární aterosklerózy. Zdaleka ne všechny aterosklerotické pláty však bývají kalcifikované. Metody zobrazující kalcifikace věnčitých tepen se využívají především pro odhad stupně aterosklerotického postižení. Tyto metody se nehodí k vyšetření pacientů s vysokou pravděpodobností přítomnosti hemodynamicky významného zúžení koronárních artérií, hrozila by možnost falešně negativního výsledku. EBCT (elektron - beam computer tomography), speciálně konstruované CT (komputer tomography; počítačová tomografie) bez rotace rentgenové lampy - vyloučení rotace umožňuje zkrácení akvizičního času na cca 100 ms, což je dostatečné pro zobrazení bijícího srdce. Stupeň kalcifikací se vyjadřuje jako tzv. Agatstonovo skóre. Nevýhodou EBCT je především jeho vysoká cena. V poslední době jsou už k dispozici i moderní počítačové tomografy s ultra rychlou rotací až 16 vrstev (multislice CT – MSCT), jejichž akviziční čas se blíží EBCT. Obě metody jsou prováděny nativně, bez použití kontrastní látky. Zatím však, alespoň v České republice, nedosáhly velkého rozšíření.

- ***Zátěžové EKG vyšetření***

Využívání zátěžového EKG vyšetření u asymptomatických jedinců bývá sporné. Zatímco k projevům anginy pectoris vedou tzv. hemodynamicky významné stenózy, akutní koronární syndromy vznikají většinou na podkladě ruptury hemodynamicky dosud nevýznamné stenózy, kterou zátěžovým EKG vyšetřením nelze detekovat. Vyšetření má omezenou senzitivitu a je málo specifické [65], nebývá proto u asymptomatických jedinců indikováno. Metoda má celou řadu nevýhod. Často dochází k falešně pozitivním výsledkům, zejména u žen, což vede k dalšímu excesivnímu vyšetřování nebo i k nadměrné léčbě [59].

- ***Měření kotníkového tlaku***

Každý internista či kardiolog zná řadu pacientů s velmi pokročilou aterosklerózou, avšak s minimálními klinickými projevy. U řady pacientů je přítomno významné, ale klinicky

se nemanifestující postižení tepen dolních končetin. V angiologii se používá měření kotníkového tlaku k posouzení ischemické choroby dolních končetin. Vyjadřuje se nejčastěji jako IKP (index poměr kotník/paže), resp. poměr systolického tlaku naměřeného u kotníků a systolického tlaku naměřeného na paži. Normální hodnota bývá vyšší než 1,0. Hodnota IKP nižší než 0,9 je považována za patologickou. Provedení tohoto vyšetření je jednoduché, přístrojově nenáročné. Nejprve je klasicky změřen krevní tlak na paži. Dopplerovským přístrojem je lokalizována a. tibialis posterior a a. dorsalis pedis. Poté je přiložena manžeta tlakoměru na bérec nad úrovní kotníků a nafouknuta nad očekávaný systolický tlak (potvrdíme vymizením dopplerovského signálu). Při pomalé deflaci manžety se na hodnotě systolického tlaku objeví dopplerovský signál. Diastolický tlak se touto metodou nestanovuje. Ze studií, které se věnovaly indexu kotník/paže ve vztahu k prognóze pacientů zmíníme alespoň populační studii ARIC. U některých pacientů je kotníkový systolický tlak paradoxně zvýšen, obvykle v souvislosti se zvýšenou tuhostí cévní stěny, často z důvodu kalcifikací. V tomto případě je IKP nehodnotitelný.

Hodnocení preklinické aterosklerózy a možnosti zjištění míry rizika vzniku kardiovaskulárních příhod jsou i přes veškerý vědecký pokrok stále omezené. V běžné klinické praxi bývá na prvním místě podrobné fyzikální vyšetření, především v oblasti krkavic a tepen dolních končetin. Vysokou informační hodnotu pak má výpočet indexu kotník/paže a přitom je kdekoli snadno proveditelný. Při ultrasonografii karotid se zjišťuje přítomnost či nepřítomnost aterosklerotických plátů. Metody detekce preklinické aterosklerózy mají význam především u pacientů se středním rizikem, kde se lékař rozhoduje, jak intenzivně je třeba daného jedince léčit. Naopak vysoce rizikoví jedinci by měli být podrobeni maximální léčbě či intervenci rizikových faktorů a u jedinců s nízkým rizikem tato léčba indikována není [65].

2.5 Biomarkery aterosklerózy

V současné době vědci a lékaři neustále pátrají po vhodných ukazatelích - biomarkerech, jejichž výskyt nebo změny hladin v organismu by pomohly včas odkrýt onemocnění, které je zatím klinicky němé. Případně by mohly upozornit na zvýšené riziko jejího vzniku. Biomarkery také umožňují stratifikaci rizika různých pacientů pro vznik komplikací nebo recidivy nemoci.

V posledních letech bylo objeveno mnoho nových markerů jednotlivých stádií aterosklerózy - tj. fáze zánětu, fáze destabilizace plátu, ischemie a nekrózy myokardu a následně remodelace levé komory srdeční. Příkladem biomarkerů se vztahem k ateroskleróze a jejím komplikacím, jsou ukazatele aktivního zánětu CRP, sérový amyloid A a neopterin, selektiny, interleukin - 6, TNF - α, aj [58].

2.5.1 Kardiomarkery zánětlivé fáze aterotrombózy

2.5.1.1 C - reaktivní protein (CRP)

Z klinického pohledu je nejdostupnějším a nejvhodnějším markerem. C - reaktivní protein byl objeven v roce 1930. Původně byla bílkovina považována za produkt infekčního agens vyvolávajícího zánět plic. Až později bylo zjištěno, že CRP je tvořen při jakémkoliv zánětu – při zánětu, poranění nebo jiném tkáňovém poškození a to v různých orgánech (zvláště v játrech). CRP je součástí imunitního systému a chemicky jedná o bílkovinu s pěti strukturálními podjednotkami. Hlavním úkolem bílkoviny je rozpoznání cizí látky nebo poškozené buňky a zprostředkovat její odstranění makrofágy a komplementem [84].

V 80. letech 20. století byl poprvé CRP identifikován v intimě sklerotických plátů v aortě. Dnes je dobře známa účast imunitního systému v procesu aterogeneze z nichž především IL - 6 je nejvýznamnějším stimulátorem produkce CRP v játrech a také v tukové tkáni. Koncentrace CRP v plazmě se při ateroskleróze pohybuje v rozmezí 0,5 - 10 mg/l a tyto hodnoty se dají změřit pouze pomocí vysoce senzitivní metody hs – CRP (high sensitivity - CRP). U akutního zánětu se pohybují koncentrace CRP zhruba ve stovkách a tisících jednotek. Chceme-li využít hs - CRP pro predikci kardiovaskulárního rizika, je třeba vyčkat s náběrem krve minimálně tři týdny po odeznění akutního zánětu. Problémem však zůstává chronický zánět, např. chronická bronchitida, artritida aj. autoimunitní záněty, které mohou být spojeny s trvale zvýšenou koncentrací CRP. To je největší slabina tohoto biomarkeru, který není specifický pouze pro systémový zánět endotelu spojený s aterosklerózou.

Asociace mezi ischemickou chorobou srdeční a koncentracemi hs - CRP byla poprvé zjištěna v roce 1996 v Mendallově průřezové studii, kde byl biomarker systémového zánětu CRP porovnáván s ostatními klasickými kardiovaskulárními rizikovými faktory [58].

2.5.1.2 Interleukin - 6 (IL - 6)

IL - 6 je cytokin tvořený a uvolňovaný především makrofágy a aktivovanými monocyty uvnitř aterosklerotického plátu, dále pak z aktivovaných buněk endotelu. Vyvolává produkci reaktantů akutní fáze zánětu, jako např. CRP. Po podání hypolipidemik ze skupiny statinů může dojít k redukci syntézy CRP vyvolané pomocí IL - 6. Takto nejspíš statiny působí protizánětlivě. V experimentalnich pracích byla prokázána přímá účast IL - 6 na progresi a destabilizaci aterosklerotického plátu. Zvýšené hladiny cirkulujícího IL - 6 byly během klinických pacientů po operaci srdce. Ve studii FRISC II (Fast Revascularization during InStability in Coronary disease) byly zvyšené hodnoty IL - 6 spojeny se zvýšenou mortalitou při sledovaní nemocných po dobu 6 a 12 měsíců. Zvýšené hladiny tohoto biomarkeru jsou tedy velkým rizikem pro pacienta.

2.5.1.3 Interleukin – 10 (IL - 10)

IL – 10 je cytokin, ktery je produkován aktivovanými monocyty, makrofágy a lymfocyty imunitního systému. Inhibuje matrix metaloproteinázy, produkci dalších cytokinů a snižuje efekt tkáňoveho faktoru. Díky čemuž má vyznamný ateroprotektivní potenciál. U nemocných a anginou pectoris byly nalezeny nízké hladiny IL - 10 [17]. Snížené hladiny IL - 10 mohou být markerem nestability platu, zároveň poukazují na nepříznivou dlouhodobou prognózu.

2.5.2 Kardiomarkery destabilizace aterosklerotického plátu

Poslední fází před rupturou aterosklerotického plátu bývá období destabilizace plátu. Hlavní roli zde sehrávají aktivované buňky zánětu, především makrofágy, s produkcí proteolytickych enzymů, které rozruší matrix plátu a dochází k jeho ztenčení [58].

2.5.2.1 Solubilní CD40 ligand (sCD40L)

Nacházíme ho v membránách aktivovaných trombocytů, cevních endoteliálních buněk, monocytů a makrofagů. Proteázy částečně uvolňují sCD40L z povrchu buněk do krevního oběhu bez ztraty biologicke aktivity jako solubilni CD40L a může byt detekován v krevním séru i plazmě. Hlavním zdrojem této látky v cirkulaci jsou aktivované krevní destičky. Interakce mezi sCD40L a receptory CD40 na monocytech, makrofazích či buňkách cévní stěny, vede k uvolnění zánětlivých markerů. Následně dochází k expresi adhezivních molekul, aktivaci matrix metaloproteináz a uvolnění tkáňového faktoru. CD40L se také váže

k destičkovému receptoru GP IIb/IIIa – což podporuje další aktivaci trombocytů a stabilizaci trombu Vyšší hladiny cirkulujícího sCD40L korelují s aktivitou trombocytů, prohlubují zánět a mají protrombogenní vliv, inhibují endoteliální regeneraci, což vede k destabilizaci plátu [53].

2.5.2.2 Pregnancy - associated plasma protein A (PAPP-A)

Jedná se o metaloenzym, původně byl nalezen v plazmě gravidních žen a používá se pro screening Downova syndromu. Zvýšené koncentrace PAPP - A byly objeveny nedávno u pacientů se stabilní koronární nemocí a komplexnějším koronárním onemocněním [25] a u nemocných s akutním koronárním syndromem. Role PAPP - A v patofyziologii aterogeneze není zatím přesně objasněna. Předpokládá se, že jako proteáza destruuje extracelulární matrix a podporuje destabilizaci plátu a tím možnost následné eroze a ruptury. U pacientů s AKS byly nalezeny vyšší koncentrace cirkulujícího PAPP - A v porovnání s nemocnými se stabilní formou koronární nemoci. Dvě klinické studie poukázaly na to, že PAPP - A je nezávislý prediktor kardiovaskulárních příhod. PAPP - A dokáže identifikovat rizikové pacienty, kteří mají negativní troponin. PAPP - A se zdá být nadějným biomarkerem pro rizikovou stratifikaci nemocných s koronární nemoci. Pokud má však aspirovat na relevantní klinicky parametr, bude nutné toto ověřit ve velkých studiích [58].

2.5.2.3 Myeloperoxidáza (MPO)

MPO se nalézá v azurofilních granulech polymorfonuklearnich neutrofilů, monocytů a makrofágů. MPO je z nich uvolňována v místě zánětu. Aktivitu MPO lze měřit v krvi i tkáních, je možné stanovit také množství MPO v neutrofilech jako tzv. index degranulace. Zvýšené množství MPO v makrofázích bylo popsáno v erozích a rupturách aterosklerotických plátů a u nemocných s akutním koronárním syndromem. Naproti tomu v lipoidních proužcích MPO detekována nebyla. V experimentálních pracích bylo prokázáno, že MPO mění LDL cholesterol na aterogenní oxidovanou formu. Dále způsobuje produkci nefunkčního HDL - cholesterolu, spotřebovává endoteliální NO, podporuje transmigraci leukocytů a tvorbu pěnových buněk, aktivuje metaloproteinázy a tkáňový faktor a účastní se na apoptóze buněk endotelu. Všechny tyto procesy podporují endoteliální dysfunkci, růst, destabilizaci plátu s následnou rupturou. Ve studii CAPTURE se ukázalo, že u pacientů s akutním koronárním syndromem a se zvýšenými hodnotami MPO se vyskytovaly častěji následné kardiovaskulární příhody. Nadále pokračuje výzkum k přiřazení role MPO v klinickém hodnocení a léčbě nemocných s akutním koronárním syndromem [58].

2.5.2.4 Placentární růstový faktor (PlGF)

Tento biochemický marker patří do skupiny cévních endoteliálních růstových faktorů (VGEF). Poprvé byl nalezen v placentě a podle toho pojmenován. PlGF podporuje proliferaci svalových buněk cév, migraci makrofágů do aterosklerotických plátů, uvolňování (tumor nekrotického faktoru – α) i MCP - 1 (monocytárního chemotaktického proteinu 1) z makrofágů, stimuluje patologickou angiogenezi. Studie na zvířecích modelech ukázaly, že PlGF má potenciál odrážet nestabilitu aterosklerotického platu. Velkou výhodou tohoto biomarkeru je jeho stabilita v cirkulaci, lze ho tedy použít pro stanovení v séru či plazmě. Ve studii CAPTURE hodnoty PlGF nad 27 ng/l představovaly významné riziko pro časné i pozdní úmrtí na nefatální infarkt myokardu nezávisle na hodnotách troponinu T, sCD40L a CRP. I u nemocných bez zvýšených hodnot troponinu T nebo sCD40L znamenala tato hodnota vyšší riziko kardiovaskulárních příhod [31]. Počáteční zkušenosti dávají tomuto biomarkeru naději na klinické uplatnění a to nejen z pohledu rizikové stratifikace, ale i terapeutických možností [58].

2.5.3 Kardiomarkery ischemie myokardu

V současné době neexistuje klinicky spolehlivý ukazatel ischemie myokardu. Objevení zanikajících buněk ještě před jejich nekrózou zůstává pro lékaře zatím pouhým přáním.

2.5.3.1 Ischemií modifikovaný albumin (IMA)

Poznatky, že ischemie myokardu redukuje vazebnou kapacitu kobaltu k albuminu, vedla ke vzniku testu ACB (albumin cobal binding). Metaanalýza více jak 1 800 pacientů prokázala, že kombinace nediagnostického EKG, negativního troponinu a negativního ACB testu má vysokou negativní predikční hodnotu pro vyloučení akutního koronárního syndromu u pacienta trpícího bolestmi na hrudi. Tento ACB test byl schválen americkou FDA (Food and Drug Administration) pro použití v klinické praxi. Použití IMA jako markeru srdeční ischemie má však mnohé limitace. Problematická je interpretace pozitivního testu ACB. Ischemií modifikovaný albumin je jako marker velmi málo specifický – vyšší hodnoty byly nalezeny po elektrické kardioverzi, pacientů s CMP, renální nedostatečností, jaterním onemocněním a u některých nádorů. Nevýhodou také je, že současný ACB test stanovuje produkci IMA kalorimetrickou metodou, tedy nepřímo [58].

2.5.3.2 Růstový diferenciační faktor 15 (GDF-15)

Jde o cytokin ze skupiny růstovych diferenciačnich faktorů beta (TGF beta), který je uvolňován z kardiomyocytů během ischemie a reperfúze. Při krevní analýze vzorků pacientů s AKS bez ST elevací bylo naměřeno, že hodnota GDF - 15 > 1 800 ng/l identifikuje značně rizikovou skupinu s roční mortalitou 14 %, naopak nemocní s hodnotou GDF-15 < 1 200 ng/l měli roční mortalitu pouze 1,5 % [58]. Z vědeckých poznatků je pozitivní skutečnost, že jednorázová vstupní hodnota přináší poměrně silnou hodnotu predikce bez nutnosti sériových vzorků a označuje za rizikové i nemocné s negativním i pozitivním troponinem.

2.5.3.3 SCUBE 1

SCUBE 1 patří mezi nově objevené proteiny, je uložen v α granulích neaktivních krevních destiček. Po jejich trombinové aktivaci dochází k přesunu na povrch destiček a jako proteolytické fragmenty jsou uvolňovány do cirkulace. Jedná se o signální proteiny interakce aktivovaných destiček a endoteliálních buněk, které tak mohou indikovat aktivaci trombocytů při akutní trombotické příhodě. V roce 2008 byla uveřejněna první studie, která hodnotila plazmatické koncentrace SCUBE 1 u zdravých dobrovolníků, nemocných s chronickou koronární aterosklerózou, AKS a akutní ischemickou cevní mozkovou přihodou. U prvních dvou skupin nebylo možné hodnoty SCUBE1 detekovat, u dalších dvou akutních onemocněni byly hladiny tohoto markeru výrazně zvýšené (median 205 ng/ml resp. 95,1 ng/ml). SCUBE 1 se stal novým možným biomarkerem aktivace krevních destiček u akutních trombotických příhod [58].

3 Transformační růstový faktor β1 a endoglin

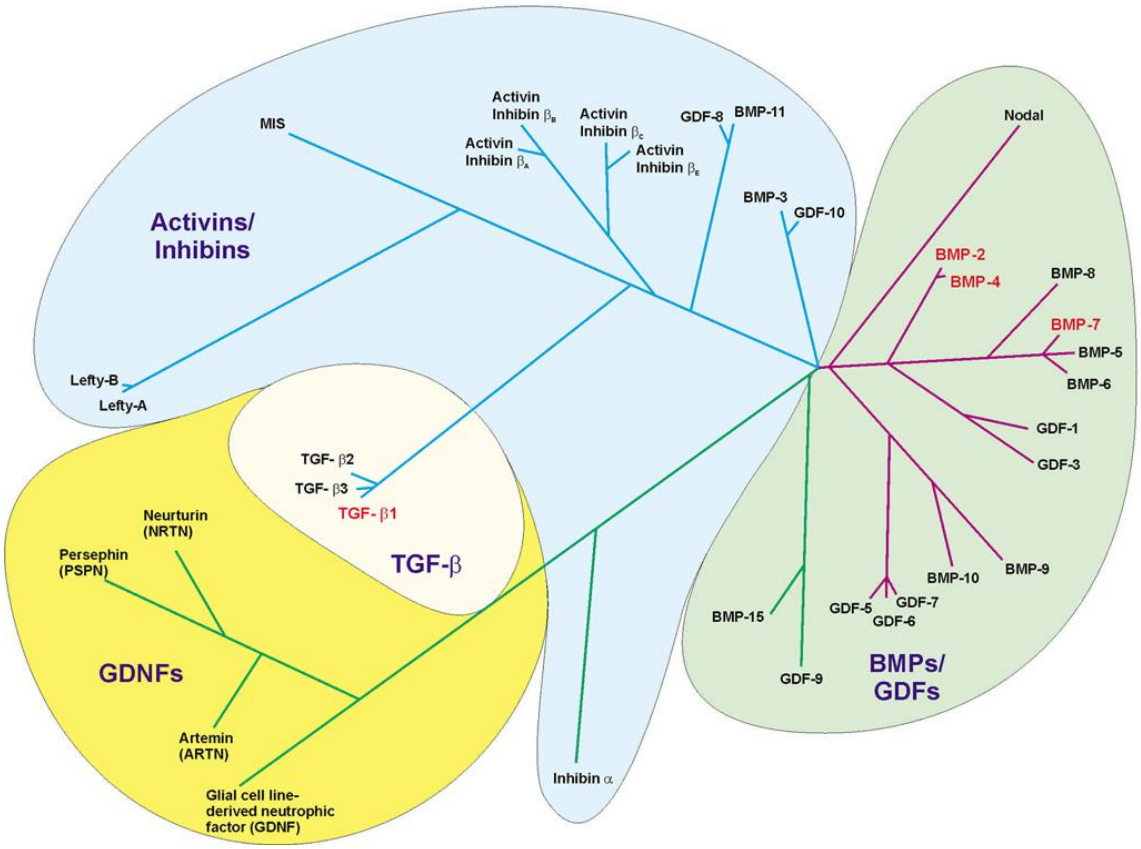
3.1 TGF - β1

TGF (transforming growth factor; transformační růstový faktor) označuje nejednotnou skupinu růstových faktorů, které inhibují buněčnou proliferaci. Jedná se o negativní regulátory buněčné transkripce [7]. Dělí se na 2 velké podrodiny TGF - α a TGF - β. Cytokiny TGF - α jsou produkované makrofágy, mozkovými buňkami a keratinocyty. Ovlivňují růst a vývoj epitelu, některé z nich mohou mít při nadměrné expresi stimulovat vznik nádorů.

