

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

Vliv podávání atorvastatinu na expresi endoglinu
v aterosklerotických plátech.

The atorvastatin effect on endoglin expression in the
atherosclerotic plaques.

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2011

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD
Zuzana Neumanová

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD za odborné vedení, podnětné konzultace, rady, připomínky a vlídnou spolupráci při sestavování mé diplomové práce. Poděkování také patří mé rodině, příteli a kamarádům za podporu nejen v době sepisování této práce.

Abstrakt

Zuzana Neumanová

Vliv podávání atorvastatinu na expresi endoglinu v aterosklerotických plátech.

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce: Sledovali jsme expresi endoglinu v aterosklerotických plátech u Apo E/LDL receptor deficientních myší s ohledem na podávání atorvastatinu.

Metody: Použili jsme myši kmene C57BL/6J s dvojitou deficiencí apolipoproteinu E a LDL receptoru. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin a obě skupiny byly krmeny speciálními dietami obsahující buď 1 % cholesterolu nebo k cholesterolu navíc atorvastatin v dávce 50 mg na 1 kg váhy zvířete denně. Byla provedena biochemická analýza vzorků krve. Histologické barvení olejovou červení jsme použili pro stanovení množství lipidů v aterosklerotických plátech. Dále byla provedena imunohistochemická analýza aortálního sinu. Detekce exprese endoglinu byla provedena pomocí metodiky Avidin-Biotin (ABC).

Výsledky: Atorvastatinová léčba vedla k významnému snížení hladin celkového, VLDL a LDL cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou. Histologické barvení olejovou červení dokázalo přítomnost aterosklerotických lézí u obou skupin zvířat. Podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu poklesu velikosti těchto lézí ve srovnání s kontrolní skupinou. Imunohistochemická analýza prokázala silnější expresi endoglinu v aterosklerotických plátech v cévní stěně u atorvastatinové skupiny.

Závěr: Zvýšení exprese endoglinu by mohlo mít protektivní vliv na aterosklerotický proces, což by mohlo přispívat k pozitivnímu vlivu statinů na aterogenezi.

Abstract

Zuzana Neumanová

The atorvastatin effect on endoglin expression in the atherosclerotic plaques.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background: We observed the expression of endoglin in atherosclerotic plaques in Apo E/LDL receptor deficient mice with regard to the atorvastatin treatment.

Methods: We used C57BL/6J mice with double deficiency of apolipoprotein E and LDL receptor. Animals were divided into two groups and both groups were fed with special diet containing either 1 % of cholesterol or cholesterol with atorvastatin at a dose of 50 mg/kg/day. Biochemical analysis of blood samples was performed. Histological staining with oil was performed for the determination of lipids in atherosclerotic lesions. The immunohistochemical analysis of aortic sinus was also performed. Expression of the endoglin was detected using the Avidin-Biotin method (ABC).

Results: Atorvastatin treatment resulted in a significant decrease of total, VLDL and LDL cholesterol in comparison with the control group. Histological staining with oil red demonstrated the presence of the atherosclerotic lesions in both groups of animals. Atorvastatin treatment reduced the lesion size area staining when compared to control group. Immunohistochemical analysis showed stronger expression of endoglin in vascular endothelium and atherosclerotic plaques at atorvastatin group.

Conclusions: Increased expression of endoglin could have a protective effect on the atherosclerotic process, which could contribute to the positive effect of statins on atherogenesis.

Obsah

1. ÚVOD	8
2. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE KREVNÍCH CÉV	9
2.1. OBEČNÁ STAVBA KREVNÍCH CÉV	9
2.2. KAPILÁRY	10
2.3. ARTÉRIE	12
2.4. VÉNY	13
3. ATEROSKLERÓZA	15
3.1. RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY	16
3.2. HODNOCENÍ KARDIOVASKULÁRNÍHO RIZIKA	16
3.3. MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ JEDNOTLIVÝCH RIZIKOVÝCH FAKTORŮ ATEROSKLERÓZY ...	19
3.3.1. DYSLIPIDÉMIE	19
3.3.2. KOUŘENÍ	20
3.3.3. ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE	20
3.3.4. DIABETES MELLITUS A PORUŠENÁ GLUKÓZOVÁ TOLERANCE	21
3.3.5. OBEZITA CENTRÁLNÍHO TYPU	22
3.3.6. NEDOSTATEK TĚLESNÉ AKTIVITY	23
3.3.7. HYPERHOMOCYSTEINÉMIE	23
3.4. PATOGENEZE ATEROSKLERÓZY	24
3.4.1. ÚLOHA LDL ČÁSTIC VE VÝVOJI ATEROSKLERÓZY	24
3.4.2. INICIACE A TVORBA LIPIDOVÉHO PROUŽKU	24
3.4.3. PROGRESE ATEROSKLERÓZY	25
3.4.4. STABILNÍ A NESTABILNÍ ATEROSKLEROTICKÝ PLÁT	26
4. MYŠÍ MODELY	28
5. ENDOGLIN	30
6. STATINY	32
6.1. FARMAKOLOGIE STATINŮ	32
6.2. ÚLOHA STATINŮ V PREVENCI ISCHEMICKÉ CHOROBY SRDEČNÍ	35
6.3. DALŠÍ MOŽNÉ TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ STATINŮ	35
6.4. ATORVASTATIN	35
7. CÍL PRÁCE (ZADÁNÍ)	37

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
8.1. ZVÍŘATA.....	38
8.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	38
8.3. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ.....	38
8.4. IMUNOHISTOCHEMIE	39
8.5. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	40
9. VÝSLEDKY	41
9.1. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	41
9.2. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ.....	42
9.3. IMUNOHISTOCHEMIE	45
10. DISKUSE.....	48
11. ZÁVĚR	50
12. SEZNAM ZKRATEK	51
13. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

1. ÚVOD

Ateroskleróza je onemocnění, při kterém dochází k průniku a ukládání tukových částic do stěn tepen spojenému s následnými zánětlivými procesy. Jde o pomalu se rozvíjející onemocnění, které je většinou odhaleno až ve svém pokročilejším stádiu. K závažným klinickým projevům aterosklerózy patří především všechny formy ischemické choroby srdeční (ICHS), cévní mozkové příhody a ischemická choroba dolních končetin (1).

K rychlému rozvoji aterosklerózy přispívají tzv. rizikové faktory (RF). Jejich ovlivněním můžeme významně snížit pravděpodobnost a rychlost vzniku komplikací aterosklerózy. Jako primární prevenci označujeme ovlivňování RF ve fázi, kdy ateroskleróza není klinicky manifestovaná. Sekundární prevence je stejný postup u pacientů, kde se již ateroskleróza klinicky projevila. Prevence zahrnuje intervenci nefarmakologickou i farmakologickou (1,2).

Ateroskleróza je hlavním důvodem vzniku kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a jejich komplikací. Ty jsou přitom hlavní příčinou morbidit a mortality v průmyslově vyspělých státech. V České republice představuje KVO úmrtnost více než polovinu všech úmrtí. V posledních dvaceti letech u nás můžeme pozorovat snížení kardiovaskulární (KV) mortality, za které jsou zodpovědné pravděpodobně nové, účinnější metody léčby, ale i modifikace životního stylu obyvatelstva a zlepšující se zdravotní péče v oblasti primární a sekundární prevence těchto onemocnění (3,4).