U savců se TGF - β rodina vyskytuje ve třech izoformách jako TGF - β_1, TGF - β_2 a TGF - β_3 [39]. Tyto růstové faktory působí na regeneraci tkání, buněčnou diferenciaci, embryogenezi a regulují imunitní systém. Receptory TGF - β jsou serin – threonin kinázy. Zvýšená exprese TGF - β přispívá k rozvoji některých nádorových onemocnění a ke vzniku Marfanova syndromu.

TGF - β_1 má zásadní roli ve vývoji, fyziologických i patologických procesech vaskulárního systému.

Obrázek č. 7 Nadrodina TGF - β [19]



Nadrodinu transkripčních faktorů TGF - β lze podle rozdílných strukturálních motivů rozdělit na několik skupin: TGF - β, aktiviny a inhibiny, BMPs (kostní morfogenetické proteiny), GDFs (růstové a diferenciační faktory), a vzdáleněji příbuznou skupinou jsou peptidy GDNF (glial-cell line derived neurotrophic factor). Přesné přiřazení k jedné z těchto podskupin je však nejednoznačné a poněkud nepravidelné [46] .

3.1.1 Struktura

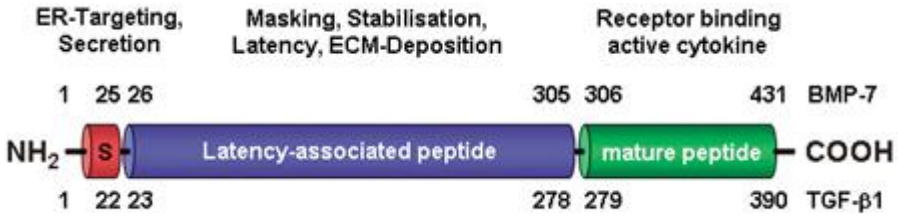
Peptidová struktura faktorů TGF - β rodiny je velmi podobná. TGF - β_1, TGF - β_2 i TGF - β_3 jsou kódované jako rozsáhlé proteinové prekurzory; TGF - β_1 obsahuje 390 aminokyselin, TGF - β_2 a TGF - β_3 se skládají dokonce ze 412 aminokyselin každý. Mají N - terminální konec složený z 20 - 30 aminokyselin, potřebný pro sekreci z buňky, pro - region nazývaný LAP (latency associated peptide), a 112 - 114 aminokyselin dlouhý C - terminální region, ze kterého se následně stává zralá – biologicky aktivní molekula TGF - β a to uvolněním z pro-regionu proteolytickým odštěpením [30].

Zralý TGF - β protein dimerizuje a vytváří aktivní molekulu 25 KDa s mnoha zachovanými strukturálními motivy. TGF - β má 9 cysteinových zbytků, které jsou typickou

strukturou pro rodinu proteinů TGF – β; cysteinové jádro uvnitř molekuly tvoří 8 disulfidických můstků - strukturu charakteristickou pro TGF - β nadrodinu, zatímco 9. cysteinový zbytek tvoří disulfidický můstek s 9. cysteinem jiné TGF - β molekuly a spolu pak tvoří dimerickou strukturu [55]. Mnoho konzervovaných struktur v TGF - β tvoří svoji sekundární strukturu díky hydrofobním interakcím. Oblast mezi 5. a 6. konzervovanými cysteinovými doménami je nejvíce odlišná oblast molekuly TGF - β, která je vystavena na povrchu molekuly a je zapletená do receptoru vázajícím a specifickým pro TGF - β.

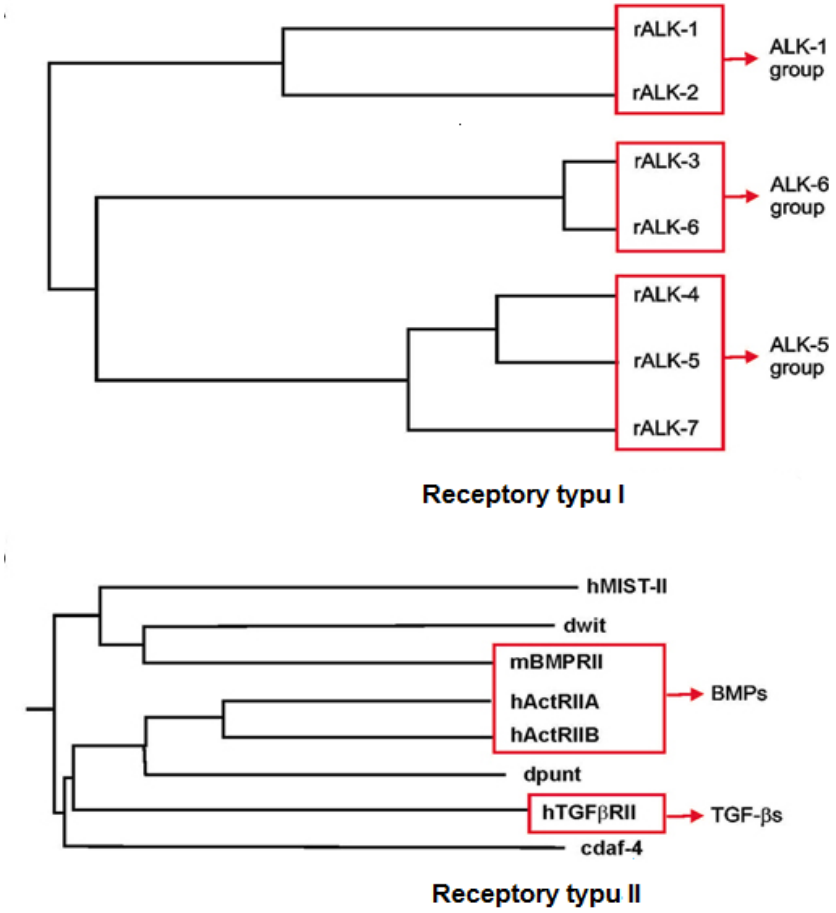
Nadrodinu transkripčních faktorů TGF - β lze na základě strukturálních motivů rozdělit na několik skupin: TGF - β, aktiviny a inhibiny, BMPs (kostní morfogenetické proteiny), GDFs (růstové a diferenciační faktory), a vzdáleněji příbuznou skupinou jsou peptidy GDNF (glial-cell line derived neurotrophic factor). Přesné přiřazení k jedné z těchto podskupin je však nejednoznačné a poněkud nepravidelné. TGF - β_1, BMP - 7, BMP - 2 a BMP - 4 jsou cytokiny velmi důležité pro regulaci fibrogeneze [46].

Obrázek č. 8 Struktura TGF - β [46]



Strukturální rysy BMP - 7 a TGF - β: BMP - 7 a TGF - β_1 mají totožnou strukturu typickou pro členy nadrodiny TGF - β. N - terminální vedoucí sekvence (červeně) je nezbytná pro nasměrování peptidu do endoplazmatického retikula a následně pro buněčnou sekreci. LAP (latency – associated peptide – modře) je nezbytný pro zakrytí, stabilizaci a uložení extracelulární matrix. Zralý (biologicky aktivní) peptid (zeleně) je lokalizován na C konci prepropeptidu [46].

Obrázek č. 9 TGF - β receptory typu I a II [46]

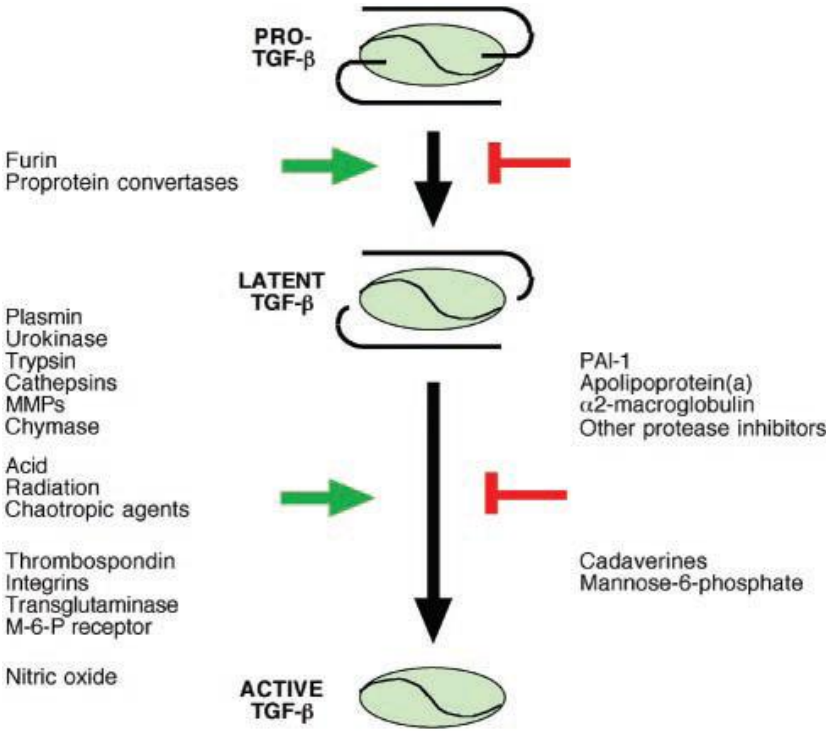


TGF - β receptory můžeme rozčlenit na dvě skupiny – typ I a typ II. Receptory typu I lze rozdělit do 3 podskupin: ALK - 1 skupina (obsahuje receptory ALK - 1 a ALK - 2), ALK - 6 skupina (obsahuje ALK - 3 a ALK - 6) a ALK - 5 skupina (obsahuje ALK - 4, ALK - 5 a ALK - 7). Skupina receptorů typu II zahrnuje BMPRII, ActRIIA a ActRIIB, které jsou specifické pro BMPs, zatímco TGF - βRII je specifický pro TGF – β [46].

Členové nadrodiny TGF - β jsou utvářeny jako preproproteiny, které dimerizují a ztrácí svou signální sekvenci během sekrece. Výsledný pro-proteinový dimer musí poté projít procesem aktivace, který má 2 stadia. Po aktivaci je vytvořena aktivní TGF - β liganda. V prvním kroku je odštěpena polypeptidová kostra na straně tetrabáze mezi pro-peptidem LAP (latency associated peptide) a zralým dimerem TGF - β. LAP dimer a biologicky aktivní TGF - β dimer zůstávají nekovalentně propojeny a tato struktura (označovaná jako latentní TGF - β) je již známa svojí biologickou aktivitou. Ve druhém kroku se LAP oddělí od zralého TGF - β dimeru, který je tímto uvolněn pro interakce se signálními receptory. Přesný

mechanismus tohoto druhého kroku není stále plně objasněn. Je ale známo, že jde o děj podporovaný mnoha různými faktory (zahrnující proteázy, fyziochemické mediátory, a vazby jiných proteinů). Dokonce byly popsány některé inhibitory tohoto aktivačního kroku. Je pravděpodobné, že LAP účinkuje jako senzor latentního TGF - β komplexu. Vyhodnocuje aktuální hladinu TGF - β a okolními faktory, aby určil, jak velká část efektorového zralého TGF - β se má uvolnit. Třetí komponenta komplexu, která účinkuje jako detektor a reguluje distribuci komplexu ve tkáních, není jasně viditelná [45],[46].

Obrázek č. 10 Aktivace TGF - β [45]



Faktory ovlivňující aktivaci TGF – β_1: Členové TGF – β nadrodiny jsou utvářeny jako preproproteiny, které dimerizují a ztrácí svou signální sekvenci během sekrece. Výsledný pre-proteinový dimer musí poté projít procesem aktivace, který má 2 stadia. Po aktivaci je vytvořena aktivní TGF - β liganda [45].

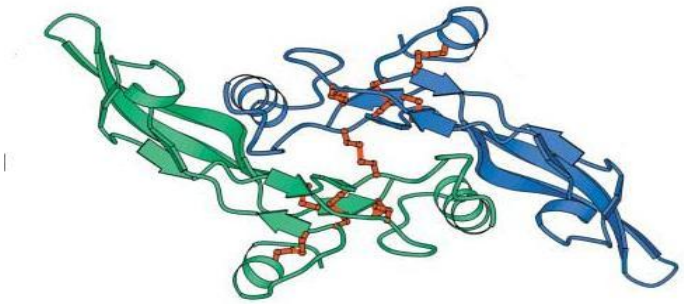
TGF - β dimery se skládají z monomerů, spojených jediným disulfidickým můstkem, který je u lidského TGF - β_1 lokalizován na pozici 77 zralého peptidu. Navíc monomery TGF - β obsahují 4 disulfidické můstky uvnitř řetězce, které jsou konzervované u TGF - β a inhibinů, zatímco ostatním členům nadrodiny TGF - β první můstek chybí. Diméry jsou spojeny jedním intermolekulárním disulfidickým můstkem. Pevná síť intramolekulárních disulfidických můstků a jediné intermolekulární spojení 2 monomerů způsobují tzv. efekt motýlího křídla, který je typický pro dimery z rodiny TGF - β.

Aktivní forma TGF - β je dimér stabilizovaný hydrofobními interakcemi, které jsou dále zpevněny disulfidickými můstky mezi jednotlivými jednotkami. Každý monomer se skládá z několika smyček β skládaných listů propojených 3 disulfidickými můstky, které tvoří charakteristickou strukturu – cysteinové jádro.

Dimérické uspořádání ligandů naznačuje následnou tvorbu komplexu se dvěma typy receptorů. Přístup ligand k receptorům je regulován proteiny, které jsou známé jako „ligand traps“.

Receptory serin/threonin kinásové rodiny u člověka mají 12 členů – 7 receptorů typu I a 5 receptorů typu II. Oba typy serin/threonin kinázových receptorů se skládají z přibližně 500 aminokyselin. Sekvence aminokyselin je tvořena N-terminální extracelulární doménou – vázající ligandy, transmembránovým regionem a C-terminální serin/treonin kinázovou doménou. Celkovou strukturu tvoří tzv. „three-finger toxin fold“, ve kterém je každý žlábek tvořen párem antiparalelních beta listů [67].

Obrázek č. 11 Dimér TGF - β [67]



Dimér TGF - β: 2 monomery TGF - β (modře a zeleně), vedlejší cysteinové řetězce a disulfidické můstky jsou naznačeny červenou linkou; ligandy dimeru jsou propojeny pomocí disulfidických můstků.

TβRII a TβRI obsahují charakteristickou SGSGSG sekvenci, tzv. GS doménu těsně za N-terminální doménou. Aktivace TβRI zahrnuje fosforylaci této GS domény pomocí TβRII. Aktivní receptorový komplex obsahuje tedy oba typy receptorů TβRII a TβRI s navázanými ligandami. TGF - β mají velkou afinitu k receptorům TβRII, ale neinteragují s izolovanými TβRI. Nejdříve se liganda váže těsně na ektodoménu TβRII, toto spojení pak umožní následnou inkorporaci TβRI a utvoří se tak rozsáhlý ligando-receptorový komplex zahrnující dimér ligand a 4 molekuly receptorů.

Existují 2 rozdílné modely vysvětlující dva kroky tvorby funkčního signálního komplexu TGF - β . Podle alosterického modelu je spojení ligandy s TβRII nutné pro indukci konformačních změn ligandu, které následně vedou k expozici vazebného epitopu pro strukturu TβRI. Podle druhého, kooperativního modelu, ektodoména TβRI interaguje přímo s povrchem, který závisí na tvorbě TβRII ligando - receptorového komplexu [67].

Vazba na extracelulární domény obou typů receptorů dimerickými ligandy indukuje těsné přiblížení a uspořádání konformace pro nitrobuněčné kinásové domény receptorů, usnadňující fosforylaci a následně aktivaci TβRI. TβRII kinázy jsou konstitutivně aktivní. Fosforylují mnoho serinových a threoninových zbytků v sekvenci TTSGSGSG cytoplazmatické GS domény TβRI vedoucí k aktivaci tohoto receptoru. GS region je zásadní pro aktivaci receptoru a slouží jako důležitá regulatorní doména pro buněčnou signalizaci TGF - β. Všechna stádia aktivace receptorů jsou přísně regulována. Přístup TGF - β ligand k příslušným receptorům je řízen 2 skupinami molekul s opačnými funkcemi. První je rozmanitá skupina solubilních proteinů, které účinkují jako „traps“. Patří mezi ně např. LAP (proregion TGF - β prekurzoru, který zůstává nekovalentně navázán na bioaktivní doménu), malý proteoglykan decorin a cirkulující protein α2 - makroglobulin (váže volný TGF - β), folistatin (váže aktiviny a BMPs). Druhá skupina jsou molekuly regulující přístup ligand k receptorům. Tato skupina zahrnuje v membráně ukotvené proteiny, které účinkují jako koreceptory a podporují vazbu ligandu na signalizující receptory. V membráně ukotvený proteoglykan beta glykan neboli receptor TGF - β typu III je dlouho známý tím, že zprostředkovává vazbu TGF - β k TβRII. Beta glykan ale nemá žádnou afinitu k aktivinům ani k BMPs. Další z receptorů TGF - β typu III je endoglin, protein usnadňující vazbu TGF - β k TβRI - ALK1 na buňkách endotelu, což je zcela zásadní pro udržení cévní homeostázi.

Aktivace receptorů je také regulována intracelulárními proteiny. Vazba FKBP12 na nefosforylovanou GS doménu TβRI omezuje bazální aktivitu ochranou před fosforylací (na funkci ligand nezávislé) a aktivaci receptoru. Jednou aktivované receptory TGF - β rodiny jsou negativně regulovány I - Smad, Smad 7. Smad 7 se váže na aktivovaný receptory a kompetuje s R - Smads. Smad 7 interakce vede k degradaci receptorů [67] .

3.1.2 Funkce TGF - β

Transformující růstový faktor β hraje centrální úlohu v regulaci mnoha buněčných funkcí jako je růst, diferenciace, apoptóza, adheze a motilita. Váže na receptory typu II a I

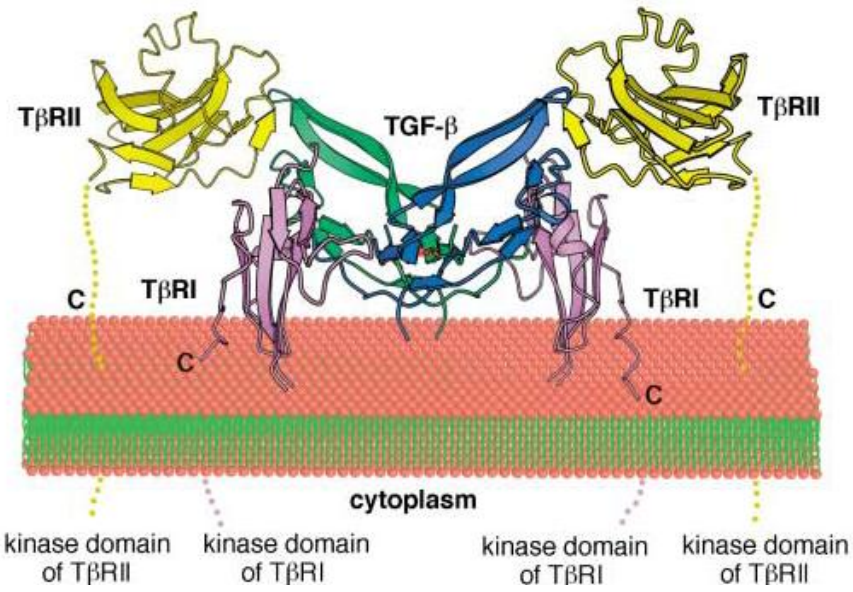
(ALK5, případně ALK1) na povrchu buněk. Receptorové serin/threonin kinázy fosforylují proteiny Smad, které po této aktivaci utvářejí heteromerní komplexy se Smad4 a putují do jádra, kde působí jako transkripční faktory a regulují transkripci cílových genů.