Léčba KVO přispívá velkou měrou ke zvyšování nákladů na zdravotní péči u nás. Důsledným uplatňováním zásad primární a sekundární prevence je možné zlepšit prognózu pacientů a osob potenciálně rizikových a zároveň snížit náklady na léčbu těchto onemocnění (3).

2. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE KREVNÍCH CÉV

2.1. *Obecná stavba krevních cév*

Krevní cévy se obvykle skládají ze tří vrstev (tunik) (5).

Tunica intima je tvořena vrstvou endotelových buněk, které tvoří nejnvnitřnější vrstvu cévy. Pod endotelem se nachází subendotelová vrstva řídkého vaziva, kde mohou být přítomny i jednotlivé hladké svalové buňky.

Tunica media je složena z vláken hladkých svalových buněk a extracelulární hmoty různého složení produkovanou těmito buňkami. Nachází se zde retikulární vlákna tvořená kolagenem typu III a elastická vlákna tvořící membranae fenestratae – tenké vrstvy s otvory, které umožňují difuzi živin do buněk v hlubších partiích stěny cév. Membrana elastica interna odděluje vrstvu tunica media od tunica intima.

Tunica adventicia je tvořena kolagenními a elastickými vlákny. Je zde převážně kolagen typu I. Membrana elastica externa tuto vrstvu odděluje od vrstvy tunica media. Tunica adventicia plynule přechází do vaziva orgánu, kterým céva prostupuje (5,6).

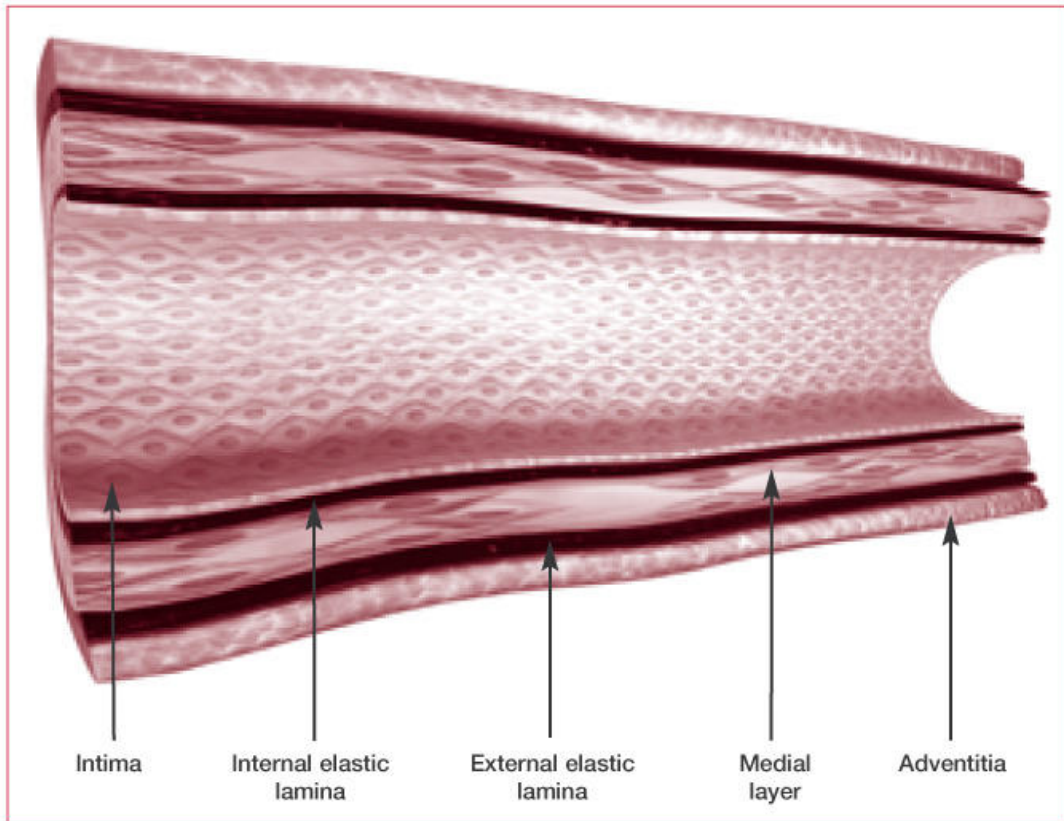
Vasa vasorum

Stěna menších cév je vyživována přímo protékající krví, větší cévy mají vybudovaný tzv. systém vasa vasorum – systém vlastních cév, které danou cévu vyživují. Systém vasa vasorum je bohatě větven ve vrstvě tunica adventicia a v zevní vrstvě tunica media. Tento systém je více uplatňován u vén, což je připisováno nižšímu obsahu kyslíku a živin ve venózní krvi (6).

Inervace

Většina krevních cév, které obsahují hladké svalové buňky, jsou inervovány sítí nemyelinizovaných vazomotorických sympatických vláken, jejichž mediátorem je noradrenalin. Artérie kosterních svalů přijímají také parasympatická nervová vlákna s mediátorem acetylcholinem (5).

Obrázek 1: Obecná stavba krevní cévy.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2216> (20.4. 2011)

2.2. Kapiláry

Kapiláry jsou cévy, které umožňují výměnu látek mezi krví a tkání. Kapiláry mají průměr 7-9 μm a jsou složeny z jedné vrstvy endotelových buněk zevně pokryté bazální laminou. Kapiláry jsou dlouhé většinou 0,25-1 mm, ale v dřeni ledvin a kůře nadledvin jejich délka může dosáhnout až 50 mm (6).

Endotelové buňky jsou ploché, polygonální, protáhlé ve směru toku krve. Jednotlivé buňky jsou spojeny především prostřednictvím zonulae occludentes, jejichž množství a charakter ovlivňuje výslednou permeabilitu kapiláry (6).

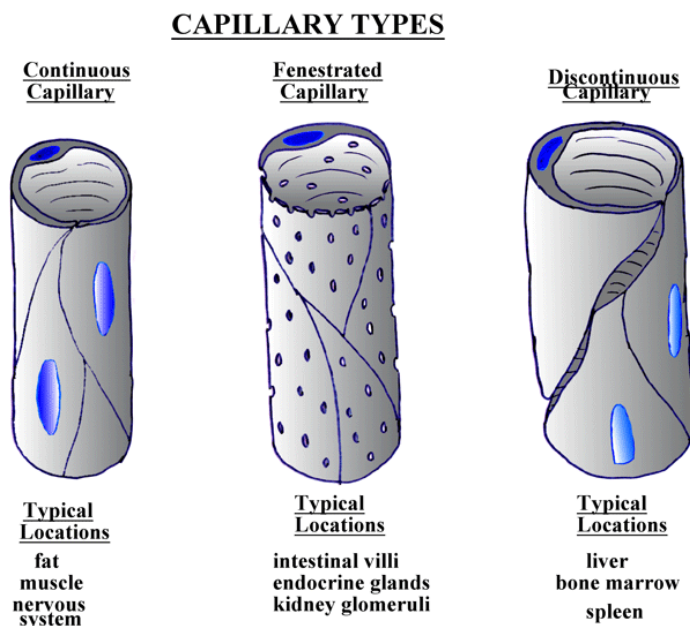
Podél kapilár a venul se také na různých místech nachází pericyty – buňky s dlouhými výběžky. Tyto buňky mají vlastní bazální laminu, která může splývat s laminou endotelu. Složení pericytů naznačuje možnost kontraktility těchto buněk, které pravděpodobně suplují vrstvu tunica media (5,6).

V závislosti na složení cévní stěny můžeme kapiláry rozdělit do 3 skupin (8):

- 1) **Souvislé (somatické) kapiláry** – kapiláry, pro které je typická absence fenestrací. Transport makromolekul endotelovými buňkami je zajišťován pomocí pinocytárních váčků.
- 2) **Fenestrované (viscerální) kapiláry** – kapiláry s četnými fenestracemi ve výběžcích endotelových buněk. Fenestrace jsou otvory v buňce uzavřeny diafragmou – tenkou přepážkou. Tyto kapiláry jsou typické tam, kde dochází k rychlé výměně látek mezi krví a tkání, např. ve střevech a žlázách s vnitřní sekrecí.
- 3) **Sinusoidní kapiláry** – tyto kapiláry jsou typické přítomností diskontinuální bazální laminy a endotelovými buňkami s četnými otvory bez diafragmy. Otvory se nachází i mezi jednotlivými endoteliálními buňkami. Lumen kapilár je nepravidelné a v okolí se nachází makrofágy. Tento typ kapilár můžeme najít především v játrech a slezině (8).

Kapiláry vytvářejí kapilární síť spojující malé artérie a vény. Kromě toho existují i přímá spojení mezi artériemi a vénami – arteriovenózní anastomózy, které hrají důležitou úlohu v regulaci krevní cirkulace v mnoha orgánech (6).

Obrázek 2: Typy kapilár.



<http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/capillaries/> (20.4 2011)

2.3. Artérie

Artérie jsou cévy přinášející tkáním krev bohatou na kyslík a živiny. Dle velikosti je dělíme na arterioly, svalové artérie středního a velkého kalibru a velké artérie elastického typu (5).

Arterioly

Arterioly mají průměr menší než 0,5 mm. Jejich endotelové buňky jsou podobné endotelium kapilár. Membrana elastica interna se objevuje až ve větších artériích, u arterioly zpravidla chybí. Tunica media je složena až z pěti vrstev svalových buněk. Tunica adventicia je tenká a membrana elastica externa chybí (5).

Artérie svalového typu

Jsou v lidském těle nejvíce zastoupeny. Endotelová vrstva je podobná arteriolám a kapilárám, subendotelový prostor je ale tlustší s občasným výskytem hladkých svalových buněk. Tunica media je složena až ze 40 vrstev hladké svaloviny. Mezi svalovými vlákny dále nacházíme vlákna elastická a retikulární s proteoglykany. Membrana elastica interna je u těchto artérií dobře vyvinuta, membrana elastica externa je pak přítomna jen ve větších cévách. Tunica adventicia je tvořena kolagenními a elastickými vlákny, vyskytují se zde v malé míře i fibroblasty a adipocyty. Také jsou v této vrstvě přítomny vasa vasorum, lymfatické cévy a nervy (5,6).

Velké artérie elastického typu

Sem řadíme aortu, její hlavní větve a truncus pulmonalis. Tunica intima je silnější než v menších artériích. Membrana elastica interna není dobře rozpoznatelná. Tunica media je tvořena perforovanými elastickými membránami, jejichž počet v průběhu života narůstá. Stárnutím se tyto membrány stávají metabolicky inertní. Mezi nimi se dále nachází vlákna hladkých svalových buněk, retikulární vlákna a základní hmota obsahující převážně chondroitin sulfát. Membrana elastica externa není vyvinuta. Tunica adventicia je tvořena elastickými a kolagenními vlákny (6).

2.4. Vény

Vény slouží k odvodu krve s oxidem uhličitým a s produkty metabolismu zpět do srdce. Rozlišujeme venuly a malé, střední a velké vény. V porovnání s artériemi mají vény obecně tenčí cévní stěnu (5,6).

Venuly

Venuly mají průměr 0,2-1 mm. Tunica intima je tvořena endotelem a malou vrstvou subendotelu. Tunica media je velmi tenká a obsahuje několik málo vrstev buněk hladké svaloviny, u některých venul nejsou svalová vlákna přítomna vůbec. Tunica adventicia tvoří nejsilnější vrstvu obsahující kolagen (6).

Malé a střední vény

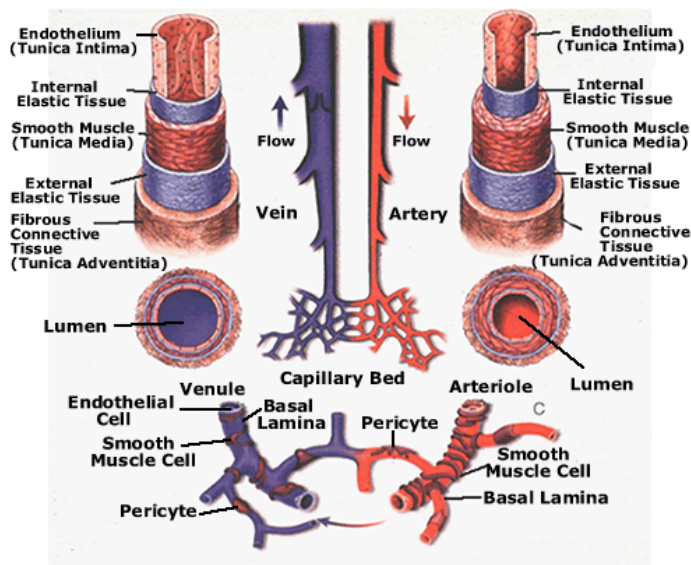
Mají v průměru 1-9 mm. Podobně jako u venul je tunica intima velmi tenká. Tunica media je tvořena svazky hladkých svalových buněk společně s retikulárními a elastickými vlákny. Tunica adventicia je dobře vyvinuta, obsahuje kolagenní vlákna a mohou se zde vyskytnout i buňky hladké svaloviny (6).

U malých a středně velkých vén jsou vyvinuty chlopně, které usměřují tok krve do srdce. Jsou to párovité kapsovitě výběžky tunica intima oboustranně kryté endotelem. Transport krve směrem k srdci je dále posilován kontrakcemi okolních kosterních svalů (5,6).