Trasformační růstový faktor beta je ale také důležitým imunomodulátorem a reguluje protizánětlivé působení, což má význam v jeho protektivní roli v patogenezi cévních onemocnění, jako je např. ateroskleróza. Bylo zjištěno, že buňky endotelu a hladkosvalové buňky jsou silně inhibovány TGF - β, který potlačuje také funkci makrofágů a leukocytů.

TGF - β je silný protizánětlivý faktor, má protektivní roli v aterogenezi. Endoglin antagonizuje inhibiční účinky TGF - β a přispívá tak k proliferaci, migraci, k tvorbě endoteliálních buněk v kapilárách, což jsou klíčové body angiogeneze. Navíc, endoglin je převážně exprimován v angiogenních endoteliálních buňkách a jeho exprese bývá zvýšená při tumorigenezi. Exprese endoglinu inhibuje TGF - β - dependentní odpovědi buněčné proliferace a PAI - 1 exprese.

U savců jsou známy tři izoformy: TGF - β_1, TGF - β_2 a TGF - β_3. TGF - β je sekretován v latentní formě. Před vazbou na své specifické receptory (typ I a II serin/threonin kinázové receptory) musí být aktivován proteázami nebo trombospondinem. Na zprostředkování signálu TGF - β se účastní jeden TβRII receptor a dva rozdílné TβRI receptory, ALK - 1 (activin receptor - like kinasa - 1) omezený na endotel a široce rozšířený ALK5. Po vazbě ligandu a aktivaci I. typu receptorů jsou signály přenášeny do jádra prostřednictvím intracelulárních efektorů, nazývaných Smad. Zatímco aktivace ALK1 indukuje fosforylaci Smad1, Smad5 a Smad8, ALK5 podporuje fosforylaci Smad2 a Smad3 [60].

Obrázek č. 12 Strukturní model kompletního extracelulárního receptorového komplexu TGF - β [67]



Strukturní model kompletního extracelulárního receptorového komplexu TGF - β. Tato modelová struktura se nachází podél plazmatické membrány. C - terminální konce vstupují do plazmatické membrány.

3.1.3 Role TGF - β v imunitním systém

Proteiny TGF – β jsou všudy přítomné v lidském organismu a mají svou roli v téměř každém biologickém procesu. Co se týká imunitního systému, TGF - β má důležitou funkci v modulaci imunity, má pleiotropní a významné účinky na imunitní systém. TGF - β je považován za cytokin s nejvýraznějšími imunosupresivními účinky, který byl až do dnešního dne popsán. Imunosupresivní potenciál TGF - β významně podporuje maligní buněčný růst.

Stěžejní funkcí TGF - β v imunitním systému je udržování imunitní tolerance díky regulaci lymfocytární proliferace, diferenciace a přežití. Navíc TGF - β moduluje aktivaci a rozpoznání zánětlivých odpovědí. To se děje díky regulaci chemotaxe, aktivace, a přežití lymfocytů, NK buněk, dendritických buněk, makrofágů, žírných buňek, a granulocytů [69]. Regulační aktivita TGF - β je závislá na stavu diferenciace buněk a na přítomnosti zánětlivých cytokinů a kostimulujících molekul. Souhrně TGF - β omezuje rozvoj imunopatologie k vlastním nebo nezhoubným antigenům bez zahrnutí imunitní odpovědi k patogenům.

TGF - β může vyvolat imunosupresi: potlačuje proliferaci a funkce LAK (lymfokine-activated killers) buněk, snižuje produkci IFN - α, IFN - γ, TNF, IL - 2, IL - 6, IL - 12. Omezuje schopnost fagocytózy a cidie makrofágů a granulocytů, inhibuje

cytotoxicitu T lymfocytů a NK buněk a tvorbu perforinu. Nadměrná tvorba TGF - β vede také k nadměrné expozici některých adhezních molekul, např. CD44 a integrit, což je proces přítomný u chronického zánětu a fibrotizace a pravděpodobně i u metastazování nádorů [9].

Imunitní odpověď je kontrolována několika inhibičními mechanismy. Tyto mechanismy zahrnují regulační T buňky. Mezi regulačními T lymfocyty jsou důležité Foxp3-expressing regulační T - buňky (Treg), NKT buňky, a Tr1 buňky. TGF - β a Foxp3-expressing Treg buňky jsou zásadní pro udržení vlastní tolerance a imunitní homeostázi. Supresivní imunitní funkce TGF - β a Treg buněk jsou obecně potvrzeny a extenzivně studovány. Výsledky nedávných studií nicméně odhalily prospěšnou roli TGF - β a Treg buňek při utváření imunity během zánětlivé odpovědi.

Při deregulaci TGF - β a/nebo Treg dochází k různým imunopatologiím. Navíc, se vyskytují různé nové terapeutické přístupy k terapii odchylek imunitního systému prostřednictvím manipulace s funkcemi TGF - β a Treg a mají slibné výsledky.

Důkazy získané v rámci studií procesu karcinogeneze na zvířecích experimentálních modelech ukázaly, že maligní nádory vznikají významně častěji u imunosuprimovaných hostitelů, což svědčí o centrální roli imunitního dozoru v patogenezi nádorového onemocnění. Imunitní systém je schopen za normálních okolností rozeznávat a reagovat na velké množství antigenů. Nádorové buňky jsou však schopné nápadně omezit imunitní reakce proti nim namířené, a to buď navozením tolerance vůči nádorovým antigenům, nebo aktivní imunosupresí. V procesu navození tolerance a útlumu imunitní odpovědi na nádorové antigeny mají centrální úlohu regulační T lymfocyty. Regulační T lymfocyty produkují imunosupresivní IL - 10, TGF - β a zvyšují expresi inhibičních molekul, jako je např. CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; antigen asociovaný s cytotoxickými T- lymfocyty 4) [69].

Některé T lymfocyty (např. regulatorní T - buňky) uvolňují TGF - β_1 pro inhibici jiných T buněk. TGF - β_1 může potlačovat sekrecia aktivitu mnoha jiných cytokinů, včetně INF-γ, TNF - α a jiných interleukinů. Může také snižovat expresi cytokinových receptorů, jako je IL - 2 receptor. TGF - β_1 může také snižovat expresi některých cytokinů T lymfocyty a podporovat jejich proliferaci, zvláště pokud jsou buňky nezralé.

3.1.4 Význam TGF - β v rozvoji nádorových onemocnění

TGFβ hraje centrální úlohu v regulaci řady buněčných funkcí jako je růst, diferenciace, apoptóza, adheze a motilita, což jsou procesy změněné u malignit a při rozvoji nádorových

onemocnění. TGFβ působí na buňky hladké svaloviny, na buňky cévního endotelu a buňky pojivové tkáně.

Transformující růstový faktor β potlačuje odezvy imunitního systému a omezuje produkci superoxidových radikálů. Experimentální studie *in vitro* i *in vivo* prokázály, že působí jak inhibičně, tak i stimulačně na angiogenezi a to v závislosti na experimentálních podmínkách. Během onkogeneze může uplatnit oba efekty. V počátečním stádiu vývoje nádoru inhibuje proliferaci. Jakmile však nádorové buňky uniknou antimitotickému působení transformujícího růstového faktoru beta, začíná TGF - β podporovat buněčnou invazi, metastazování a nepřímo tak vytváří vhodné prostředí stimulací neovaskularizace [16].

TGF - β účinkuje cestou signální transdukce za účasti SMAD proteinů. Nejprve se naváže na transmembránový receptor, následně dochází k jeho fosforylaci a aktivaci SMAD proteinů (SMAD2, SMAD3) a vytvoření heteromerního komplexu se SMAD4, čímž je umožněn přenos do jádra, kde je regulována (potlačena) transkripce cílových růstových genů a tím i tvorba příslušných proteinů.

Běžně má TGF - β antiproliferační efekt (tumorová suprese). Při genové alteraci některých komponent jeho signálních drah může být tento efekt potlačen a dochází pak k nekontrolovanému dělení. Na SMAD-proteiny působí nejen koaktivátory ale též korepresory (např. TGIF – tj. inhibitor TGF, resp. komplex TGIF - SMAD2 nebo Ski/Sno). SMAD-protein, který se dostane do jádra, vytváří 2 protichůdně působící transkripční komplexy: jeden tvoří s koaktivátory a druhý s korepresory. Bylo prokázáno, že cesta signální transdukce využívající SMAD - proteiny může být spřažena také s jinými signálními cestami využívajícími STAT - proteiny nebo Ras - proteiny [69].

Cytostatické a apoptotické funkce TGF - β pomáhají potlačit růst savčích tkání., pokud jsou tyto funkce oslabeny nebo modifikovány, dochází k rozvoji hyperproliferativních onemocnění, karcinogenezi. Nicméně transformované nádorové buňky mohou naopak produkovat cytokin TGF - β v nadměrném množství a vytvářet tak místní imunosupresivní prostředí. Lokální imunosuprese podporuje růst nádoru a exacerbaci invazivního a metastatického chování vlastních nádorových buněk.

TGF - β buněčná signalizace inhibuje buněčný růst, inaktivace jeho signalizace přispívá k tumorigenezi. Mutace způsobující nádory byly nalezeny u obou typů receptorů TGF - β, typu I i II a u Smad proteinů. TGF - β receptor typu II bývá inaktivovaný mutací u většiny případů karcinomů GITu a Smad4 u nejméně poloviny všech výskytů karcinomu pankreatu.

3.1.5 Role TGF - β ve fibrogenezi

TGF - β je multifunkční cytokin, který se uplatňuje v četných biologických situacích provázejících zejména různá chronická onemocnění. Jeho produkce je řízena geneticky a polymorfizmus genu pro TGF - β individuálně předurčuje úroveň této produkce. TGF - β reguluje proliferaci a diferenciaci buněk, dále je jedním z jeho hlavních účinků stimulace fibrogeneze. Profibrogenní účinnost se uplatňuje fyziologicky např. při hojení ran, ale i v celé řadě chorobných procesů, jako je diabetická nefropatie, plicní fibróza, postiradiační fibróza nebo chronická glomerulonefritida. U příjemců transplantovaných orgánů TGF - β podporuje stimulací fibrogeneze rozvoj chronické rejekční nefropatie [28].

Jestliže je produkce TGF - β dlouhodobě stimulována nebo není ukončena včas, vzniklý nadbytek udržuje chronicitu zánětlivého procesu se zmnožením mezibuněčné hmoty (kolagenu, proteoglykanů, hyaluronátů a fibrinu), a s fibrotizací. Postižen může být jeden systém nebo několik systémů [38].

TGF - β bývá označován jako klíčový mediátor renální a jaterní fibrózy u člověka i u zvířecího modelu. Fibrogeneze je komplexní proces, ve kterém se uplatňují interakce mezi různými buňkami, které jsou schopné syntézy a sekrece proteinů extracelulární matrix (ECM) a růstovými faktory schopnými indukovat aktivaci, proliferaci a diferenciaci potenciálních fibrogenních buněk. Některé buňky, např. glomerulární mesangiální buňky – GMC, nebo jaterní steatické buňky - HSC jsou schopné ovlivňovat proliferaci a sekreci ECM. Tyto procesy jsou zásadní pro rozvoj a progresi orgánové fibrózy, respektive renální a jaterní fibrózy. Chování GMC i HSC buněk může být regulováno a modifikováno pomocí TGF - β, který je považován za zásadní pro zprostředkování renální a jaterní fibrózy u člověka i na zvířecím modelu [46].

TGF - β_1 indukuje proliferaci v lidských renálních fibroblastech a tento proces bývá zprostředkován FGF - 2 (fibroblast growth factor; fibroblastový růstový faktor). Indukce a proliferace pomocí TGF – β_1 přes indukci FGF - 2 může hrát významnou roli v autonomii růstu renálních fibroblastů a tedy i v patogenezi lidské fibrogeneze.

Glomerulární mesangiální buňky jsou mezi ostatními renálními buňkami velmi dobře identifikovatelné pro TGF - β. Mají centrální význam pro glomerulární fibrogenezi. Endoglin bývá vyjádřen na GMC a tato exprese je upregulována pomocí TGF - β_1. Endoglinová exprese navíc omezuje bazální i TGF - β_1-stimulovanou akumulaci kolagenu v lidských glomerulárních mesangiálních buňkách. Výstupy různých experimentálních studií potvrzují, že endoglin a TGF - β majízásadní význami v patogenezi renální fibrózy [12].

U jaterní fibrózy účinkuje TGF - β jako hlavní profibrogenní cytokin, který v souladu s ostatními růstovými faktory podporuje transdiferenciaci jaterních steatických buněk v myofibroblasty. Pro efektivní buněčnou odpověď zprostředkovanou TGF - β je nutná exprese receptorů I aII i III. V přítomnosti etanolu, má TGF - β v hepatocytech prosteatotickou funkci díky snižující se expresi ADH1 (alcohol dehydrogenase; alkohol dehydrogenáza). Její nízké hladiny korelují se závažností jaterního poškození při chronickém abúzu alkoholu. V experimentálních pokusech byl TGF - β indukován v játrech myší po chronickém poškození alkoholem. TGF - β také zesiluje etanolem navozený oxidační stres a hepatickou toxicitu, navíc indukuje expresi genů navozujících lipidogenezi, oxidativní metabolický stres a fibrogenezi [23] .

Inhibiční účinek endoglinu na signální dráhu ALK5 byl potvrzen u různých typů buněk, zatím však neexistují žádná další přesvědčivá data o funkční roli endoglinu u HSC buněk.

Zásadní roli má TGF - β v udržení rovnováhy mezi zánětem a fibrotizací v aterosklerotickém plátu.

Detailní porozumění úlohám TGF - β v procesu fibrózy může vést k objevu nové klinicky užitečné antifibrotické léčby. Dokládá to schopnost protilátek proti TGF - β omezovat u experimentálních zvířat proces fibrotizace a sklerotizace, např. u zářením vyvolané plicní fibrózy, alkoholem nebo toxickými látkami vyvolané fibrózy jater a glomerulonefritidy vyvolané imunokomplexy, ischémií, aj.

3.1.6 Genová mutace receptoru pro TGF - β vedoucí k Marfanovu syndromu

Genová mutace receptoru pro TGF - β se klinicky manifestuje jako onemocnění nazývané jako Marfanův syndrom. Jedná se o poměrně vzácné dědičné onemocnění pojiva. Patří mezi systémová onemocnění zvaná fibrillinopatie. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění (časté ale bývají i zcela spontánní mutace) pojivových tkání s incidencí kolem 1 : 5 - 10 000. Podkladem onemocnění jsou mutace genu FBN - 1 kódujícího syntézu fibrilinu (strukturální protein, složka pojivové matrix), který je lokalizován na chromozomu 15. Dosud bylo popsáno více než 150 mutací tohoto genu.

Pro pacienty s Marfanovým syndromem je charakteristický nadměrný vzrůst, arachnodaktýlie (nemocný má dlouhé končetiny a dlouhé tenké „pavoučí“ prsty), poškozené vazivo oční čočky a oslabení její funkce, kdy nemocný začne být krátkozraký a srdeční komplikace jako např. narušení stěn krevních cév a jejich funkce, disekce aorty, různé

poruchy funkce srdečních chlopní (např. vyhřeznutí mitrální chlopně, aortální rozšíření vyúsťující pravděpodobně až v disekce aorty). Výchozím defektem u Marfanova syndromu je chybná syntéza glykoproteinu fibrillinu I, důležité součásti elastických vláken. Ukázalo se, že fenotyp Marfanova syndromu (MS) může být ovlivněn antagonismem TGF - β. Symptomy MS se zdají být konzistentní s onemocněním pojiva, mechanismus onemocnění je však spíše spojen se sníženou sekvestrací TGF - β fibrillinem.

Molekulární podstatou onemocnění jsou mutace genů, na základě kterých rozeznáváme 2 typy Marfanova syndromu. Obvykle bývá postižen postižen gen pro fibrilin 1 – FBN 1 (typ IMS), ale byla popsána i mutace v genu receptoru transformačního růstového faktoru beta TGFBR2 (typ II MS). Typ I je způsoben mutací genu FBN1 - Gen FBN1 leží na 15q21.1, kóduje fibrilin 1. Fibrilin 1 je glykoprotein o molekulové hmotnosti 350 kDa, v oblasti extracelulární matrix spojuje spolu s dalšími proteiny ve vlákna specifického tvaru. Vlákna fibrilinu se mohou vyskytovat samostatně nebo vytvářet jakési lešení, do něhož se ukládá tropoelastin a vyzrává v elastin. Defekt fibrilinu se projeví jako pokles pružnosti a pevnosti vaziva, zejména vaziva elastického.

Typ II je způsoben mutací genu TGFBR2 - gen TGFBR2 leží na 3p22, kóduje membránový Ser/Thr receptor pro TGF - β. Jako gen, jehož mutace způsobuje Marfanův syndrom, byl popsán v roce 2004. Byla popsána i bodová mutace, na pozici 1524, kdy dochází k záměně A za G. Díky této bodové mutaci dochází ke špatnému sestřihu. Posléze byly popsány 3 další missence mutace genu TGFBR2 způsobující Marfanův syndrom. Klinická manifestace mutací receptoru TGF - β poukazuje na význam TGF - β ve vývoji vaziva [41].

Studie publikovaná v roce 2009 v časopise Circulation se zabývala vlivem losartanu, který blokuje aktivaci TGF - β. Losartan samotný nebo v kombinaci sléčbou β-blokátory, vede ke snížení v poměru ke změnám rozměru v aortálním kořeni v porovnání s terapií samotnými β - blokátory[44]. Tato data představují, že dysregulace TGF - β, autokrinního a parakrinního růstového faktoru zahrnutého v mnoha biologických procesech, přispívá k multisystémové patogenezi MFS. Koncentrace TGF - ß poklesla jak po obou lécích v monoterapii, tak po jejich kombinaci.

Vědci přišli na to, že mnoho příznaků Marfanova syndromu je způsobeno nadměrnou aktivitou proteinu TGF - β (transforming growth factor), jenž reguluje činnost buněk. Svaly myší s Marfanovým syndromem obsahovaly jizevnatou tkáň mezi abnormálně slabými svalovými vlákny, které také nesly znaky nadměrné aktivity proteinu TGF - β.

Výzkumníci z toho vyvodili, že blokádou aktivity TGF - β by mohli obnovit normální svalovou strukturu a funkci. Nejprve injikovali myším s Marfanovým syndromem protein, který váže TGF - β a inaktivuje ho. Tento blokátor způsobil, že svalová vlákna postižených myší ve srovnání s kontrolními myšmi bez aplikovaného blokátoru začala růst. Po šesti měsících léčby myši vykázaly signifikantní redukci svalového poškození, celkovou restauraci svalové struktury, výrazně vyšší úchopovou sílu ve svých předních i zadních končetinách a méně únavy v repetitivních testech.