Velké vény

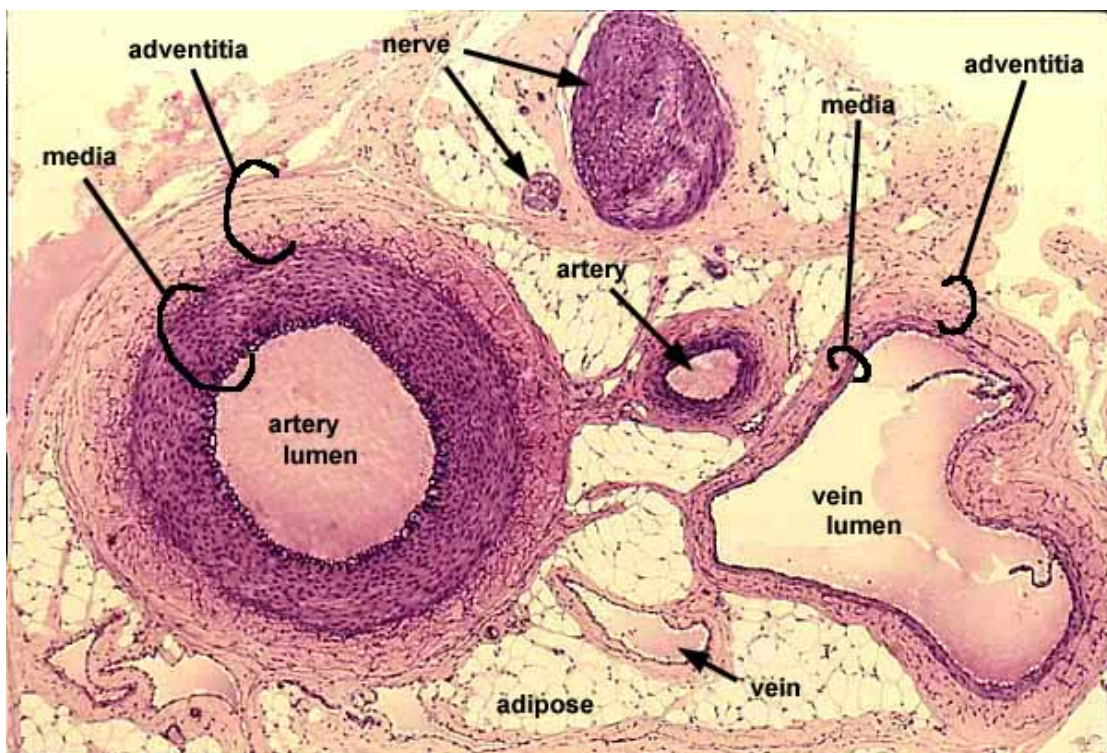
Struktura stěny velkých vén se liší v závislosti na lokalizaci cévy. Tunica intima je dobře vyvinuta a je silnější než u menších vén. Tunica media je tenká a obsahuje jen několik vrstev hladkých svalových buněk. Tunica adventicia je nejsilnější, u velkých vén ležících pod úrovní srdce obsahuje podélné svazky hladké svaloviny sloužící k zesílení stěny vén a zabraňující jejímu roztažení. U velkých vén, které ústí do srdce můžeme v blízkosti tohoto vyústění nalézt i menší množství srdečního příčně pruhovaného svalstva (5,6).

Obrázek 3: Porovnání stavby cévních stěn artérií a vén.



<http://anteportaminferam.blog.cz/rubrika/matuni-otazky-do-osetrovatelstvi>
(21.4.2011)

Obrázek 4: Porovnání cévních stěn artérie a vény na histologickém řezu.



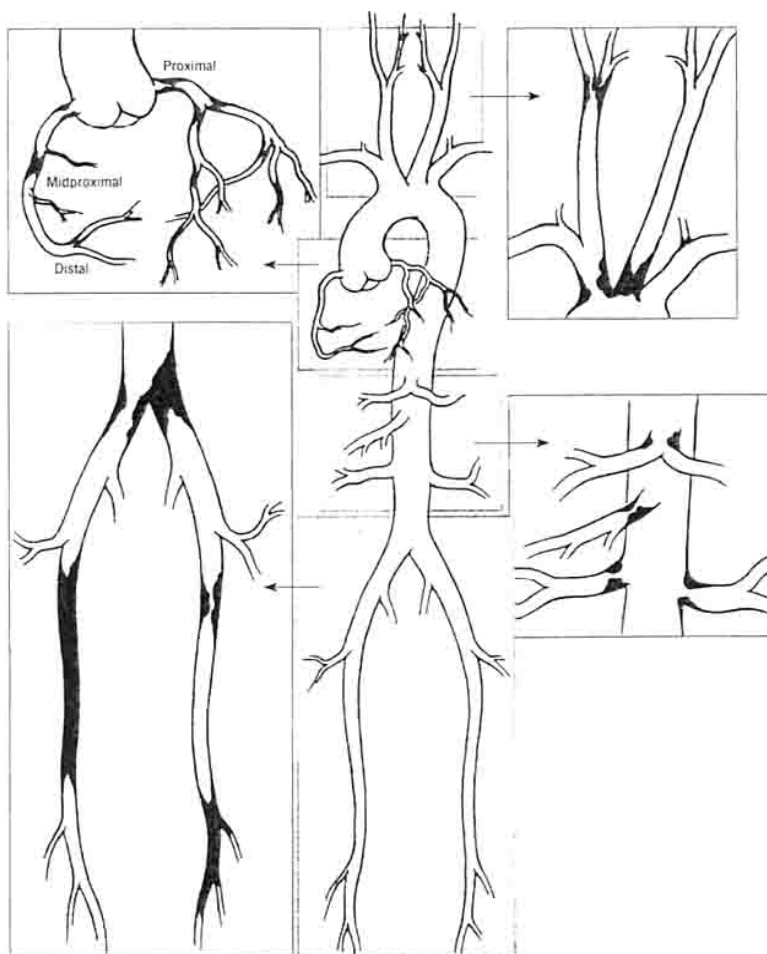
<http://www.siumed.edu/~dking2/crr/CR025b.htm> (20.4. 2011)

3. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je chronické onemocnění, které primárně postihuje elastické artérie a artérie svalového typu. Klinicky se ateroskleróza manifestuje většinou až ve svém pokročilém stádiu, ale už v poměrně mladém věku je možné ve stěnách cév najít lipidní proužky, ze kterých se ateromatózní pláty vyvíjejí (12,13).

Ateroskleróza nejčastěji postihuje břišní aortu, koronární a podkolenní artérie, dále vzestupnou hrudní aortu, vnitřní karotidy a Willisův okruh (14). Hlavní komplikací spojenou s aterosklerózou menších tepen je snížení až úplná zástava krevního průtoku. To vede k ischemiím dané oblasti, která může vyústit až v nekrózu tkáně. U velkých tepen, především v aortě, může vlivem aterosklerózy vzniknout výduť - aneuryzma. Hrozí pak jeho disekce nebo perforace (1,12).

Obrázek 5: Lokalizace aterosklerózy v aortě a cévách vycházejících z aorty.



Ateroskleróza nejčastěji postihuje místa, kde dochází k větvení cév (15).

<http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1480/figures.htm> (21.4. 2011)

3.1. Rizikové faktory aterosklerózy

Dřívější teorie, které popisovaly aterosklerózu jako postižení cévní stěny způsobené mechanickým ukládáním cholesterolu do stěn cév, jsou už překonány. Dnes je ateroskleróza charakterizována jako složitý zánětlivý proces, kde hlavní roli hrají reakce na poranění endotelu. Dysfunkční endotel pak hraje základní úlohu ve všech fázích aterosklerózy. RF tohoto poškození jsou všeobecně známé, nejdůležitější z nich jsou aterogenní lipidy (1,16).

Rozlišujeme ovlivnitelné a neovlivnitelné RF (1).

Neovlivnitelné rizikové faktory

- Věk (vyšší riziko manifestace u mužů po 45. roce a u žen po 55. roce života)
- Rodinná anamnéza (manifestace aterosklerózy u rodičů nebo sourozenců mužského pohlaví před 55. a u žen před 65. rokem života)
- Pohlaví (u mužů je obecně vyšší riziko než u žen)

Ovlivnitelné rizikové faktory

- Dyslipidémie
- Kouření
- Arteriální hypertenze
- Diabetes mellitus a porušená glukózová tolerance
- Obezita centrálního typu
- Nedostatek tělesné aktivity
- Hyperhomocysteinémie

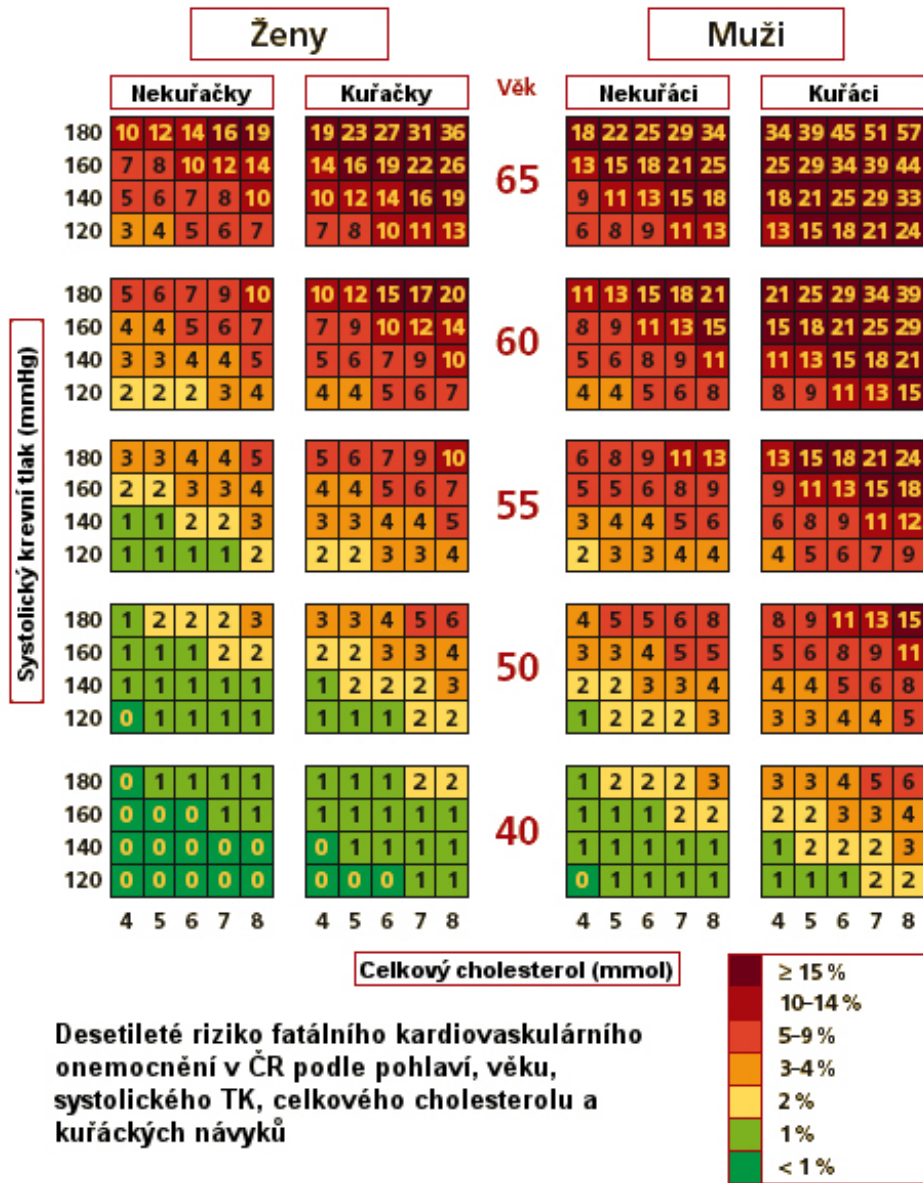
Je důležité sledovat osoby s těmito RF. Čím více jich u osoby nalezneme, tím je větší pravděpodobnost výskytu aterosklerózy a tím i riziko vzniku KV příhod. Při snižování celkového KV rizika ovlivňujeme všechny RF, které ovlivnit lze (3).

3.2. Hodnocení kardiovaskulárního rizika

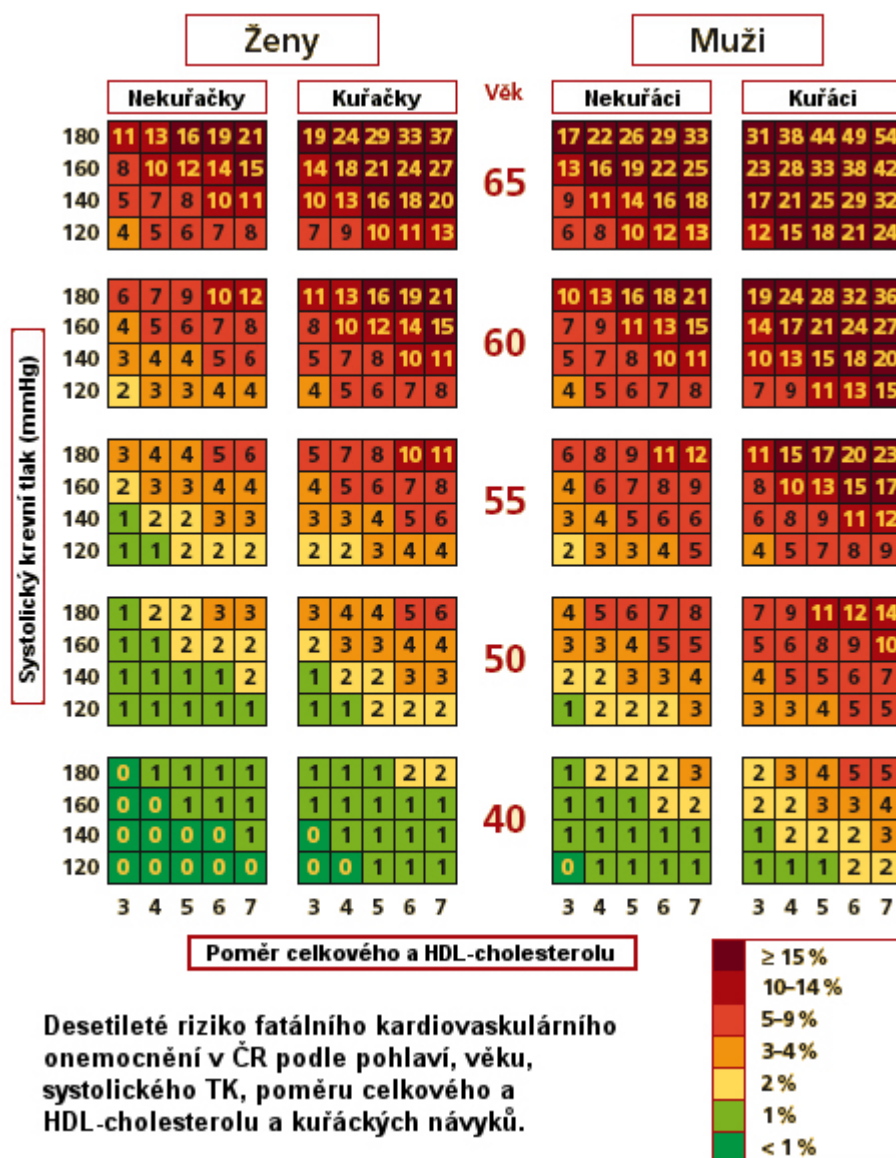
Pacienti s vyjádřeným KVO, diabetem mellitu 2. typu nebo 1. typu s mikroalbuminurií a pacienti s velmi vysokými hodnotami jednotlivých RF mají automaticky vysoké KV riziko. Doporučena je okamžitá intervence všech rizikových faktorů (3).