Další studie provedená na univerzitě Johns Hopkins se zaměřila na to, v jaké míře TGF - β vede k oslabení svalové architektury. Autoři předpokládali, že normální svalovina se umí mobilizací vlastních kmenových buněk sama reparovat. V průběhu studie však zjistili, že nadměrná aktivita proteinu TGF - β tuto regeneraci svaloviny blokuje [48].

3.2 Endoglin

Endoglin neboli CD 105 je transmembránový homodimérický glykoprotein, skládá se ze 2 podjednotek o 90-95kDa, které jsou propojeny pomocí disulfických S – S můstků. Nachází se na povrchu buněk, kde je součástí receptorového komplexu TGF - β (transformující růstový faktor beta).

Byl poprvé popsán Harutou v r. 1986, byl objeven - rozpoznán monoklonální protilátkou 44G4 jako jeden z antigenů buněčných membrán nemocných leukemií vycházejících z buněk pre - B řady lidských endoteliálních buněk a byl považován za molekulu spojenou s nádorovým bujením [38]. Ve větším množství byl nalezen v růstových endoteliích a v nádorových buňkách [44].

Jeho exprese je velmi silná na endotelu vaskularizovaných nádorů, popsán byl i na stromálních buňkách solidních nádorů. Byly popsány dvě endoglinové izofoty (L a S), které se od sebe liší v počtu aminokyselin a délce cytoplazmatických částí. L endoglin je složen z 633 aminokyselin, S endoglin je tvořen sekvencí 60 aminokyselin.

Endoglin se nachází jak ve formě vázané na membrány, tak se vyskytuje i v solubilní formě.

Endoglin je ve zvýšené míře exprimován na endotelu cévně zásobených nádorů, popsán byl i na stromálních buňkách solidních nádorů. CD 105 bývá exprimován také na povrchu mnoha dalších - nenádorových buněk, jako jsou např. makrofágy, erytroidní prekurzory, buňky syncytiotrofoblastu pozdní placenty, fibroblasty kostní dřeně.

Gen kódující endoglin je lokalizován na chromozomu 9q34 a skládá se ze 14 exonů. Mutace tohoto genu jsou významné pro autozomálně dominantní cévní onemocnění známé jako HHT 1 – tj. hereditární hemoragická teleangiektázie typu 1. Mutantní formy endoglinu jsou degradovány nitrobuněčně, proto bývá HHT 1 spojována se sníženou hladinou endoglinu na povrchu endotelových buněk a aktivovaných monocytů [10].

Endoglin váže růstové faktory TGF - β_1 a - β_3, nikoliv však TGF - β_2 (U savců se TGF - β rodina vyskytuje ve třech izoformách jako TGF – β_1, TGF - β_2 a TGF - β_3), což značí pro specificitu izoformy TβRII receptoru. Endoglin koprecipituje spolu se serin-threonin kinázami. Endoglin sám o sobě není schopen nadvázat se na TGF - β, aby mohlo dojít k navázání TGF - β_1 a -β_3 je požadována současnou koexprese receptoru TβRII. Současné studie ukazují navíc na další možné interakce a vazby endoglinu a to s aktivinem - A, BMP - 7 (kostním morfogenetickým proteinem) a BMP - 2. Interakce endoglinu s aktivinem - A a BMP - 7 je zprostředkována přes aktivinové receptory typu II, ActRII a ActRIIB, bez ohledu na koexpresi receptoru typu I. Endoglin váže BMP - 2 interakcí s ligandy vážícími receptory typu I (ALK3 a ALK6).

3.2.1 Struktura endoglinu

Endoglin je strukturálně homodimer o hmotnosti 180 kDa. Je považován za funkční koreceptor TGF - β_1 a TGF - β_3. Skládá se ze dvou monomerů, z jednotek S a L, které jsou navzájem propojeny disulfidickým S-S můstkem. Každý z těchto monomerů se skládá z N - terminálního signálního peptidu, 2 dlouhých extracelulárních domén (orfan doména a ZP doména), krátkého transmembránového regionu a krátkého C - konce. Jednotka S se skládá z 633 aminokyselin, z nichž 47 tvoří cytozolickou doménu. Jednotka L obsahuje 600 aminokyselin, z toho 14 jich je ukotvených v cytoplazmě. Obě izoformy jsou konstitutivně fosforylovány.

Endoglin patří do rodiny extracelulárních proteinů ZP - zona pellucida. Tyto proteiny mají doménu ZP skládající se z 260 aminokyselin s 8 zachovanými cysteinovými zbytky v blízkosti membrány. ZP doména je rozdělena na 2 ZP subdomény, které se účastní endoglin receptorové oligomerizace; subdomény se nazývají ZP - N (zahrnuje oblast obklopující aminokyselinové zbytky Gln458 – Ser457) a ZP - C (aminokyselinové zbytky Pro458 - Gly587) [38].

Konzervovaná sekvence – strukturální motif RGD - je lokalizovaný na ZP - N subdoméně extracelulární oblasti. Tento motiv proteinu vedl k hypotéze, že endoglin

interaguje s integriny nebo jinými RGD vázajícími receptory. Funkce RGD sekvence v lidském endoglinu však pravděpodobně odráží současnou adaptaci u člověka, protože tento motiv chybí u myších, prasečích, krysích i psích proteinů endoglinu.

Primární strukturu endoglinu naznačuje 4 N - glykosylace na N - terminální doméně a pravděpodobně O - glykan doméně, která je bohatá na serinové a threoninové zbytky proximálně k membráně-zasahující doméně. Experimentální studie využívající specifické glukosidázy potvrdily glykosylaci endoglinu [44].

Cytosolický, ze 47 aminokyselin skládající se zbytek predominantní L - isoformy endoglinu se skládá z oblasti proteinu s nejvyšším stupněm konzervace mezi endogliny u rozdílných savčích druhů, stejně tak jako homologní protein beta glykan.

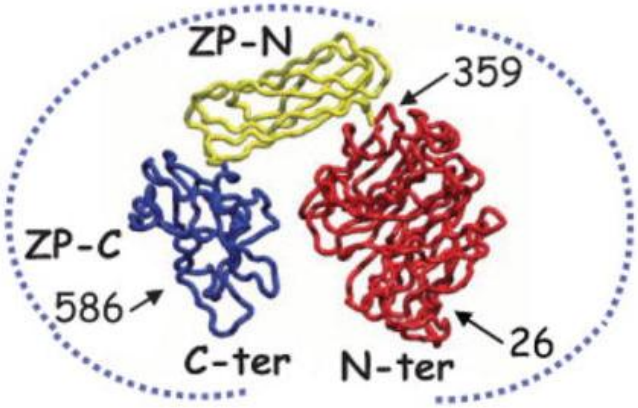
Potranskripční úpravou, RNA – sestřihem, izoformy lidského endoglinu dochází k expresi krátkého S - endoglinu s odlišnou cytosolickou doménou 14 AK. Obě cytosolické domény mohou být fosforylovány serin a threonin kinásami, včetně receptorů TGF - β typu I a II [24]. Krátká izoforma endoglinu byla objevena u myší. Izoforma L - endoglinu a beta glykanu obsahuje konsenzus PDZ - vázající motiv (SerSerMetAla) přítomný na karboxylovém C - konci, izoformě S - endoglinu tento motiv chybí. L - forma endoglinu je spojována s regulací adhezivních vlastností endoglinu a předpokládá se, že tato isoforma by mohla mít regulační významn pro funkci endoglinu.

Každý z monomeru endoglinu obsahuje 3 dobře definované domény. Na N - konci se nachází rozsáhlá doména s aminokyselinovými zbytky Glu26 – Ile359. Tato doména nenaznačuje jakoukoliv podobnost s ostatními doménami či s doménami jiných peptidů nadrodiny TGF a proto byla nazvána jako Orfan doména. Za Orfan doménou následuje sekvence kódující konsenzus ZP domény (AK zbytky Gln360 – Ser586). Tato část je rozdělena do 2 subdomén – ZP - N dlouhá oblast a ZP - C.

Více jak 1/3 extracelulárních domén endoglinu se skládá ze shodných ZP domén, což naznačuje význam této struktury pro funkci endoglinu. ZP doména se nachází u mnoha jiných extracelulárních proteinů a všechny tyto proteiny mají běžné biologické vlastnosti jako endoglin: všechny byly detekovány v solubilní formě, jedná se o membránové proteiny s hydrofobními sekvencemi na C - konci, jsou mohutně glykosylované a objevují se ve větším množství v příslušných tkáních. Funkce ZP domény se liší svou funkcí u savců a nesavců. ZP homologní region o cca 260 aminokyselinových zbytcích obsahuje 8 striktně konzervovaných aminokyselinových zbytků, díky kterým se mohou tvořit intramolekulární disulfidické můstky. Tyto cysteinové jednotky jsou evolučně konzervovány u endoglinu různých savčích druhů – člověka, myši, krysy, prasete nebo psa. ZP doména je jednotkou

pro polymerizaci extracelulárních proteinů, N - terminální region odpovědný za interakce protein - protein.

Obrázek č. 13 Předpokládaná struktura endoglinu [10]



Molekula endoglinu je zobrazena barevně podle 3 typů definovaných domén. Orfan doména zahrnuje aminokyselinové zbytky Glu26 - Ile359 (červeně), zatímco ZP doména obsahuje aminokyselinové fragmenty Gln360 - Gly586. ZP - N a ZP - C subdomény jsou naznačeny žlutě a modře. Čísla aminokyselin odpovídají přibližnému umístění umístění regionů v jednotlivých globulárních doménách.

Od té doby, co je endoglin známý jako součást TGF - β receptorového systému, se uvažuje o tom, že ZP doména endoglinu by mohla mít význam pro jeho propojení s TGF - βI receptorem a s TGF - βII receptorem pro vznik klastru a signalizaci komplexu TGF - β. Rozmístění ZP domén pozorované na 3D modelu. Extracelulární doména endoglinu interaguje s TGF - βI a s TGF - βII a oblast této interakce (Arg437-Gly558) je uzavřena subdoménou ZP - C. TGF - βI receptor interaguje nejen se subdoménou ZP - C ale také s druhou oblastí vloženou mezi AK zbytky Glu26 – Arg437 vyznačené uvnitř ZP - N subdomény.

Rekonstrukce trojrozměrné struktury zobrazuje endoglin jako kopuli skládající se z antiparalelně orientovaných monomerů uzavírajících dutinu na jednom konci. Při vysokém rozlišení je patrné, že se každá ze subjednotek endoglinu skládá z 3 dobře definovaných domén, včetně 2 ZP regionů a 1 orfan domény, které jsou organizovány do tvaru otevřeného písmene U. Studie molekulární struktury endogliny byly provedeny použitím solubilní formy extracelulární domény endoglinu [10].

3.2.2 Funkce endoglinu

Endoglin (CD105) je transmembránový protein, tvoří součást receptorového komplexu pro TGF – β. Moduluje signalizaci TGF - β. Jedná se o homodimerickou strukturu. Endoglin byl objeven jako molekula asociovaná s tumorgenezí. Poprvé byl popsán r. 1986 na leukemických buňkách, tehdy byl pokládán za molekulu asociovanou s nádorovým bujením. Vyskytuje se však i na normálních endotelových buňkách. Jeho exprese je velmi silná na endotelu vaskularizovaných nádorů, popsán byl i na stromálních buňkách solidních nádorů.

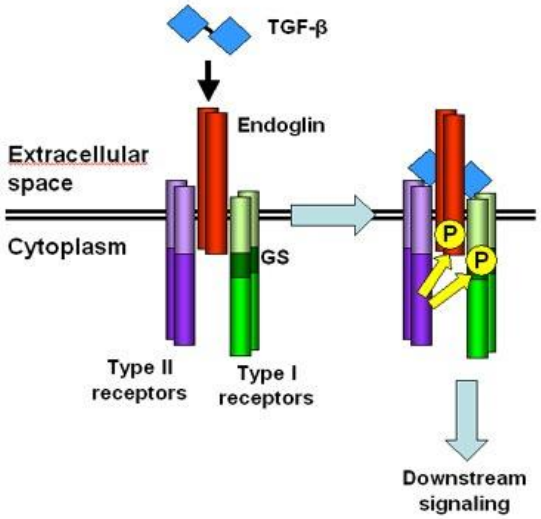
Častěji bývá exprimován na cévním endotelu nádorových tkání než na tkáních normálních a ve zvýšené míře se nalézá na rostoucích a nádorových endoteliích [85].

Endoglin má zásadní vliv na angiogenezi a jako koreceptor pro TGF - β se účastní TGF – β - zprostředkované signální transdukce. Ovlivňuje tak buněčnou diferenciaci a proliferaci. Podílí se také na buněčné migraci, ovlivňuje vaskulární remodelaci a má význam v angiogenezi a během vyvoje kardiovaskulárního systému [24].

Experimentální mutace genu pro endoglin u myši způsobují různé vývojové poruchy kardiovaskulárního systému. Heterozygotně knockoutované myši mají normální délku života, vzhled i fertilitu, mají však predispozici k rozvoji cévních chorob podobných hereditární hemoragické teleangiektazii. Homozygotně knockoutované myši umiraji ještě v průběru nitroděložního vývoje na těžké defekty vaskulární organizace a poruchu vývoje srdce.
Kromě formy vázané na membrány se endoglin vyskytuje také v cirkulující solubilní formě.

CD105 je složkou receptorového komplexu TGF - β, jedná se o cytokin s pleiotropními účinky, moduluje angiogenezi regulací různých buněčných funkcí včetně proliferace, diferenciace a migrace. CD105 váže několik komponent nadrodiny TGF - β včetně aktivinu - A, BMP - 7 a BMP - 2 [11]. Zvláště s vysokou afinitou váže TGF - β_1 a – β_3 spojením s receptorem typu II pro TGF - β. Vazbou TGF - β na CD105 se snižují hladiny fosforylovaného endoglinu [47]. Nadměrná exprese endoglinu antagonizuje několik buněčných odpovědí TGF - β_1, zatímco jeho snížená exprese zesiluje buněčné odpovědi na podněty TGF - β_1 [38].

Obrázek č. 14 Účast endoglinu v TGF - β signální transdukci [85]



Účast endoglinu na TGF – β - zprostředkované signální transdukci. TGF – β se váže na receptor TGF - β typu II (TβRII). Navázaná liganda (TGF - β) TβRII ovlivní a ansaktivuje receptor TGF - β typu I (TβRI), což vyústí ve fosforylaci GS domény. TβRII a aktivovaný TβRI fosforylují serin/threoninové zbytky cytosolické domény endoglinu. Fosforylovaný TβRI indukuje aktivaci downstream signalizace [38].

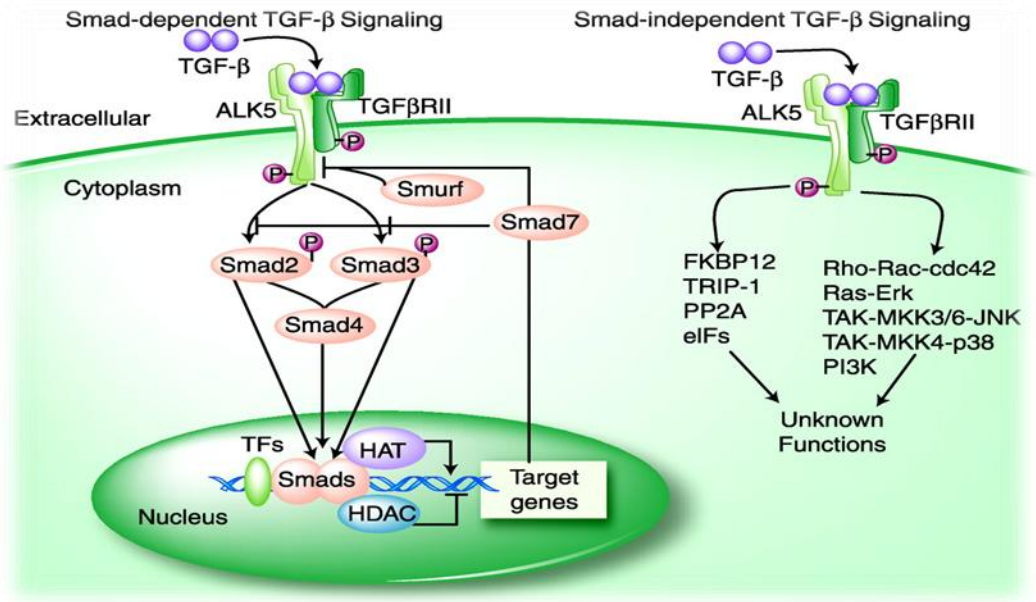
3.2.3 Buněčná signalizace endoglinu a TGF - β

Endoglin tvoří součást receptorového komplexu TGF - β a reguluje buněčnou signalizaci TGF - β. Rodina TGF - β je důležitou skupinou růstových faktorů regulujích mnoho buněčných procesů, jako např. proliferaci, diferenciaci a apoptózu.

Signalizace je započata navázáním ligandu na receptor se serin/threonin kinázovou aktivitou. TGF - β ligandy mají velkou afinitu k TβRII a podle vazby k tomuto receptoru je ovlivňován specifický TβRI. Jakmile je utvořen tento heteromerický komplex dvou typů receptorů – TβRII a TβRI, dochází k aktivaci TβRI a následuje fosforylace a signalizace molekul tzv. Smads. Smads proteiny šíří signál do jádra. Jedná se o jaderné efektory TGF - β receptorů. Existují 3 rozdílné typy Smads proteinů: R - receptory regulovaní, Co - komediátorové proteiny Smad a I – inhibiční Smads. R - Smads, označované jako Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 a Smad8 jsou fosforylovány receptorem typu I, buď ALK1 nebo ALK 5. ALK1 díky Smad1, Smad5 a Smad8 transkripčních faktorech indukuje proliferaci a migraci endoteliálních buněk, zatímco ALK5 přes Smad2 a Smad3 inhibuje proliferaci a migraci buněk endotelu. Aktivované R - Smads interagují s Smad4 (Co - Smad), formují tak komplex, který translokuje do jádra, kde reguluje transkripční aktivitu mnoha

cílových genů. Konečně, I - Smads, Smad6 a Smad7, předcházejí aktivaci R - Smads díky kompetici o interakci s receptorem, vyvolávající degradaci nebo defosforylaci receptoru typu I [67].

Obrázek č. 15 Signalizace TGF - β a její závislost na Smad proteinech [35]



Přehled TGF - β signalizace závislé na Smad proteinech v porovnání se TGF - β signalizací na Smad proteinech nezávislé. Signalizace TGF - β je zahájena vazbou na receptor - heterodimerický komplex tvořený ALK5 (activin - like receptor kinase 5) a TGFβRII. Obrázek popisuje obě cesty buněčné signalizace (Smad dependentní dráhu i Smad independetní dráhu), dále je zobrazena negativní zpětnovazebná regulační smyčka zprostředkovaná přes Smurf a Smad7.

Endoglin, který je převážně exprimován na vaskulárním endotelu, je současně považován za TGF-βIII receptor (TβRIII), a váže jen ligandy, pokud je spojen s TβR-II. Ukázalo se, že endoglin je nezbytný pro TGF-β/ALK1 signalizaci. Naopak v jiné studii [64] endoglin deficientní buňky proliferovali rychleji a vykazovaly zvýšenou aktivitu v signální dráze ALK1/Smad1, ale nezměněný ALK5/Smad 2 signální dráha. Navzdory různým výsledkům experimentálních studií se předpokládá, že exprese endoglinu určuje kapacitu růstu endoteliálních buněk. V nepřítomnosti endoglinu, buňky endotelu nerostou a ALK1 signalizace je narušena, zatímco ALK5 sigmalizace je stimulována. Naopak, nadměrná exprese endoglinu omezuje TGF - β/ALK5 signalizaci inhibicí transkripční aktivity Smad3. Endoglin snad takto funguje jako regulátor TGF - β zprostředkovaného růstu endoteliálních

buněk skrz stimulaci TGF - β/ALK1 signalizace a nepřímou inhibicí signalizace TGF - β/ALK5. Tímto mechanismem podporuje aktivační fázi angiogeneze. Důležitým znakem ALK1 signalizace je závislost na aktivitě ALK5, což bylo prokázáno při pozorování na ALK - deficientních buňkách endotelu. Nicméně to, jak endoglin ovlivňuje TGF - β/ALK1 signalizaci zůstává nejasné; endoglin by mohl být součástí tvorby heteromerického komplexu mezi ALK1 a ALK5 a nebo součástí interakce Smad1/5 a ALK1 vedoucí k fosforylaci Smad1/5 komplexu).

Obrázek č. 16 Obecné schéma signalizace TGF - β [67]

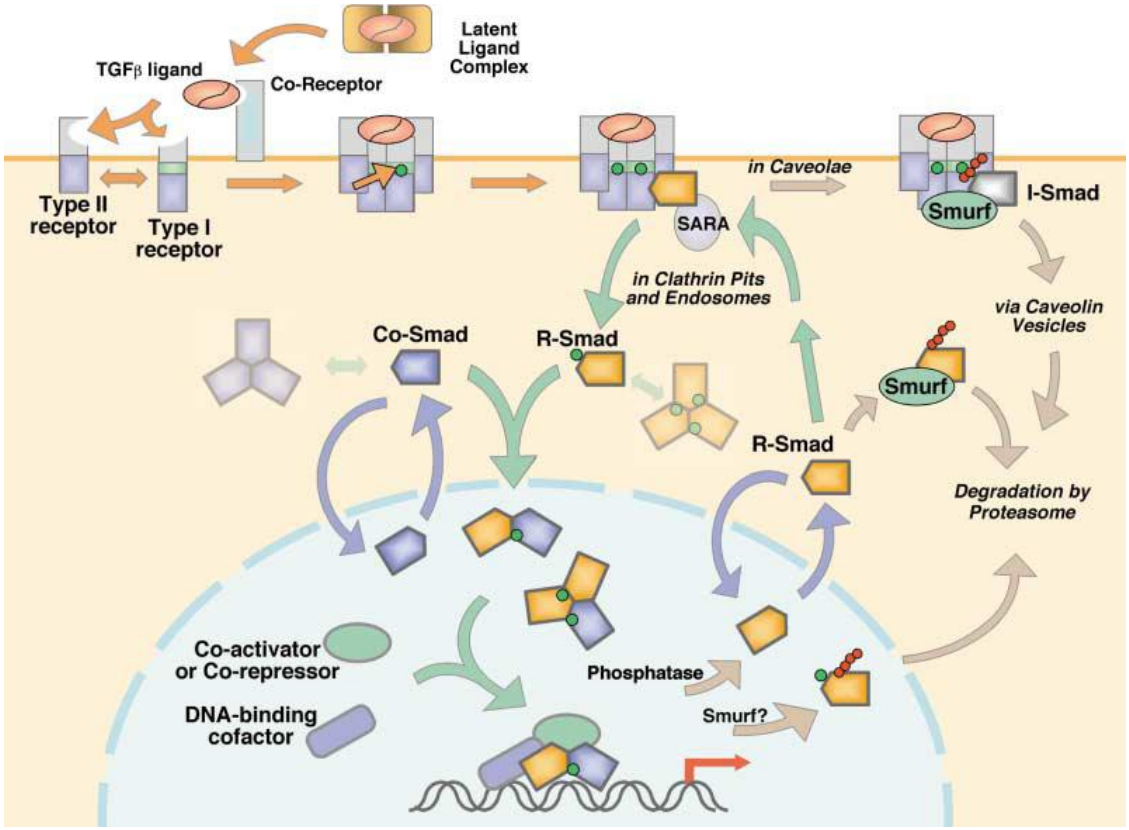


Schéma TGF-β signalizace z buněčné membrány do jádra: Šipky na obrázku naznačují směr signalizace a jsou barevně odlišeny: oranžově je znázorněna signalizace vedoucí k aktivaci ligand a receptorů, šedivě dráhy vedoucí ke Smad proteinům a inaktivaci, zeleně je znázorněna Smad aktivace a tvorba transkripčního komplexu, modré šipky značí Smad nukleocytoplasmický shuttling (kyvadlový pohyb). Fosfátové skupiny a ubikvitin jsou zobrazeny jako zelená a červená kolečka.

3.2.3.1 Příklady klinického využití endoglinu

Existuje nejen vázaný na membrány buněk, ale vyskytuje se také v solubilní formě. Cirkulující solubilní forma endoglinu (sCD105) byla zjištěna ve zvýšených koncentracích

v krvi u nemocných se solidními nádory a některými hematologickými malignitami. Solubilní endoglin má prognostický význam u pacientů trpících CLL (chronic lymphatic leukemia; chronická lymfocytární leukemie). Vyšší hladiny sCD105 se nacházejí v krvi nemocných s některými solidními nádory. Celková doba do progrese onemocnění bývá výrezně kratší u pacientů s nadprůměrnými hladinami cirkulujícího solubilního endoglinu. Předpokládá se, že endoglin by mohl hrát významnou roli v patogenezi a progresi CLL a vyhodnocování jeho hladin v průběhu onemocnění by mohlo přispět k lepšímu poznání angiogennich procesů uCLL a individuální prognosticke stratifikaci [3].

Mezi možné oblasti využití endoglinu patří i gynekologie a porodnictví. Mnoha studiemi jak na zvířecích modelech, tak na pacientkách, bylo prokázano, že vyšší koncentrace endoglinu v průběhu těhotenstvi jsou asociovány s následným vznikem preeklampsie. Pro stanovení diagnózy preeklampsie má stanovení sérové hladiny endoglinu společně s provedením ultrazvuku v prvním trimestru těhotenství vysokou prediktivní hodnotu. U žen s preeklampsií bývá cirkulující sCD105 zvýšený, jeho hladina obvykle prudce roste 2−3 měsíce před klinickou manifestací preeklampsie. U žen, u kterých se vyvinula později preeklampsie byly v experimentálních studiích zaznamenány v období od 17. do 20. týdne těhotenství hladiny endoglinu signifikantně vyšší v porovnání se zdravou skupinou. Placentární endoglin bývá u preeklampsie rovněž zvýšený a uvolňovaný jako rozpustný endoglin do mateřského oběhu, kde je možné ho laboratorně detekovat [6].

Dále bylo zjištěno, že hladina endoglinu exprimovaného buňkami endotelu je signifikantně nižší u pacientů s akutním infarktem myokardu (v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků). Pacienti, kteři zemřeli v prvnich 48 hodinach po infarktu myokardu, měli velmi nízké hodnoty endoglinu. Na základě těchto studií by bylo možno využít hladinu endoglinu k predikci mortality po AIM [26].

Hladiny sCD105 bývají zvýšené u pacientů s vážnou familiární hyperlipidémií, jeho výrazný pokles je možno sledovat u pacientů po zákroku extrakorporální eliminace LDL - cholesterolu. Endoglin by tak mohl být užitečným markerem pro vyhodnocení účinnosti hypolipidemické léčby a vlivu léčby na redukci aterosklerotické aktivity u pacientů s familiální hyperlipoproteinemií léčených extrakorporální eliminací LDL - cholesterolu [18].

Endoglin je možné považovat také za prognostický marker prostatického adenokarcinomu. CD105 je ve velké míře exprimován na endotelu buněk během tumorové angiogeneze a zánětu, naopak ve vaskulárním endotelu normálních tkání bývá exprimován slabě nebo vůbec. Několik studií prokázalo, že endoglin je poskytuje specifičtější a senzitivnější označení angiogeneze než jiné běžně užívané protilátky souvislého endotelu

[71]. Hladiny Endoglinu odpovídají Gleasonovu skóre, metastázám do lymfatických uzlin, stádiu tumoru a preoperativní hladině specifického prostatického antigenu PSA, ale nekorelují s hladinou CD31 (neboli PECAM - 1; transmembránový protein; exprimován na povrchu souvislého endotelu, ne však v endotelu nesouvislém. Dále je nacházen na povrchu megakaryocytů a krevních destiček, myeloidních buněk, NK buněk a některých B a T prekurzorů). Hustota mikrocév (zjištěno imunohistochemickým barvením) s exprimovaným endoglinem koreluje s přežitím pacientů, nezávisle na jiných prognostických parametrech. Angiogeneze je zásadním faktorem pro metastatické procesy a tedy i pro progresi malignit. Endoglin je slibným prognostickým ukazatelem prostatického karcinomu a mohl by být hodnotným parametrem pro predikci toho, kteří pacienti mají nižší míru přežití a vyšší riziko rozvoje metastáz. Jinými prognostickými parametry jako je Gleasonovo skóre (l0 - ti stupňové skóre, odráží klinickou agresivitu nádoru; při dosažené hodnotě větší než 7 je považováno za velmi rizikové a je spojeno s výrazně horší prognózou pacienta). Podle současných studií se endoglin pokládá za specifičtější a senzitivnější marker pro nádorové angiogeneze než CD31 a mohl by tak sloužit jako prognostický marker pro prostatický adenokarcinom [71].

S porovnáním se zdravými subjekty vyšší hladiny cirkulujícího sCD105 jsou detekovatelné v séru a/nebo plasmě pacientů se solidními a hematologickými malignitami. Ačkoliv tyto objevy dokazují, že sCD105 by mohl hrát roli v progresi kancerogeneze.

Nejvyšší koncentrace cirkulujícího sCD105 byla nalezena u pacientů s prsním a kolorektálním karcinomem s metastázemi a zvýšenými hladinami sCD105 byly detekovány v séru pacientů, kteří nepodstoupili chemoterapii [15]. Pozoruhodné je, že velmi nízké hladiny sCD105, a nepřímá korelace mezi hladinami sCD105 a hladinami solubilního TGF - β_1 (sTGF - β_1), byly nalezeny u pacientů s ET (esenciální trombocytémií) s trombotickými komplikacemi v historii. Ale vysoké hladiny sCD105 a přímá korelace hladin sCD105 a sTGF - β_1 byly detekovány u pacientů s ET bez trombotických komplikací. Cirkulující sCD105 by mohl ovlivňovat bioaktivitu a biodostupnost sTGF - β_1 u vybraných myeloidních malignit [3]. Data naznačují, že monitoring sCD105 by mohl identifikovat prvotní znaky metastáz a relapsu karcinomu u dlouhodobě sledovaných pacientů se solidními nádory a cirkulující sCD105 by mohl představovat náhradní marker of angiogenní aktivity [47].

U myeloidních hematopoetických malignit, zvýšené hladiny s CD105 byly detekovány u akutní myeloidní leukemie a u chronických myeloproliferativních onemocnění

3.2.3.2 Hereditární hemoragická teleangiektasie (HHT)

Hereditární hemoragická teleangiektázie neboli morbus Rendu-Osler-Weber je autozomálně dominantní onemocnění. Choroba postihuje přibližně 1 z 8000 pacientů. HHT je charakterizována častým krvácením z nosu, mukokutanózní teleangiektázií (tj. trvalé rozšíření kapilár viditelných na kůži v podobě červených nitek), rozvojem arteriovenózních malformací-především plic, mozku, gastrointestinálního traktu. Tyto malformace vedou k rekurentním hemoragiím. Onemocnění postihuje všechny rasy a obvykle se projevy vyskytují na rtech, bukální sliznici, v okolí úst a nosu. Může se jednat pouze o kosmetický defekt. Léze vypadají jako tmavě červené až fialové tříškovité či oválné skvrnky velikosti 0,5 - 3 mm. Polovina nemocných má však známky krvácení do gastrointestinálního traktu a zhruba 18% pacientů trpí mikroskopickou hematurií. Přibližně 15% nemocných má plicní arteriovenozní spojky, které mohou zapříčinit hypoxemii, pravolevý zkrat a často u nich také dochází k embolizacím do mozku. Nemocní s plicní teleangiektazií mívají sekundární polyglobulii a paličkové prsty. Jaterní lokalizace onemocnění vede k městnavé srdeční dekompenzaci a fibróze jater [83].

Klinické symptomy onemocnění jsou rozdílné u různých rodin i mezi členy jedné rodiny se stejnými mutacemi. Na základě experimentálních dat získaných při studiích s myšími modely deficientními v genu pro CD105 poukazují na ovlivnění závažnosti onemocnění HHT1. Molekulární původ onemocnění je dán mutacemi genů pro endoglin (HHT typ I) a ALK-1 (HHT typ II). Mutantní formy endoglinu bývají degradovány nitrobuněčně, onemocnění HHT1 je asociováno se sníženou hladinou endoglinu na povrchu endotelových buněk a aktivovaných monocytů [1].

Jedná se o různé mutace - delece, inserce, missense mutace, sestřihové mutacem které bývají distribuovány v obou genech. Vážnost onemocnění však nekoreluje s žádnou specifickou mutací. Většinou se mutace nacházejí v oblasti null alel - alel, které nekódují žádný peptid endoglinového receptoru. Dochází pouze ke snížení hladin endoglinu na povrchu endoteliálních buněk. Dodnes bylo zjištěno více jak 150 mutací endoglinu, většina z nich se nachází mezi exony 1 až 12. Tyto úseky genu kódují extracelulární doménu. Nebyla však nalezena žádná mutace v exonech 13 a 14 kódujících transmembránovou a cytoplasmatickou doménu. U ALK - 1 je známo více jak 120 mutací (více jak polovina těchto mutací jsou missense mutace, dále pak malé delece, inzerce, splice site mutace, a nonsense mutace často vedoucí ke zkráceným proteinům). Nejběžnější mutace se objevují v extracelulárním regionu a především v kinázové doméně. Mutace v kinázové doméně vedou

ke změnám polarity, náboje a hydrofobicity proteinu. U onemocnění HHT typu I je vyšší prevalence pulmonálních arteriovenózních malformací, u typu HHT II mívá onemocnění mírnějšími projevy a pozdější nástup nemoci [10]. Stále není zcela jasné, jak snížené hladiny endoglinu nebo ALK - 1 podporují rozvoj HHT a co vede k rozvoji vaskulárních lézí v jednotlivých cévních lůžkách. Vysvětlení mechanismů odpovědných za tuto chorobu byly získány při studiích na myších s defektními geny endoglinu a ALK - 1. Endoglin deficientní myši umírali ještě během nitroděložního vývoje na cévní a kardiovaskulární defekty. Vaskulogeneze u těchto myší byla normální, ale angiogeneze byla oslabena spolu s remodelací primárního cévního plexu. Myši měly nedostatečně vyvinuté hladkosvalové buňky cév, což vyústilo v dilataci a rupturu cévního řečiště. U heterozygotních myší s věkem docházelo k progresi a docházelo častěji k rupturám hlavních cév. Během vývoje, těchto endoglin - i ALK – 1 - deficientních myší se ztrácelo strukturální, molekulární, a funkční rozlišení mezi arteriemi a vénami, pouze ALK - 1 deficientní myši vykazovaly výraznou vazodilataci. Endoglin deficientní myši mívaly více dilatovaných venul, mnoho nepravidelných nebo tenkých cév s redukovaným počtem hladkosvalových buněk. U endoglin deficientních myší, diferenciace hladkosvalových buněk cév can be rescued with exogenním TGF - β_1. Endoteliální buňky subjektů s HHT typu I také vykazují sníženou produkci TGF - β_1, dochází k tvorbě dezorganizovaného cytoskeletu, selhává tvorba mezibuněčných spojek v endotelové vrstvě. Takto dezorganizovaný cytoskelet je náchylný k rozpadu buněk při změnách střižného stresu a krevního tlaku.

Přesná identifikace genů, které regulují TGF - β signalizaci by mohla pomoci porozumět tomu, jak mutace ALK-1 a endoglinu přispívají k abnormalitám ve vývinu cév a další náhledy do tohoto cévního onemocnění [14].

4 Význam TGF – β_1 a endoglinu v aterogenezi

TGF - β_1 představuje velmi důležitou roli v rozvoji, fyziologii a patologii cevního systému. TGF - β_1 má esenciální význam v průběhu rozvoje cévního systému, aterogeneze, neointimální proliferace a remodelace cév. TGF - β_1 je exprimován v endoteliálních a hladkosvalových buňkách a proto má důležitou roli v cévním systému [66]. Ačkoliv TGF - β je ve velké míře vytvářen v lidských aterosklerotických lézích, jeho vliv na rozvoj a progresi aterosklerózy je zatím stále nejasný.

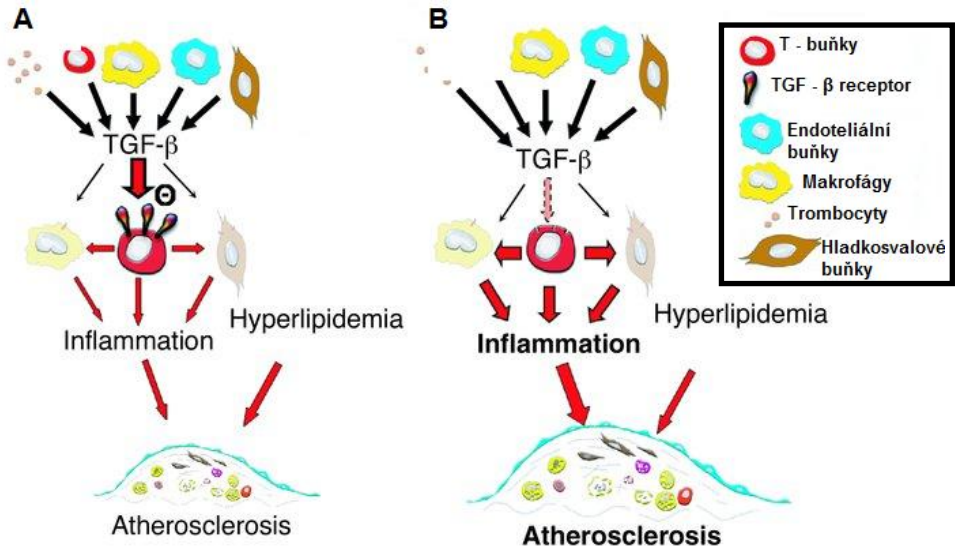
Role protizánětlivého cytokinu TGF - β v ateroskleróze je předmětem důležitých výzkumů a experimentálních studií již více jak 10 let. Na počátku 90. let minulého století byla formulována tzv. protektivní cytokinová hypotéza - TGF - β hraje významnou roli v udržení normální cévní struktury a narušení tohoto ochranného efektu TGF - β na cévní stěnu přispívá k rozvoji aterosklerózy. Tato hypotéza byla po mnoho let obtížně přijatelná, na konci 20. století bylo známo velmi málo dat o TGF - β v rozvoji a progresi aterosklerózy, naopak se ale vědělo, že tento cytokin narušuje neointimální tvorbu tím, že omezuje regeneraci cévního endotelu a nevíc podporuje fibrotizaci [19].

Ovlivňuje rozvoj a progresi aterosklerózy, stejně tak jako remodelaci extracelulární matrix a proliferaci hladkosvalových buněk. Je znám svým fibrotickým působením, má vliv na obsah kolagenu v aterosklerotických lézích a na stabilitu ateromového plátu [42].

Role TGF - β v aterogenezi je kontroverzní. Pro proaterogenní funkci TGF - β značí jeho fibrogenní vlastnosti a schopnost neointimální tvorby. Nicméně stále více dostupných studií neznačuje spíše protektivní roli TGF - β v ateroskleróze. Studie na experimentálních modelech aterosklerózy u myší dokázaly, že inhibice TGF - β způsobuje nárůst a progresi ateromu a dále pak jeho změnu směrem k nestabilnímu plaku. TGF - β ovlivňuje buňky endotelu, hladkosvalové buňky cév, makrofágy, T - lymfocyty, aj. a zprostředkovává tak mohutné protizánětlivé efekty díky jeho imunomodulací. Nicméně aktuální studie postupně odhalují, že TGF - β zabraňuje tvorbě lipidových lézí a to přinejmenším na myších modelech aterosklerózy [45].