Pro ostatní pacienty se doporučuje k hodnocení KV rizika použít tabulek SCORE, které vyjadřují desetileté riziko pro úmrtí z KV příčiny.

Obrázek 6: Tabulka KV rizika pro českou populaci dle pravidel SCORE.



Obrázek 7: Tabulka KV rizika pro českou populaci dle pravidel SCORE.



Obrázek 6-7:

<http://www.athero.cz/odkazy-a-zdroje-informaci/vypocet-rizika/tabulka-kardiovaskularniho-rizika.html> (21.4. 2011)

Za osoby s vysokým KV rizikem považujeme kromě výše zmíněných také všechny osoby, jejichž desetileté riziko úmrtí na KV příčinu podle tabulek SCORE je vyšší nebo rovno 5% (18).

S vyšším rizikem než vyplývá z tabulek SCORE je třeba počítat u následujících skupin pacientů (19):

- u pacientů se sedavým způsobem života, nadváhou a obezitou

- u asymptomatických osob s preklinickými známkami aterosklerózy (zjištěné např. sonografickým vyšetřením)
- u osob s pozitivní rodinnou anamnézou KVO
- u osob s nepříznivými hodnotami HDL cholesterolu a triglyceridů
- u osob s porušenou glukózovou tolerancí

3.3. Možnosti ovlivnění jednotlivých rizikových faktorů aterosklerózy

3.3.1. Dyslipidémie

Pro stanovení cílových hodnot hladin krevních lipidů se řídíme výsledky intervenčních studií. Ty doporučují různé maximální hodnoty celkového a LDL cholesterolu pro různé skupiny dle míry jejich KVO rizika (18,20).

Tabulka 1: Cílové hodnoty krevních lipidů (18).

	Populace obecně	Bez KVO, riziko ≥ 5 %, DM 2, DM 1 s mikroalbuminurií	Přítomnost KVO
Celkový cholesterol	< 5 mmol/l	< 4,5 mmol/l	< 4,0 mmol/l
LDL cholesterol	< 3 mmol/l	< 2,5 mmol/l	< 2,0 mmol/l

Hodnoty HDL cholesterolu a triglyceridů jsou ukazatelé zvýšeného KVO rizika, ale jejich cílové hodnoty určeny nejsou. Doporučená hodnota triglyceridů je < 1,7 mmol/l u obou pohlaví, doporučené hodnoty HDL cholesterolu jsou pak > 1,0 u mužů a > 1,2 mmol/l u žen (18).

Pro všechny pacienty s dyslipidemií jsou zásadní režimová opatření zahrnující především zanechání kouření, dietu a zvýšení pohybové aktivity. Celkový energetický příjem by měl být sestaven pacientovi na míru dle jeho tělesné konstituce a fyzické aktivity. Pacientům s nadváhou a obezitou je doporučeno snížení tělesné hmotnosti, pacientům s normální váhou pak její udržení. Vhodné je do jídelníčku zařadit dostatek potravy bohaté na vlákninu (případně i potravinové doplňky s vlákninou), preferovat nenasycené tuky před nasycenými, hlídat celkový příjem tuků a cholesterolu a vyvarovat se nadměrnému příjmu alkoholu. V závislosti na přidružených onemocněních se dieta může dále upravit (např. u hypertoniků je žádoucí snížení příjmu soli) (2,18).

Národní cholesterolový program v USA také podporuje příjem rostlinných sterolů v množství 2 g denně. I na našem trhu je už možno najít rostlinné tuky o rostlinné steroly obohacené (2,21).

Léčbu hypolipidemiky volíme u pacientů s vysokým KV rizikem a opět se řídíme výsledky studií. Nejvíce pozitivních výsledků zatím přinesly studie se statiny, kromě nich se u nás v současnosti pro terapii dyslipidemií užívají fibráty, ezetimib, sekvestranty žlučových kyselin a kyselina nikotinová (2,18).

3.3.2. Kouření

Kouření cigaret přispívá k rychlému rozvoji aterosklerózy především negativním ovlivněním lipoproteinového metabolismu. Je prokázáno, že u kuřáků je významně snížena hladina HDL cholesterolu a apolipoproteinu A-I. Hladiny triglyceridů, LDL, VLDL a celkového cholesterolu jsou významně zvýšené v porovnání s nekuřáky. Nejhorší výsledky vykazují těžcí kuřáci (18,22).

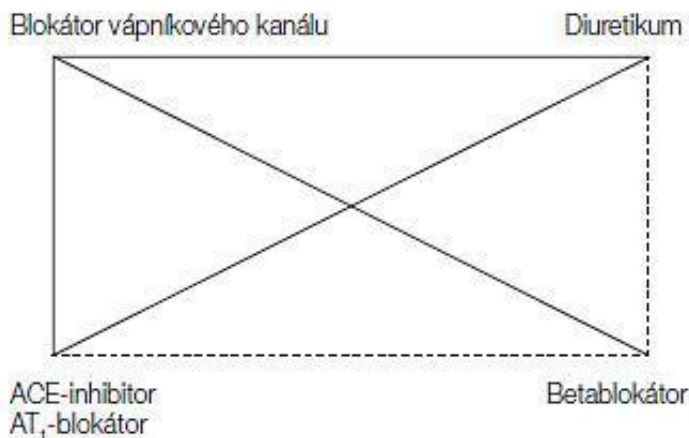
Úspěšnost při odvykání je velmi nízká, zvyšuje se ale léčbou ve specializovaných centrech pro odvykání kouření. Z léčiv jsou k dispozici přípravky pro nikotinovou substituci a antidepresiva (23).

3.3.3. Arteriální hypertenze

Arteriální hypertenze je stav charakterizovaný opakovaným zvýšením krevního tlaku nad hranici 140/90 mm Hg. Cévní stěna vystavená působení vyššího krevního tlaku je náchylnější k poškození endotelu. U vyvinutého aterosklerotického plátu je zvýšené riziko jeho ruptury. Poškození endotelu vede k převaze vazokonstrikčních mediátorů (především endotelinu) nad vazodilatačními (prostacyklin a oxid dusnatý), což vede ke zhoršení hypertenze (19,24).