Endoglin (CD105) je transmembránový protein, tvoří součást receptoru pro TGF - β, moduluje jeho signalizaci. U lidí v aterosklerotických lézích, jsou složky TGF - β buněčné signalizace detekovatelné v buňkách endotelu, v hladkosvalových bunkách, a makrofázích. Jejich hladiny prudce stoupají při poranění cévy [38].

Obrázek č. 17 Narušení TGF - β signalizace podporuje aterogenezi [34]



Předpokládaný mechanismus, kterým zánětlivá reakce zprostředkovaná T – lymfocyty podporuje aterosklerózu a současně inhibiční vliv TGF - β na aterogenezi (A). Nedostatek funkčních TGF - β receptorů na T - buňkách narušuje modulační aktivitu tohoto cytokinu, což vede k zhoršení aterosklerosklerózy u E0 × CD4dnTβRII myší (B).

4.1 TGF - β a stabilita aterosklerotického plátu

Stav aterosklerotického je významným faktorem pro vznik a rozvoj akutních cévních komplikací, jako je např. krvácení, trombóza. Složení ateromu je důležitějším predátorem těchto akutních cévních komplikací než jeho velikost. Zvláště rovnováha mezi syntézou a degradací intersticiálního kolagenu je klíčová pro vznik nestabilního ateromu. Mnoho studií potvrzuje, že TGF - β_1 podporuje a reguluje stabilitu aterosklerotického plátu [22]. Ke stabilizaci aterosklerotického plátu přispívá TGF - β_1 dvojím mechanismem: podporuje tvorbu fibrózního krytu měkkého jádra ateromu a svým imunomodulačním působením redukuje zánět uvnitř plaku. TGF - β nebrání jen počáteční tvorbě lipoidních proužků udržováním normální struktury cévní stěny, ale brzdí také rozvoj nestabilních aterosklerotických lézí a to regulací produkce ECM [45].

Naopak inhibicí TGF - β_1 signalizace dochází k nárůstu zánětu v plaku, krvácení, ukládání železa a menší fibrotizaci čepičky. Mallat a kolektiv dokázali, že při inhibici signalizace TGF - β protilátkou anti-TGF - β, dochází k urychlení progrese aterosklerózy [42]. Pokud některé externí faktory způsobí inhibici aktivity TGF - β, hladkosvalové buňky reagují

na tyto změny produkcí ECM, což umožňuje vzniku prvních tukových proužků. U aterosklerotického modelu myši inhibicí TGF - β signalizace, dochází k útlumu syntézy kolagenu v aterosklerotických plátech. Syntéza kolagenu v aterosklerotických lézích je důležitá pro stabilitu ateromu. Kolagen tvoří hlavní strukturní složku fibrózního krytu aterosklerotického plátu [62]. Signalizaci TGF - β omezuje léčba rekombinantním solubilním receptorem s TGF - β dochází tak k rychlejší progresi ateromu narůstáním zánětlivých složek a poklesem obsahu kolagenu v cévní stěně [40]. Obsah kolagenu v ateromu může také záviset na velikosti ateromových lézí [42].

Efekt na syntézu kolagenu má nejen TGF - β ale i EGR – 1 (early growth response factor; transkripční faktor časného růstu reakce), který stimuluje proliferaci hladkosvalových buněk. Vliv TGF - β na produkci kolagenu je ale mírně kontroverzní. TGF - β sice inhibuje buněčný růst, nicméně endoglin, který je součástí receptorového komplexu TGF - β, tento inhibiční efekt na proliferaci buněk endotelu omezuje. Stabilní lidské aterosklerotické pláty obsahují vysoké hladiny endoglinu a EGR - 1, který zprostředkovává prospěšný účinek TGF - β na stabilitu ateromů tím, že indukuje syntézu kolagenu a stimuluje proliferaci hladkosvalových buněk.

U pacientů s nestabilní anginou pectoris, korelovaly nízké hladiny TGF - β_1 s pokročilým stádiem aterosklerózy.

Transformačním růstovým faktorem indukovaná syntéza kolagenu je zprostředkována díky rostoucí expresi transkripčního faktoru EGR – 1. TGF - β - indukovaná pSmad2/3 přímo se váže k a aktivuje promotor genu pro EGR - 1. V pokročilých aterosklerotických lézích buňky hladkého svalstva i buňky endotelu produkují velké množství endoglinu a EGR - 1, zatímco ve zdravých cévách jsou hladiny exprese těchto peptidů nízké. Narůstající produkce kolagenu by měla zvýšit stabilitu ateromového plátu, nicméně ukazuje se, že udržování rovnováhy mezi syntézou a degradací kolagenu je důležitější než syntéza kolagenu samotná.

Na stabilitu ateromu má velký vliv nejen obsah kolagenu, ale také jeho tloušťka a pevnost, které jsou závislé na infiltraci zánětlivými mediátory [62].

4.2 TGF - β_1, zánět, imunomodulace a ovlivnění aterosklerózy

Zánět hraje centrální roli v kaskádě situací, které vedou k erozi a ruptuře aterosklerotického plaku. V lidských aterosklerotických plátech byla prokázána exprese TGF - β [22].

Mohutný protizánětlivý účinek TGF - β byl prokázán v experimentálních studiích na myších s knockoutovaným genem. Deficience TGF - β vede k nitroděložnímu úmrtí plodu díky prudké leukocytární extravazaci ve většině orgánových systémů na experimentálním myším modelu. Nahromadění leukocytů, zvláště makrofágů a T – lymfocytů, je charakteristické pro změnu struktury normální cévní stěny na aterosklerotickou lézi. Snižující se aktivita TGF - β v cévní stěně může vést k akumulaci leukocytů současně s nárůstem proliferace VSMC, migrace a dediferenciace. Byla odhalena řada protektivních účinků TGF - β, včetně potlačení prozánětlivé adheze molekul exprimovaných cévním endotelem, snížení tvorby pěnových buněk a kultur makrofágů [45].

Studie z laboratoře Richarda Flavella potvrdila, že T - lymfocyty jsou hlavním cílem pro TGF - β. Ve studii byly selektivně zničeny TGF - β receptory na T buňkách (použitím transgenní CD4dnTbRII), následně byl pozorován generalizovaný zánět s narůstající aktivací T - buněk a protilátek (IgG T - lymfocyty dependentní). Především regulace T - lymfocytů, spíše než metabolický a fibrogenní účinky TGF-β, je klíčová pro inhibici aterosklerózy. Byly porovnávány 2 modely CD4dnTGFbRII a hyperlipidemické apoe −/− myši. Hyperaktivní T - lymfocyty CD4dnTGFbRII myšího modelu vedly k nejrychlejší progresi aterosklerózy na zvířecím modelu, jaký byl kdy v experimentálních studiích sledován. Ve 12 týdnech věku, bylo možné již pozorovat rozsáhlé aterosklerotické léze v aortě. Ateromy byly vyplněné velkým množstvím pěnových buněk, makrofágů a T - buněk. Obsahovaly apoptotické oblasti, kolagenová vlákna, a hladkosvalové buňky, a byly 5x rozsáhlejší než léze u apoe −/− myší stejného stáří. Cévní stěna artérie tvořila velké množství prozánětlivých cytokinů a dalších zánětlivých mediátorů. TGF - β potlačuje rozvoj aterosklerózy a prozánětlivé T - efektorové buňky jsou jeho hlavním cílem. Předpokládá se, že TGF - β je v ateromech tvořen několika různými buněčnými typy, včetně makrofágů, endoteliálních a hladkosvalových buněk, trombocytů, a subtypem T – buněk, tzv. regulatorními T - lymfocyty (Treg). Imunosupresivní cytokiny – TGF - β a IL - 10 zprostředkovávají Treg funkci in vivo. Naopak stimulace Treg

může vyústit v produkci TGF - β nebo IL - 10. Treg potlačují rozvoj aterosklerózy a to přes TGF - β buněčnou signalizaci na efektorové T – buňky [49].

4.3 Vliv TGF – β_1 na vývoj kardiovaskulárního systému a stimulaci hypertenze

Kardiovaskulární systém se vyvíjí již brzy v embryonálním vývoji, zahrnuje dva důležité procesy vaskulogenezi a angiogenezi. Vaskulogeneze je vývoj primárních cév z angiogenních buněk, které ještě netvořily cévní stěnu. Jedná se o nejranější stádium vývoje krevních cév a spočívá v tvorbě a splývání krevních ostrůvků. Následujícím stádiem vývoje cévního řečiště je angiogeneze, kdy vznikají nové endoteliální buňky a to většinou proliferací stávajících buněk nedotelu, nové cévy vyrůstají z již existujících cév. Základem abiogeneze je remodelace původních kapilárních pletení a diferenciace artérií a vén [70].

TGF - β_1 představuje velmi důležitou roli v rozvoji, fyziologii a patologii cevního systému. Izoforma TGF - β_1 má esenciální význam pro vznik a rozvoj cévního systému, aterogenezi, neointimální proliferaci a remodelaci cév. TGF - β_1 je exprimován endoteliálními a hladkosvalovými buňkami.

Několik studií naznačuje vliv nadměrné expresi TGF - β_1 na vývoj hypertenze a komplikace s ní spojené. Určité polymorfismy genu pro TGF - β_1 jsou spojovány s hypertenzí. Arginin^{25}polymorfismus je asociován s nadměrnou produkcí TGF - β_1 a následně vyšším systolickým tlakem. Obézní pacienti mívají vyšší hladiny cirkulujícího TGF - β_1, stejně tak jako nemocní při ledviném selhání nebo jiném těžkém orgánovém postižení. Dvěma způsoby může TGF - β_1 ovlivňovat a zvyšovat krevní tlak – změnou hladiny vazoaktivních mediátorů a/nebo přeměnou architektury cévní stěny a zvýšením periferní rezistence. TGF - β_1 inhibuje produkci NO a stimuluje expresi endotelinu – 1 (vazokonstriktor sekretovaný endotelem).

TGF - β_1 stimuluje také uvolňování reninu z glomerulárních buněk, čímž zvyšuje krevní tlak přes angiotensin II. Strukturní a funkční změny v artériích navozené chronickou esenciální hypertenzí odpovídají kardiovaskulární morbiditě a mortalitě. TGF - β_1 podporuje ukládání ECM v krevních cévách, čímž nepříznivě ovlivňuje poddajnost a pružnost cév.

U pacientů s esenciální hypertenzí bývá protein TGF - β_1 stejně tak jako hladiny TGF - β_1 mRNA exprimován v nadměrném množství. Nadprodukce TGF - β_1 u hypertenze může být vyvolána různými faktory, jako je např. zvýšená hladina angiotensinu II, narůstající

systémový krevní tlak sám o sobě, rostoucí střižné napětí krevní tekutiny a rozdílná exprese TGF - β_1 v závislosti na polymorfismu genů. Polymorfismus Arg^{25} u genu pro TGF - β_1 je spojován s vyšším krevním tlakem. Vyšší plasmatické koncentrace TGF - β_1 se nalézají u pacientů s hypertenzí a mikroalbuminurií a hypertrofií levé komory srdeční. U těchto pacientů, antagonisté AT_1R receptoru a ACEI významně snižují plasmatické hladiny TGF - β_1 [32].

TGF - β_1 prokazatelně zmenšil velikost mozkového infarktu u králičího modelu tromboembolické mrtvice. Mechanismus, kterým TGF - β_1 zastává tento ochranný efekt je však nejasný a nesouvisí s efektem na krevní průtok mozkem [13].

4.4 Aktivace TGF - β_1 a jeho suprese v aterosklerotických lézích

Členové TGF - β nadrodiny jsou tvořeny jako pre-pro-proteiny, které dimerizují a během sekrece ztrácí svou signální sekvenci. Výsledný pro-proteinový dimér vstupuje do procesu aktivace, kdy ve dvou krocích se z něj postupně stává aktivní TGF - β liganda. V prvním kroku aktivace je odštěpena polypeptidová struktura na straně tetrabáze mezi pro-peptidem LAP a zralým dimerem TGF - β. LAP dimer a biologicky aktivní TGF - β dimer zůstávají nekovalentně propojeny. Tato struktura, tzv. latentní TGF - β, je již známa svojí biologickou aktivitou. Ve druhém kroku se LAP oddělí od zralého TGF - β diméru, který je tak uvolněn pro interakce se signálními receptory [45].

Aktivaci TGF - β_1 v cévní stěně potlačuje významně lipoproteinová částice Lp (a). Lipoprotein Lp (a) představuje třídu lipoproteinových částic, jejichž bílkovinnou složku tvoří apolipoprotein apo – B - 100 a specifický glykoprotein apolipoprotein apo (a) připojený k apo-B-100 disulfidovou vazbou. Lp (a) částice se podobá částici LDL s apo-B-100 disulfidicky vázanou na apoprotein apo (a), který představuje specifický glykoproteinový marker této částice. Hladiny Lp (a) podléhají přísné genetické kontrole a jeví mendelovský způsob přenosu. Plazmatické hladiny Lp (a) jsou nezávislé na hodnotách jiných lipoproteinů a apolipoproteinů [81]. Lp (a) může inhibovat aktivaci TGF - β_1 v buněčných kulturách. Transgenická exprese apo (a) u myší, které nemají žádný ekvivalentní endogenní gen, skončila narušením aktivace TGF - β v cévní stěně. Apo (a) se kumuluje převážně v místech cévy, kde byla aktivace TGF - β_1 již potlačena. Poté dochází k pozitivní zpětné regulaci, která se projeví potlačením TGF - β aktivity v apo (a) a Lp (a) trangenních myších [45].

Aktivaci TGF - β reguluje množství dalších faktorů. Patří mezi ně proteázy, které odštěpují LAP region a tím podporují uvolnění zralého peptidu TGF-β. LAP dimér funguje jako jakýsi „senzor“ latentního TGF - β komplexu. Propojuje aktivitu mnohých faktorů okolního prostředí, na základě jejichž vyhodnocení reguluje uvolnění efektorového TGF - β komplexu [45].

Faktory jako PAI-1, které se zvyšují v průběhu aterogeneze nebo aktivita urokinázy a plazminu (bývají naopak potlačené), pravděpodobně přispívají k lokální supresi aktivace TGF - β v místě již vzniklého ateromu.

Odchylky v metabolismu lipidů mají také inhibiční vliv na aktivaci TGF - β. Po standardním tučném jídle, aktivita TGF - β bývá přechodně potlačena. Přispívá k tomu několik mechanismů. Produkce PAI – 1 je stimulována přísunem potravy. Potlačení aktivace TGF - β e asociováno s genotypem PAI - 1 promotoru. Hydrofobní TGF - β protein může být sekvestrován do lipoproteinových částic s velkým obsahem TAG. Tím se snižuje jeho schopnost interagovat se signálními receptory, které by mohly exacerbovat redukci TGF - β aktivity po příjmu potravy.

TGF - β aktivita může být také potlačena v oblastech s malým střižným napětím (např. v místech větvení cév).

Ve studii ECTIM byla prokázána asociace mezi polymorfismem genu pro region signálního peptidu TGF - β_1 a infarktem myokardu, nikoliv však s angiograficky definovanou stenózou cév. Polymorfismus genu pro TGF - β asociovaný s nízkou sekrecí TGF - β_1 se častěji vyskytuje u mužů s prodělaným IM. U člověka bývá význam TGF - β nejčastěji asociován se změnou stabilního ateromu na nestabilní zánětlivou lézi [45].

Role TGF - β_1 v patofyziologii aterosklerotických plaků byla formulována na základě jeho vlivu na růst hladkosvalových buněk a produkci ECM. TGF - β_1 inhibuje aktivitu monocytů a lymfocytů, což potvrzuje mohutná zánětlivá reakce a leukocytární extravazace u TGF - β_1 deficientních experimentálních myší.

4.5 Podávání statinů a jejich vliv na TGF - β a endoglin

Statiny jsou účinné hypolimidemické léky, snižují plazmatické koncentrace LDL - cholesterolu kompetitivní inhibicí HMG - CoA reduktázy, což vede k upregulaci LDL receptorů v hepatocytech a následně k vyššímu vychytávání LDL - cholesterolu z krve. Jsou dnes považovány za základ hypolipidemické léčby. Jako jediná hypolipidemika snižují nejen

významně cholesterol (při terapii statiny klesá plasmatická koncentrace LDL cholesterolu až o 35%), ale významně snižují také morbiditu a mortalitu na KVO [43].

TGF - β podle mnoha studií hraje v ateroskleróze protektivní roli a to především regulací rovnováhy mezi zánětlivým procesem a akumulací extracelulární matrix v cévním endotelu.

Statiny zesilují aktivaci Smad buněčné signálizace zprostředkované TGF - β v VSMC. TGF - β/Smad signalizace je klíčová pro účinky statinů na hladkosvalové cévní buňky. Léčba statiny způsobuje zvýšenou expresi receptorů TβRII. Při hypolipidemické léčbě inhibitory HMG - CoA reduktázy dochází také ke zvýšení syntézy TGF - β a vyšší aktivitě signální dráhy TGF - β/Smad. Statiny, přes Smad aktivaci, způsobují větší vnímavost hladkosvalových cévních buněk na TGF - β indukovanou apoptózu a zvýšenou produkci ECM (TGF - β zprostředkovanou) [73].

Vysoké dávky statinů indukují apoptózu hladkosvalových buněk. Statiny indukovaná apoptóza je zprostředkována TGF-β/Smad signální cestou. Na experimentálním modelu aterosklerózy u apoE -/- myší léčba atorvastatinem zvyšovala Smad3 fosforylaci a způsobovala nadměrnou expresi TβRII, asociovanou s nárůstem ECM v hladkosvalových buňkách cév uvnitř aterosklerotických lézí.

V aterosklerotických lézích hladkosvalové buňky cévního endotelu exprimují rozdílné TGF - β receptory v porovnání s normálními cévami, kde bývá nejvíce zastoupený TβRII. V aterosklerotický změněných cévách dochází skrz TβRII ke zvýšení exprese kontraktilního proteinu, buňky cévního endotelu ale převážně exprimují TβRI. Právě exprese TβRI podporuje počáteční tvorbu tukových proužků.

TGF - β přenáší signály především cestou Smads, které fungují jako transkripční faktory. V hladkosvalových buňkách cévního endotelu TGF - β_1 cestou ALK5 zvyšuje fosforylaci Smad2 a Smad3, která se váže k Smad4. Tento komplex translokuje do jádra, kde interaguje s různými transkripčními faktory a reguluje expresi TGF – β citlivých genů [73].

Při léčbě statiny, dochází k inhibici enzymu HMG-CoA reduktázy. Narůstají hladiny cirkulujícího TGF - β a také se zvyšuje monocytární syntéza TGF - β. V kardiomyocytech, statiny zvyšují expresi receptorů TβRII. V srdci je také podání atorvastatinu asociováno s inhibicí kardiálních fibroblastů. Atorvastatin potlačuje expresi endoglinu přes inhibici fosforylace PI - 3 kinázy, Akt, a Smad3 [52].

Statiny zvyšují schopnost TGF - β aktivovat Smads - touto cestou způsobují esenciální účinky statinů na VSMCs, včetně buněčné apoptózy a akumulace ECM.

Endoglin - CD105 je transmembránový protein, tvoří součást receptoru pro TGF - β a reguluje jeho signalizaci. TGF - β je ve velké míře vytvářen v lidských aterosklerotických lézích. Výsledky studie Nachtigala a kolektivu [68] nasvědčují pravděpodobně antiaterogennímu působení endoglinu na cévní endotel. Po podávání statinů dochází ke zlepšení endoteliální dysfunkce, která je základem aterogeneze. Exprese endoglinu v ateromu ApoE/LDLr deficientních myší (myši s kombinovaným defektem apoE lipoproteinu a LDL receptoru) byla ve studii lokalizována na buňkách endotelu v oblasti aortálního sinu a oblouku, dále na endotelu srdečních chlopní. Fluorescenční imunohistochemií byla charakterizována kolokalizace exprese endoglinu a SMAD2, SMAD2/3 a eNOS pouze na aortálních buňkách cévního endotelu u apoE/LDLr deficientních myší. Podávání atorvastatinu vedlo k výraznému hypolipidemickému účinku, snížení exprese prozánětlivého VCAM - 1. Naopak byla zaznamenána zvýšená exprese endoglinu, Smad2, Smad2/3 a eNOS v cévním endotelu aorty. Endoglin by mohl představovat marker, jehož exprese je ovlivněna atorvastatinem. Studie naznačuje, že právě endoglin by mohl být odpovědný za zlepšení endoteliální dysfunkce navozené hypolipidemickou léčbou statiny [68].

5 Diskuse

Cílem této rešeršní diplomové práce bylo shrnout aktuální poznatky a výsledky různých studií o TGF - β_1 a endoglinu a jejich významu v rozvoji a progresi aterosklerózy. Role TGF - β_1 v aterogenezi je však značně kontroverzní.

Současná odborná literatura popisuje detailně význam a strukturu transformujícího růstového faktoru β_1 za fyziologických podmínek [67], [69]. TGF - β_1 hraje významnou roli v regulaci mnoha buněčných funkcí jako je růst, diferenciace, apoptóza, adheze a motilita. U savců jsou známy tři izoformy: TGF - β_1, TGF - β_2 a TGF - β_3. TGF - β je sekretován v latentní formě. Před vazbou na své specifické receptory (typ I a II serin/threonin kinázové receptory) musí být aktivován proteázami nebo trombospondinem. Na zprostředkování signálu TGF - β se účastní jeden TβRII receptor a dva rozdílné TβRI receptory, ALK - 1 (activin receptor-like kinase – 1; aktivin receptor-like kináza 1) omezený na endotel a široce rozšířený ALK5. Po vazbě ligandu a aktivaci I. typu receptorů jsou signály přenášeny do jádra prostřednictvím intracelulárních efektorů, nazývaných Smad. Trasformační růstový faktor beta je také důležitým imunomodulátorem a má silné protizánětlivé působení [49], což je významné pro jeho protektivní roli v patogenezi cévních onemocnění, jako je např. ateroskleróza.

Význam TGF - β_1 a endoglinu v aterogenezi zůstává stále sporný. Mallat a kolektiv [42] poukazují na mohutné fibrogenní vlastnosti TGF - β_1. TGF - β_1 působí antiproliferativně a omezuje regeneraci cévního endotelu, což naznačuje jeho možné proaterogenní vlastnosti. Fagerd a kolektiv zjistili [32], že zvýšené hladiny cirkulujího TGF - β_1 jsou jasně asociovány s hypertenzí u obézních pacientů, která následně vyústí v poškození cévní stěny. Toto poškození přispívá a urychluje progresi aterosklerózy. TGF - β_1 ovlivňuje zvýšení krevního tlaku několika mechanismy. Mění hladiny vazoaktivních mediátorů a přispívá ke změnám a narušení architektury cévní stěny a zvyšuje tak periferní rezistenci. TGF - β_1 snižuje produkci vazodilatačně působícího NO a naopak stimuluje expresi vazokonstrikčního endotelinu. Navíc stimuluje uvolňování reninu z ledvinných glomerulů, a tak přispívá ke zvýšení krevního tlaku přes angiotensin II. Ve studii ECTIM byla prokázána spojitost mezi polymorfismem genu pro region signálního peptidu TGF - β_1 a infarktem myokard. Tento genový polymorfismus se častěji vyskytuje u mužů po prodělaném infarktu myokardu [45].

Naopak protektivní působení TGF - β_1 v aterogenezi podporují mnohé nedávno publikované studie. Podle Mallata dochází inhibicí TGF - β_1 k nárůstu a progresi aterosklerotických lézí; dále je dosaženo rychlejší přeměny stabilního ateromu na nestabilní aterosklerotickou lézi [42]. Experimentální studie na myších modelech dokazují, že TGF - β_1 zabraňuje tvorbě lipidových lézí a podporuje jejich stabilitu [19]. TGF - β_1 stimuluje produkci kolagenu a podporuje tak tvorbu fibrózního krytu a zvyšuje stabilitu ateromu ve stěně cévy [40]. Navíc TGF - β_1 působí mohutným protizánětlivým efektem, čímž omezuje aterosklerózu, která je chronickým zánětlivým onemocněním cév [49]. Snížená aktivita TGF - β_1 vedla v experimentálních pracích ke zvýšené akumulaci leukocytů a ke zvýšení proliferaci hladkosvalových buněk cév [42].

Nedávno prováděné studie [73], [52], [68] odhalily, že při podávání statinů, inhibitorů HMG-CoA reduktázy, dochází nejen ke zlepšení endoteliální dysfunkce, ale také ke zvýšené expresi receptorů TβRII na cévním endotelu. Mallat udává [66], že exprese TβRII bývá vyšší v aterosklerotický nezměněných cévách. Dále došlo po podávání statinů k nárůstu syntézy TGF - β a vyšší aktivitě signální dráhy TGF - β/Smad. Byla navíc zaznamenána zvýšená exprese endoglinu. Podle závěrů Nachtigala a kolektivu by endoglin mohl představovat marker, jehož expresi lze ovlivnit hypolipidemiky. Právě endoglin by pravděpodobně mohl být odpovědný za zlepšení endoteliální dysfunkce po hypolipidemické léčbě [68].

Role TGF - β_1 a endoglinu v rozvoji, fyziologii a patologii cevního systému se začíná s počtem nových studií postupně objasňovat. Přesto je pro určení role TGF - β_1 a endoglinu v patogenezi aterosklerózy a zjištění přesných mechanismů jejich působení nezbytné další zkoumání jejich aktivity, zejména z hlediska možného terapeutického prospěchu pacientů s aterosklerózou.

6 Závěr

Bylo zjištěno, že působení TGF – β_1 a endoglinu v aterogenezi není zcela jednoznačné. Při inhibici aktivity TGF – β_1 dochází k nárůstu aterosklerotického plátu a přeměně stabilního plátu na nestabilní, narůstá krvácení a zánět v cévní stěně. V experimentálních studiích prováděných na zvířecích modelech zabraňuje TGF – β_1 tvorbě a nárůstu tukových lézí v cévním endotelu. TGF – β_1 má silné fibrogenní vlastnosti, podporuje tak tvorbu fibrózního krytu ateromu a stabilizuje aterosklerotický plát. TGF – β_1 přispívá ke stabilitě aterosklerotického plátu také stimulací tvorby kolagenu. Působí protizánětlivě, čímž zabraňuje rozvoji ateroskleróz a přeměně stabilního aterosklerotického plátu na nestabilní. U pacientů s nestabilní anginou pectoris byly nalezeny nízké hladiny TGF – β_1, které současně odpovídaly pokročilému stádiu ateroskleróz.

Oproti tomu je TGF – β_1 znám svým inhibičním působením na buněčnou proliferaci, čímž omezuje regeneraci cévního endotelu. Zvýšené hladiny TGF – β_1 u pacientů spojovány s hypertenzí. TGF – β_1 ovlivňuje hladiny vazoaktivních látek – snižuje produkci vazodilatačně působícího NO a zároveň podporuje tvorbu vazokonstrikčního endotelinu. Navíc TGF – β_1 ovlivňuje uvolňování reninu z ledvinných glomerulů a zvyšuje tak krevní tlak aktivací angiotensinogenu. Zvýšený krevní tlak pak způsobí dysfunkci endotelu, která je počátečním stádiem samotné aterogeneze.

Pro přesné určení významu a mechanismů TGF – β_1 a endoglinu v aterogenezi je nezbytný další výzkum, který by nejprve přesně specifikoval jejich úlohu v jednotlivých fázích ateroskleróz a na základě těchto poznatků dále popsal možnosti terapeutického ovlivnění hladin TGF – β_1 a endoglinu u pacientů s aterosklerózou.

7 Literatura

[1] ALTOMONTE, M., FONSATTI, E., NATALI, P. G., et al.: Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. Oncogene. 2003, roč. 22, s. 6557 – 6563.

[2] ANDERSON, T.J., GERHARD, M. D., MEREDITH, I. T., et al.: Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. The American journal of cardiology. 1995, roč.75, č. 6, s.71 - 74.

[3] ANDRYS, C., BELADA, D., HRUDKOVA, M., et al.: Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu mají prognostický význam u nemocných s chronickou, lymfocytarni leukemii. Transfúze a hematologie dnes. 2008, roč. 14, č. 1, s. 24 - 27.

[4] ANTUNA-PUENTE, B., BASTARD, J. P., FEVE, B., FELLAHI, S.: Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. Diabetes and metabolism. 2008, roč. 34, s. 2 - 11.

[5] ARNAUD, C., BURGER, F., STEFFENS, S., et al.: Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direkt antiinflammatory effects of statins. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. 2005, roč. 25, s. 1231 – 1236.

[6] ARNOŠTOVÁ, L., FIALOVÁ, L., MALBOHAN, I., et al.: Preeklampsie a její diagnostika. Klinická biochemie a metabolismus. 2007, roč. 15, č. 36, s. 200 - 206.

[7] BABIČKOVÁ, L.: Prognostický význam promotorového polymorfismu matrix metaloproteinázy - 1 na časnost metastazování bronchogenního karcinomu; Kandidátská disertační práce. Brno. 2007.

[8] BAGUET, J. P., FERRIER, K. F., MUHLMANN, M. H., et al.: Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension. Journal of the American college of cardiology. 2002, roč. 39, s. 1020 - 1025.

[9] BAOQIANG, G., CHENGGANG LI, S. K.: CD105 (Endoglin), apoptosis and stroke. Stroke. 2004, roč. 35, s. 94 - 95.

[10] BARBARA, A., CALVIN, P. H., CARMELO, B., et al.: Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell fysiology. Journal of cellular biochemistry. 2007, roč. 102, č. 6, s. 1375 – 1388.

[11] BARBARA, N. P., WRANA, J. L., LETARTE, M.: Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor - β superfamily. The journal of biological chemistry. 1999, roč. 274, s. 584 – 594.

[12] BECKER, V., MULLER, G., RASCHKE, B., et al.: TGF - β_1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF - 2). Kidney international. 2001, roč. 59, č. 2, s. 579 - 92.

[13] BEDNAR, M. M., GROSS, C. E., HOWARD, D. B., et al.: Transforming growth factor-beta 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. Stroke. 1993, roč. 24, s. 558 - 562.

[14] BERNABEU, C., PECE-BARBARA, N., VERA, S., et al.: Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. Human Molecular Genetics. 2000, roč. 9, č. 8, s. 1227 - 1237.

[15] BERNABEU, C., LASTRES, P., MARTIN-PEREZ, J., et al.: Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. Biochemical journal. 1994, roč. 301, s. 765–768.

[16] BERNABEU, C., LOPEZ-NOVOA, J., QUINTANILLA, M.: The emerging role of TGF - β superfamily coreceptors in cancer. Biochimica et biophysica acta. 2009, roč. 1792, č.10, s. 954 - 73.

[17] BERSNARD, S., DURIEZ, M., MALLAT, Z., et al.: Protective role of interleukin - 10 in atherosclerosis. Circulation research. 1999, roč. 85, s. 17 – 24.

[18] BLÁHA, M., BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., et al.: To the bioindicators of atherosclerosis activity: Significance of endoglin level. Supplementum Cor Vasa. 2007, roč. 49, č.4.

[19] BOBIK, A.: Transforming growth factor - betas and vascular disorders. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. 2006, roč. 26, č.8., s. 1712 - 1720.

[20] BORKHAM–KAMPHORST, E., GRESSNER, O. A., HERRMANN, J.: BMP - 7 as antagonist of organ fibrosis. Frontiers in bioscience. 2009, roč.1, č. 14, s. 4992 - 5012.

[21] CELERMAJER, D. S., SORENSEN, K. E., GOOCH, V. M., et al.: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet. 1992, roč. 340, s. 1111 – 1115.

[22] CIPOLLONE, F., FAZIA, M., MINCIONE, G., et al.: Increased expression of transforming growth factor-{beta}1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. Stroke. 2004, roč. 35, s. 2253 - 2257.

[23] CIUCLAN, L., EHNERT, S., ILKAVES, I, et al.: TGF - β enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. Hepatology. 2010. Abstrakt databáze Medline.

[24] CONLEY, B. A., KOLEVA, R. I., ROMERO, D., et al.: Endoglin structure and function: determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor receptors. The journal of biological chemistry. 2006, roč. 281, s. 25110 - 25123.

[25] COSIN-SALES, J., CHRISTIANSEN, M., KASKI, J. C., et al.: Relationship among pregnancy associated plasma protein-A levels, clinical characteristics, and coronary artery disease extent in patients with chronic stable angina pectoris. European heart journal. 2005, roč. 26, s. 2093 – 2098.

[26] CRIZ-GONDALEZ, I., PABON, P., RODRIGUEZ-BARBERO, A. et al.: Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. Journal of cellular and molecular medicine. 2008, roč. 12, č. 3, s. 955 – 961.

[27] ČEŠKA, R., KRÁLÍKOVÁ, E., VRABLÍK, M.: Kouření a kardiovaskulární onemocnění se zaměřením na metabolismus lipidů. Kardiologická revue. 2004, roč. 4, s. 166 – 169.

[28] DAHLY, A. J., FLASCH, A. K., HOAGLAND, K. M., et al.: Antihypertensive effects of chronic anti-TGF - β antibody therapy in Dahl S rats; American journal of physiology - regulatory, integrative and comparative physiology. 2002, roč. 283, s. 757 - 767.

[29] DART, A., NESTEL, P., SHIGE, H.: Simvastatin improves arterial compliance in the lower limb but not in the aorta. Atherosclerosis. 2001, roč.155, s. 245 - 250.

[30] DAVIGNON, J., GANZ, P.: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. 2004, roč.109, č. 3, s. 27 - 32

[31] DIMMELER, S., FICHTLSCHEREE, S., HEESCHEN, C., et al.: Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. The journal of the American medical association. 2004, roč. 291, s. 435 – 441.

[32] FAGERD, R. H., LIJNEN, P. J., PETROV, V. V.: Association between transforming growth factor - beta and hypertension. The American journal of hypertension. 2003, roč. 16, č. 7, s. 604 - 11.

[33] FICHTLSCHERER, S., ROSENBERGER, G., WALTER, D.H., et al.: Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. Circulation. 2000, roč. 102, s. 1000 - 1006.

[34] FLAVELL, R. A., GORELIK, L., HANSSON, G., et al.: Disruption of TGF - β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. The journal of clinical investigation. 2003, roč. 112, č. 9, s. 1342 - 1350.

[35] FLAVELL, R. A., WAN, Y. Y., WRZESINSKI, S. H.: Transforming growth factor - β and the immune response: Implications for anticancer therapy. Clinical cancer research. 2007, roč. 13, č. 18, s. 5262 – 5270.

[36] FUKUDA, N., MATSUDA, H., UENO, T., et al.: Development of gene silencing pyrroleimidazole polyamide targeting the TGF - β_1 promoter for treatment of progressive renal diseases. Journal of the American society of nephrology. 2006, roč. 17, s. 422 – 432.

[37] GANONG, F. W.: Přehled lékařské fyziologie. 20. vydání. Praha. Galen, 2005. ISBN 80-7262-311-7.

[38] GARCIA-MONZON, C., GARCIA-POZO, L., MIQUILENA-COLINA, M. E., et al.: Endoglin: Structure, biological functions and role in fibrogenesis. Revista Espanola de enfermedades digestiva. 2008. roč. 100, s. 355 − 360.

[39] GHOSH, J., MURPHY, M., TURNER, N, et al.: The role of transforming growth factor β_1 in the vascular system. Cardiovascular Pathology. 2005, roč. 14, č. 1, s. 28 – 36.

[40] GIJBELS, M., LUTGENS, E., SMOOK, M., et al.: Transforming growth factor - β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. 2002, roč. 22, s. 975 – 982.

[41] GODFREY, M., ROBINSON P. N.: The molecular genetic of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. Journal of medical. genetics. 2000,

roč. 37, s. 9 - 25. Převzato z ŠRÁMEK, J.: Marfanův syndrom; http://szumak.xf.cz/download/pf-mfs.pdf.

[42] GOJOVA, A., MALLAT, Z., TEDGUI, A., et al.: Atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. Circulation research. 2001, roč. 89, s. 930 – 934.

[43] GOLÁŇ, L.: Chyby a úskalí terapie statiny. Interní medicína pro praktické lékaře. 2004, roč. 1, s. 31 – 32.

[44] GOUGOS, A., LETARTE, M.: Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against and pre-B leukemic cell line. The journal of immunology. 1988, roč. 141, s. 1925 – 1933.

[45] GRAINGER, D. J.: Transforming Growth Factor ß and Atherosclerosis: So far, so good for the protective cytokine hypothesis. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. 2004, roč. 24, s. 399 – 404.

[46] GRESSNER, O. A., HERRMANN, J., MEURER, S. K., et al.: BMP - 7 as antagonist of organ fibrosis. Frontiers in bioscience. 2009, roč. 14, s. 4992 - 5012.

[47] HABA, A., KAWANISHI-TABATA, R., TABATA, M., et al.: Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. Clinical cancer research. 2001, roč. 7, s. 524 – 532.

[48] HABASHI, J., MATT, P., SCHOENHOFF, M. D., et al.: Circulating Transforming growth factor - β in Marfan syndrome. Circulation. 2009, roč. 120, s. 526 - 532;

[49] HANSSON, G.: Atherosclerosis - an immune disease. Atherosclerosis. 2007, roč. 202, č. 1, s. 2 - 10.

[50] HICKS K. B., MOREAU, R. A., WHITAKER, B.,D.: Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health–promoting uses. Progress in lipid research. 2002. Roč. 41, s. 457 - 500.

[51] HRADEC, J., KLENER, P., SPAČIL, J.: Kardiologie, angiologie. Vnitřní lékařství. Svazek II. 1. vydání. Praha: Galen, 2001. ISBN 80-7262-106-8.

[52] CHEN, W. J., SHYU, K. G., WANGL, B. W., et al.: Mechanism of the inhibitory effect of atorvastatin on endoglin expression induced by transforming

growth factor - β_1 in cultured cardiac fibroblasts. European journal of heart failure. 2010, roč. 12, č. 3, s. 219 - 226.

[53] CHOLT, M., MALÍK, J., MALÍKOVÁ, H.: Možnosti ultrazvukového vyšetření karotid: "State of the art". Česká radiologie., 2002, roč. 56, č. 4, s. 208 - 215.

[54] INSULL, W.: The pathology of atherosclerosis: Plaque development and plaque responses to medical treatment. The American journal of medicine. 2009, roč. 122, č. 1, s. 3 – 14.

[55] JOHNOVÁ, D.: Je možno dosáhnout změnou životního stylu vazodilatace, jako projevu zvýšené tvorby oxidu dusnatého? Bakalářská práce. LF MU. 2006.

[56] KARASEK, D., VAVERKOVÁ, H.: Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. Interní medicína po praxi. 2004, roč. 9, s. 450 – 453.

[57] KARETOVÁ, D.: Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. Interní medicína. 2002; roč. 3, s. 119 – 122.

[58] KETTNER, J.: Nové biomarkery v akutní kardiologii. Intervenční a akutní kardiologie. 2008, roč. 7, č. 5, s. 193 – 199.

[59] KLIMČÁKOVÁ, E., KOVAČIKOVÁ, M., POLÁK, J.: Endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inulinové rezistence. Interní Medicína. 2006, roč. 10, s. 443 – 446.

[60] KNIGHT, P. G., GLISTER, C.: TGF - β superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 2006, roč. 132, č. 2, s. 177 - 178.

[61] KOMPRDA T.: Cholesterol a jeho oxidační produkty v potravinách. Veterinářství. 2006, č. 5, s. 121 – 125.

[62] KOZÁKOVÁ, I: Ateroskleróza a trombóza. Stabilní a nestabilní aterosklerotické. Ústav patologické fyziologie. LF UP.
web Ústav patologické fyziologie LF UP; http://video.upol.cz/dpx_enterprise_media_user/dpx/slidemedia/56/03_03.pdf

[63] LIBBY, P.: Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. Journal of Lipid Research. 2009, roč. 50, s. 352 - 357.