Kromě obecných režimových opatření se dále doporučuje omezení léčiv podporujících retenci sodíku a vody, z volně prodejných léčiv se jedná především o nesteroidní antiflogistika. Farmakologická léčba je zásadní, protože nefarmakologická opatření většinou nevedou k dostatečné kontrole hypertenze. Při výběru vhodného antihypertenziva dáváme přednost léčivům s dostatečnými důkazy o pozitivním vlivu na kardiovaskulární mortalitu. Léky volby jsou ACE-inhibitory, AT1 blokátory, blokátory kalciového kanálu, betablokátory a diuretika. Možnosti jejich kombinací jsou vyznačeny na obrázku 8 (19).

Obrázek 8: Kombinace základních antihypertenziv.



Doporučené kombinace jsou vyznačeny plnou čarou, přerušovanou čarou kombinace s nižším antihypertenzním potenciálem (ACE-inhibitory či AT₁ blokátory s betablokátory) nebo nevhodné pro vyšší riziko vzniku nežádoucích účinků (thiazidová diuretika v kombinaci s betablokátory).

<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/kombinacni-lecba-hypertenze-v-roce-2009-447152> (21.4. 2011)

Alfablokátory a centrálně působící antihypertenziva jsou vhodná především pro kombinační léčbu. Nemají tolik důkazů o pozitivním vlivu na kardiovaskulární mortalitu jako předchozí léčiva. Poměrně nově je v ČR registrován přímý inhibitor reninu aliskiren (2).

3.3.4. Diabetes mellitus a porušená glukózová tolerance

Diabetes mellitus je onemocnění způsobené absolutním nebo relativním nedostatkem inzulínu. V důsledku toho vzniká hyperglykémie. Diabetes je diagnostikován, pokud je glykémie měřená nalačno vyšší nebo rovna hodnotě 7 mmol/l, o poruše glukózové tolerance mluvíme, pokud je tato hodnota v rozmezí 5,6 – 6,9 mmol/l (1).

Nekompenzovaný diabetes zrychluje vývoj aterosklerózy především glykací LDL částic, ze kterých se touto modifikací stávají vysoce aterogenní částice (1,26).

Z nefarmakologických opatření se uplatňuje vhodná dieta a fyzická aktivita, další postupy jsou voleny s ohledem na případná přidružená onemocnění. Farmakologická léčba se u pacientů liší v závislosti na typu diabetu. Diabetici I. typu jsou léčeni

inzulíny, diabetici II. typu užívají perorální antidiabetika a u některých z nich je indikován i inzulín. U diabetiků II. typu se jako lék první volby nasazuje metformin, ke kterému se případně přidávají další léčiva (deriváty sulfonylurey či glitazony) do kombinace. Při selhání této léčby se nasazuje inzulín (1,27).

Z dalších antidiabetik je možné užít glinidy, které urychlují vyplavování inzulinu podobně jako deriváty sulfonylurey, ale jejich účinek je kratší, což snižuje riziko vzniku hypoglykemií. Limitujícím faktorem je zatím jejich vyšší cena. Nejnovější skupinou léčiv jsou pak inkretinová mimetika a analoga, která jsou na trhu krátce (1).

3.3.5. Obezita centrálního typu

O obezitě mluvíme, pokud je naměřená BMI (podíl tělesné hmotnosti vyjádřené v kilogramech a druhé mocniny tělesné výšky uvedené v metrech) vyšší než 30 kg/m^2 . Obezita je v současnosti celosvětovým problémem a stává se epidemií jak u dospělých tak u dětí. Obezita může být součástí závažného metabolického syndromu (28,29).

Tuková tkáň je metabolicky aktivní endokrinní orgán, který je schopen produkovat řadu látek s různým metabolickým účinkem. Přítomnost většího množství viscerálního abdominálního tuku je spojeno s hyperinzulinémií, hyperglykemií a dyslipidemií a představuje proto vysoké riziko pro vývoj aterosklerózy (31).

Při redukci váhy je nezbytná úprava stravovacích návyků a zařazení vhodné fyzické aktivity. Pro farmakoterapii jsou v současnosti k dispozici sibutramin inhibující zpětné vychytávání serotoninu a noradrenalinu v centru sytosti a inhibitor střevní lipázy orlistat (28).

Obrázek 9: Kritéria pro stanovení metabolického syndromu.



<http://www.vychovakezdravi.cz/clanky/vyziva/edukacni-materialy.html> (21.4 2011)

3.3.6. Nedostatek tělesné aktivity

I mírná ale pravidelná fyzická aktivita vede k významnému snížení kardiovaskulárního rizika. Dochází k úpravě dyslipidemií a cvičení má pozitivní vliv na KV i celkovou mortalitu. Při cvičení by měla být tepová frekvence v rozsahu 60-75% maximální tepové frekvence pacienta (2,32).

Je zajímavé zjištění, že osoby, které pravidelně cvičí (2-3x týdně 45-60 minut nebo 4-5x týdně 20-30 minut) a mají nadváhu (FIT-FAT) jsou v nižším kardiovaskulárním riziku než osoby s ideální hmotností, ale nízkou fyzickou aktivitou (NONFIT-NONFAT) (2).

3.3.7. Hyperhomocysteinémie

Zvýšená hladina homocysteinu je spojována s vyšším KV rizikem. Ve studiích se suplementací kyselinou listovou a vitaminy skupiny B sice snížila hladina homocysteinu, ale na snížení KV rizika to zásadní vliv nemělo (18).

3.4. Patogeneze aterosklerózy

Klíčová je pro rozvoj aterosklerózy endotelová dysfunkce (16). Endotel je tkáň aktivní v mnoha procesech, zásadní je jeho bariérová funkce, kdy kontroluje průnik krevních elementů cévní stěnou. Dále různými způsoby ovlivňuje cévní tonus, koagulaci, fibrinolýzu a růst cév. V případě narušené funkce endotelu působením výše uvedených RF se projeví zvýšená permeabilita s převahou vazokonstrikčních a protrombogenních vlastností. To zhoršuje aterosklerózu ve všech jejích stádiích (26,33).

3.4.1. Úloha LDL částic ve vývoji aterosklerózy

Lipidy jsou v plazmě transportovány jako lipoproteiny - komplexy složené z hydrofobní lipidové složky a proteinové části. Pro vývoj aterosklerózy jsou nejvýznamnější LDL částice, které postupně vznikají z VLDL a IDL částic působením enzymů. LDL částice přináší cholesterol extrahepatálním buňkám (34,35).