[64] LIEBNER, S., PECE-BARBARE, N., VERA, S., et al.: Endoglin null endothelial cells proliferate faster, and more responsive to TGF beta 1 with

higher affinity receptors and an activated ALK1 pathway. The journal of biological chemistry. 2005, roč. 280, č. 30, s. 27800 – 27808.

[65] MALÍK, J.: Detekce preklinické aterosklerózy. Kardiologické forum. 2006, roč. 4, č. 3, s. 19 – 23.

[66] MALLAT, Z., TEDGUI, A.: Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. Physiological Review. 2006, roč. 86, s. 515 - 581.

[67] MASSANGUE, J., SHI, Y.: Mechanisms of TGF - β signaling from cell membrane to the nucleus. Cell. 2003, roč. 113, s. 685 - 700.

[68] MICUDA, S., NACHTIGAL, P., POSPĚCHOVÁ, K., et al.: Atorvastatin increases endoglin, SMAD2, phosphorylated SMAD2/3 and eNOS expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2009, roč. 16, č. 3, s. 265 - 74.

[69] MING, O. LI, SHOMYSEH, S., YISONG, Y., et al.: Tranforming growth factor – β regulation of immune responses. Annual review of immunology. 2006, roč. 24, s. 99 - 146.

[70] NAŇKA, O.: Význam hypoxie pro vývoj embryonálního krevního řečiště; Autoreferát dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze. 1. lékařská fakulta. Anatomický ústav. Praha. 2005.

[71] OLSON, P. R., SILVERMAN, J. F., YULIN, L. Liu, et al.: Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. American Journal of Clinical Pathology. 2007, roč.127, č. 4, s. 572 - 579.

[72] PUCHMAYER, V., a ROZTOČIL, K.: Praktická angiologie. 1. Vydání Praha: Triton, 2000. ISBN 80-7254-099-8.

[73] RODRIGUEZ - VITAL, J., SANCHEZ-GALAN, E., SANTAMARIA, M., et al.: Essential role of TGF-β/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. PLoS ONE. 2008, roč. 3, č. 12, s. 3959.

[74] Stary H., C., Chandler A., B., Dinsmore R. E., et al.: A definition of advanced types of atherosclerosic lesions and a histological classification of atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1995, roč. 15, s. 1512 – 1531.

[75] SVAČINA, Š.: Obezita, diabetes, ateroskleróza. Kardiologické fórum. 2004, roč. 2, s. 11 – 13.

[76] ŠTULC, T.: Aterogeneze a její patogenetické mechanizmy. Kardiologické fórum. 2006, roč. 4, č. 3.

[77] VRÁBLÍK, M.: Endoteliální dysfunkce - první ovlivnitelné stádium aterosklerózy. Practicus. 2009, roč. 5, s. 28 – 30.

[78] web Ambion; http://www.ambion.com/tools/pathway/pathway.php?pathway=Atherosclerosis-Disease%20Progression

[79] web Athero; http://www.athero.cz/odkazy-a-zdroje-informaci/vypocet-rizika/tabulka-kardiovaskularniho-rizika.html

[80] web Clarian; http://www.clarian.org/ADAM/doc/NeurologyCenter/2/18018.htm

[81] web Datový standard MZ ČR; http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/_KOMP_200912140833LPA.htm

[82] web dokurte; http://www.dokurte.cz/?stranka=slozeni_tabakoveho_koure&typ=sablony

[83] web HHT Foundation International; http://hht.org/about-hht/

[84] web http://www.zdrava-rodina.cz/; Ateroskleróza: Nové pohledy na C - reaktivní protein. 2002, roč. 9, č. 5, s. 1 - 2.

[85] web Roswell Park Cancer Institute; http://www.roswellpark.org/Education/Graduate_Education/Departments/Immunology/Immunology_Research/Seon_Lab.

[86] web Sabiosciences; http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=TGF_Beta_Pathway

[87] YAKUGAKU, Z.: Molecular pathology in atherosclerosis: the mechanism by which cholesteryl ester accumulates in atheromatous aorta. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 2008, roč.128, č.10, s.1383 - 1401. Abstrakt databáze Medline.

[88] ZMRZLÁ, H.: Regulace pluripotence normálních a adaptovaných lidských embryonálních kmenových buněk. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta; Brno 2008.

8 Seznam použitých zkratek

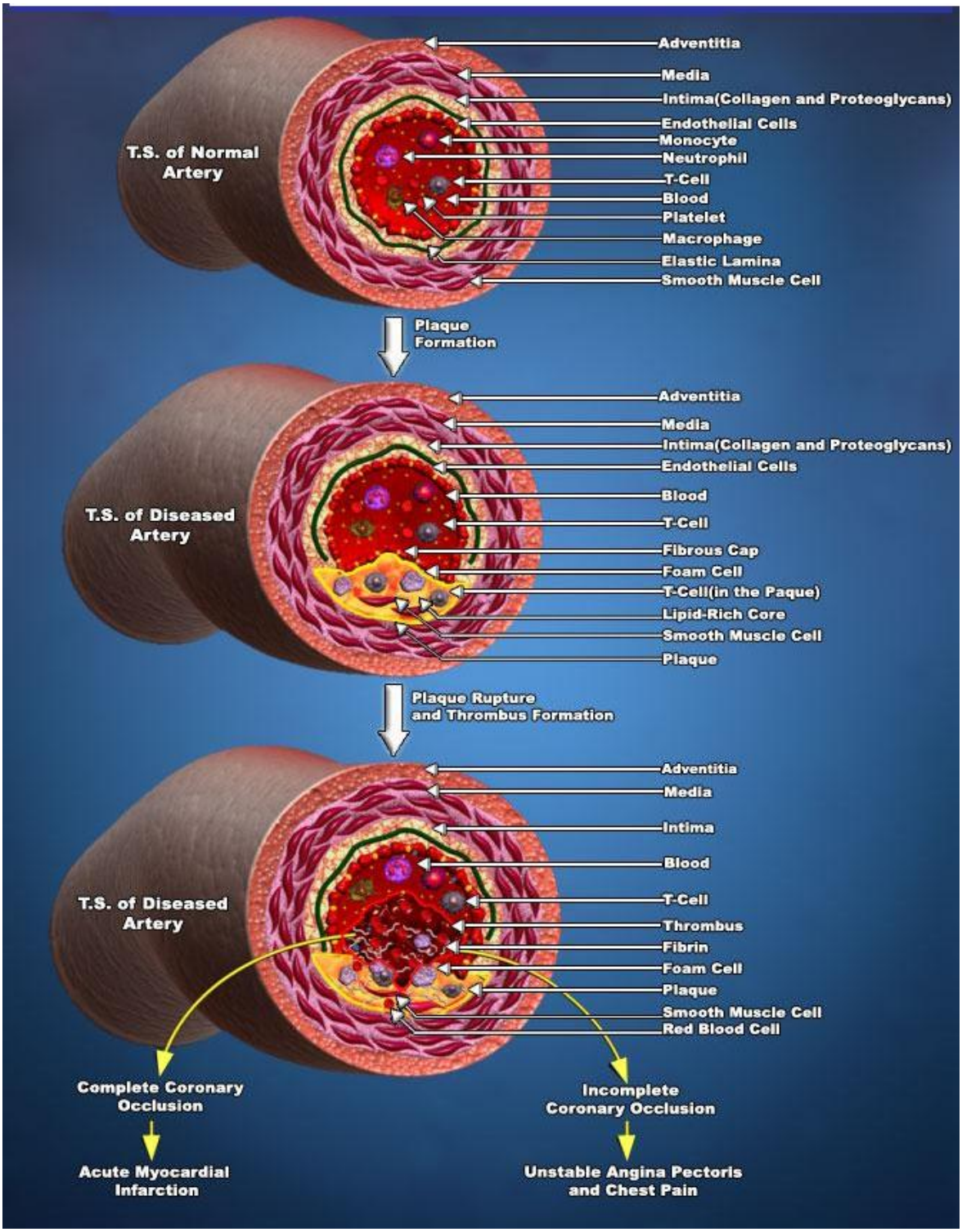
ACE	angiotensin konvertující enzym
ACEI	inhibitory ACE
AIM	akutní infarkt myokardu
AK	aminokyseliny
ALK	activin receptor-like kinase
Apo B	apolipoprotein B je strukturální protein chylomikronů, lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL)
BMI	body mass index
BMP	bone morphogenetic protein; skupina bílkovin přítomných v kostech, které rozhodujícím způsobem ovlivňují vývoj kosterní soustavy; řadí se mezi růstové faktory
bFGF	basic fibroblast growth factor - základní fibroblastový růstový faktor
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD105	endoglin
CLL	chronická lymfocytární leukemie
CSFs	kolonie stimulující faktory
CRP	C reaktivní protein
CT	počítačová tomografie
CTLA	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen; inhibiční molekula
DM	diabetes mellitus
ED	endoteliální dysfunkce
ET	esenciální trombocytopénie
EKG	elektrokardiogram
ET - (1-3)	endotelin, silný vazokonstriktor
FAD	flavindinukleotid
FBN	gen kódující syntézu fibrilinu
FGF	fibroblast growth factor – fibroblastový růstový faktor
FMD	flavinmononukleotid
FMD	flow-mediated dilation - ultrazvukové hodnocení funkce cévního endotelu
GMC	glomerulární mesangiální buňky

GTP	guanosin trifosfát
HB – EGF	heparin binding epidermal growth factor-like growth factor - heparin vázající epidermální růstový faktor podobný růstovému faktoru
HMG – CoA	β - hydroxy - β - methyl - glutaryl - CoA
HSC	jaterní steatické buňky
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
ICAM	intercellular adhesion molecules – mezibuněčné vazoadhezivní molekuly
IKP	index poměr kotník/paže, tj. poměr systolického tlaku naměřeného u kotníků a systolického tlaku naměřeného na paži
IMA	ischemií modifikovaný albumin
IMT	intima-media thickness - výška komplexu intima/media
IVUSG	intravaskulární ultrasonografie
IGF	insulin – like growth factor - inzulínu podobný růstový faktor
IL	interleukin
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LAK	lymphokine-activated killers
LAP	latency associated peptide
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
Lp (a)	lipoprotein A
MCPO	monocyte chemotactic protein - monocytární chemotaktický protein
MPO	myeloperoxidáza
MS	Marfanův syndrom
NADHP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
oxLDL	oxidované LDL
PAI	inhibitor aktivace plazminogenu
PAPP – A	pregnancy-associated plasma protein A
PDGF	platelet derived growth factor - z destiček odvozený růstový faktor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molekule - destičková adhezivní molekula
PlGF	placentární růstový faktor
PSA	specifický prostatický antigen

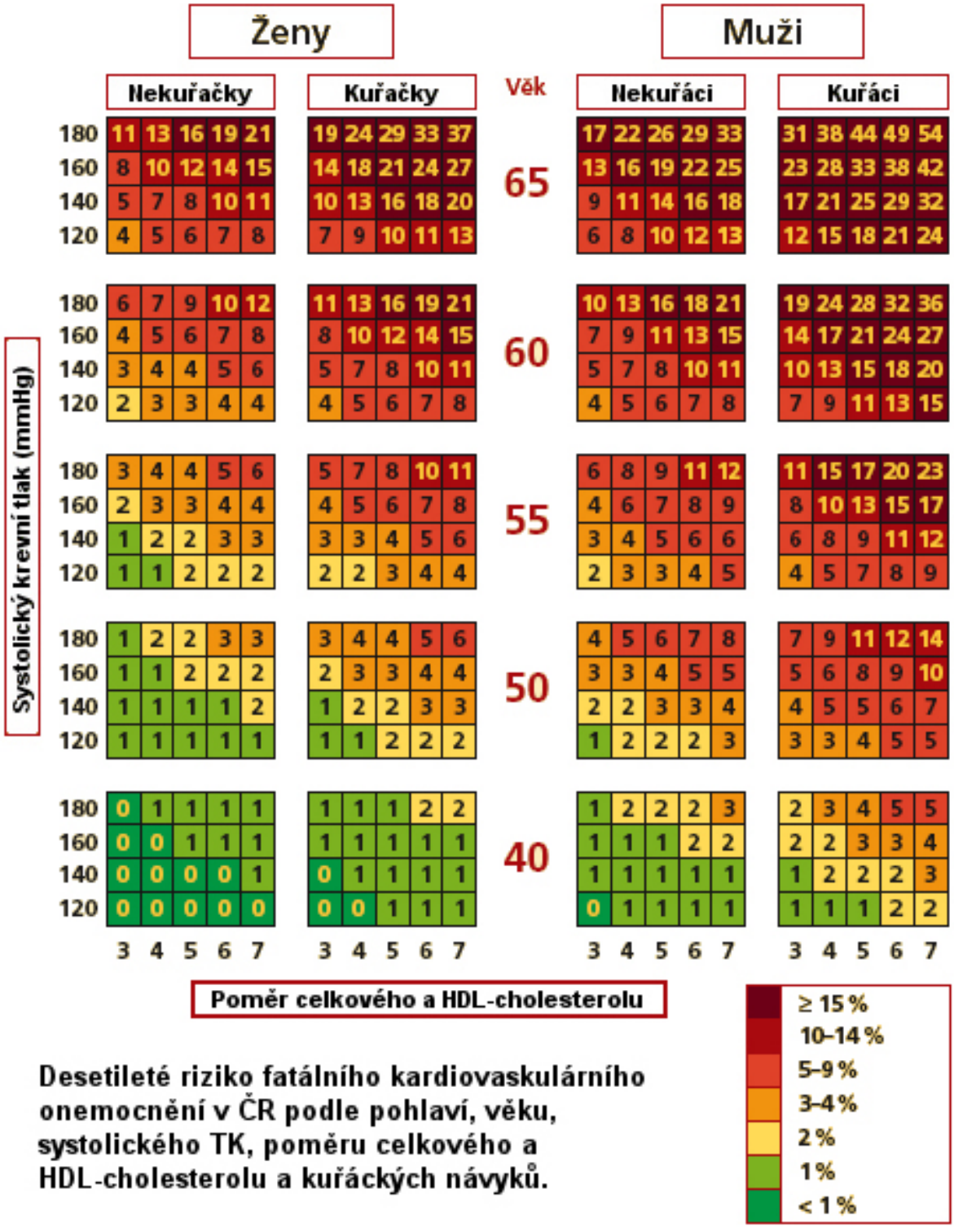
PUFA	polyunsaturated fatty acids – polynenasycené mastné kyseliny
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
sCD105	solubilní endoglin
SCUBE	signální protein; biomarker aktivace krevních destiček u akutních trombotických příhod
SMAD	jaderné efektory TGF - β receptorů; šíří signál do jádra
TAG	triacylglyceroly
TβRII	TGF - β typ II receptor
TβRI	TGF - β typ I receptor
TNF	tumor necrosis factor – tumor nekrotizující faktor
TGF	transforming growth factor - transformující růstový faktor.
Treg	T regulační lymfocyty
TX (A)	tromboxan (A)
USG	ultrasonografie
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
VCAM	vascular cellular adhesion molecules intercellular adhesion molecules - vaskulární cytoadhezivní molekuly
VSMC	hladkosvalové cévní buňky
ZP	zona pellucida

9 Přílohy

Příloha č. 1 Progrese aterosklerózy [78]

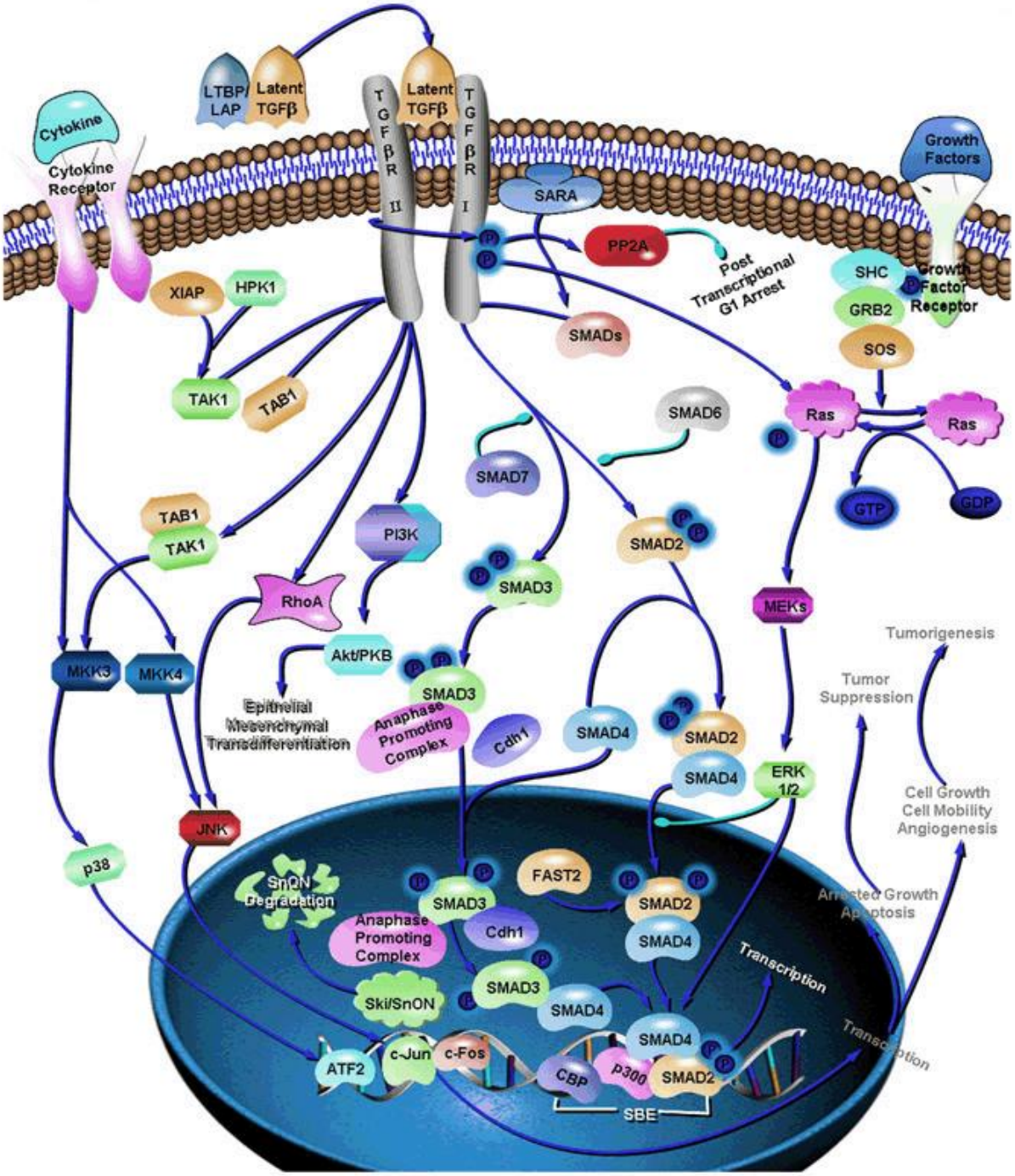


Příloha č. 2 Tabulka kardiovaskulárního rizika podle projektu SCORE pro českou populaci [79]



Desetileté riziko fatálního kardiovaskulárního onemocnění v ČR podle pohlaví, věku, systolického TK, poměru celkového a HDL-cholesterolu a kuřáckých návyků.

Příloha č. 3 TGF – β signalizace [86]



Členové TGF-β rodiny jsou exprimovány v různých tkáních, kde pak hrají důležitou roli v udržení homeostaze. Buňky imunitního systému, včetně B - lymfocytů, T - lymfocytů a dendritických buněk, stejně tak jako makrofágy uvolňují sekrecí TGF-β, který negativně reguluje jejich proliferaci, diferenciaci a aktivaci jinými cytosiny. TGF - β má mohutný imunosupresivní účinek. TGF-β signalizace vede k autoimunitním onemocněním, zánětu, vzniku nádorových onemocnění.