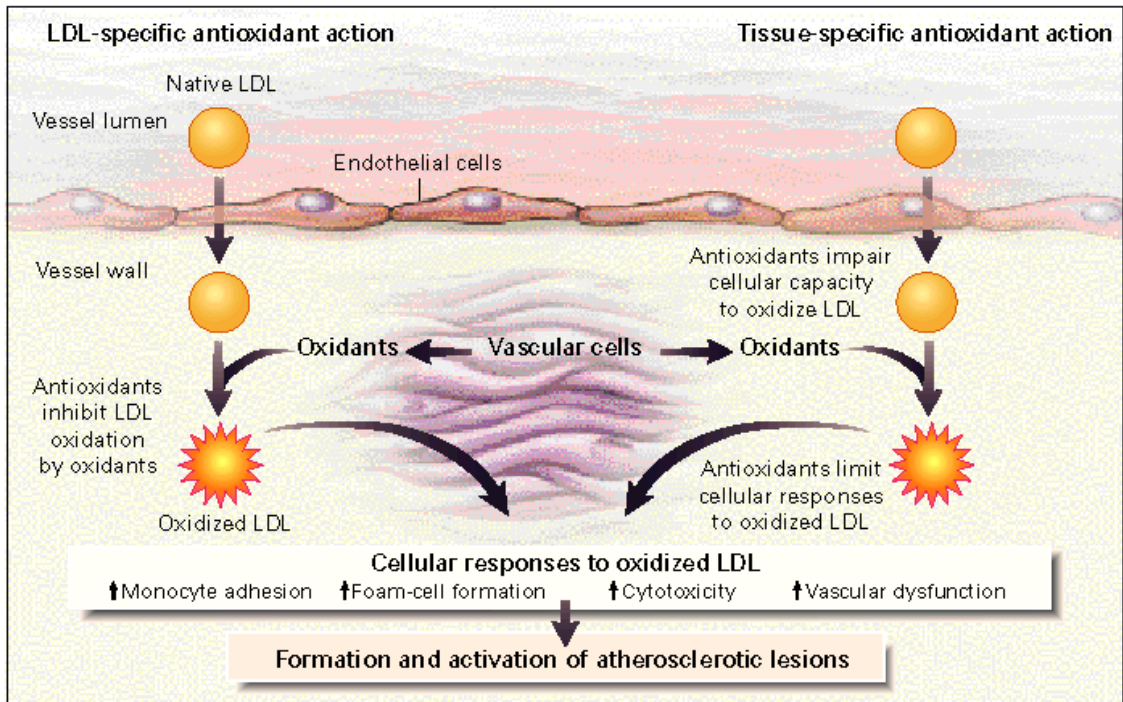
Chemickou modifikací, zejména oxidací, získává LDL cholesterol silné proaterogenní vlastnosti. Především mírně modifikované LDL částice působí na endotel a vyvolávají změny, díky kterým pronikají monocyty ve zvýšené míře do subendotelu. Silně modifikované LDL částice pak přímým cytotoxickým působením na endotelové buňky prohlubují endotelovou dysfunkci. Dále mají modifikované LDL částice imunogenní efekt, zesilují prokoagulaci a snižují tvorbu oxidu dusnatého a znesnadňují tak vazoreflexi cévy. Významný je i jejich mitogenní efekt na buňky hladké svaloviny (26,36).

3.4.2. Iniclace a tvorba lipidového proužku

Přes narušený endotel pronikají krevní lipidy a modifikují se zde na aterogenní částice, které mají výše uvedené efekty. Dochází k přestupu monocytů přes endotel a jejich aktivaci na makrofágy. LDL částice se váží na buňky prostřednictvím LDL receptorů, což je vlastnost, která jim zůstává i v případě mírné modifikace jejich struktury. Silně modifikované LDL částice tuto schopnost ztrácí a jsou vychytávány tzv. scavengerovými receptory na povrchu makrofágů. Vychytávání těchto částic není regulované a v případě jejich zvýšené nabídky dochází k tvorbě pěnových buněk (26,37).

Tukové proužky obsahující kumulované pěnové buňky s lipidy se jeví jako dobře ohraničené nažloutlé tečky nebo proužky a jsou viditelné pouhým okem ve stěně cév (13,38).

Obrázek 10: Tvorba lipidového proužku.



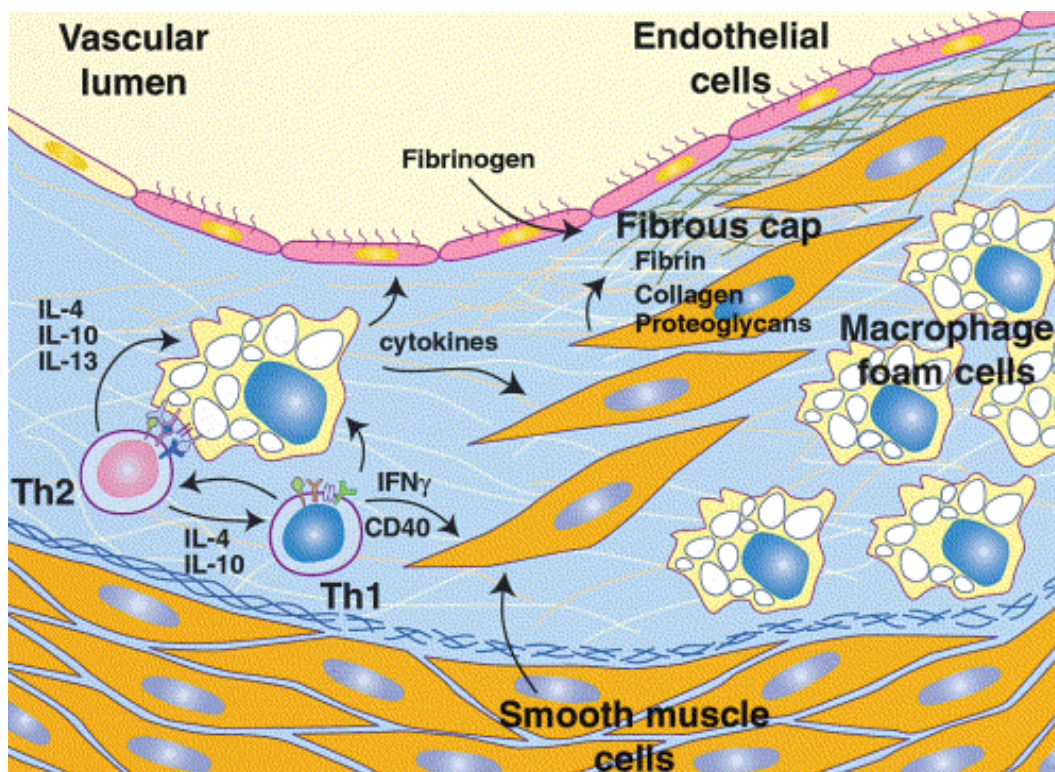
<http://ftplf2.agarek.com/fyziologia/interna/atero+ichs.ppt> (23.4. 2011)

3.4.3. Progrese aterosklerózy

K růstu a vývinu aterosklerotických plátů přispívá velkou měrou imunitní systém. Hlavní úlohu v tomto procesu mají makrofágy, které kromě toho, že tvorbou pěnových buněk objemově vyplňují aterosklerotické pláty, mají i významné prozánětlivé funkce. Produkují řadu mediátorů zánětlivého procesu jako jsou PDGF, FGF, TNF- α , IL-1, interferon alfa a TGF β ovlivňující aktivitu buněk hladké svaloviny a endotelu. Tvorba enzymů makrofágů je v dalších fázích důležitá pro stabilitu plátu. T lymfocyty se na zánětlivé odpovědi podílejí také, naopak B lymfocyty se v plátech objevují spíše vzácně (38,40).

Buňky hladké svaloviny migrují z vrstvy tunica media do tunica intima pod vlivem cytokinů. Následně dochází k jejich proliferaci a transformaci v buňky sekretující extracelulární matrix. Vzniká fibrózní plát (14,35).

Obrázek 11: Progrese aterosklerózy.



http://www.med.muni.cz/patfyz/powerpnt/0607/11_atero.pdf (23.4. 2011)

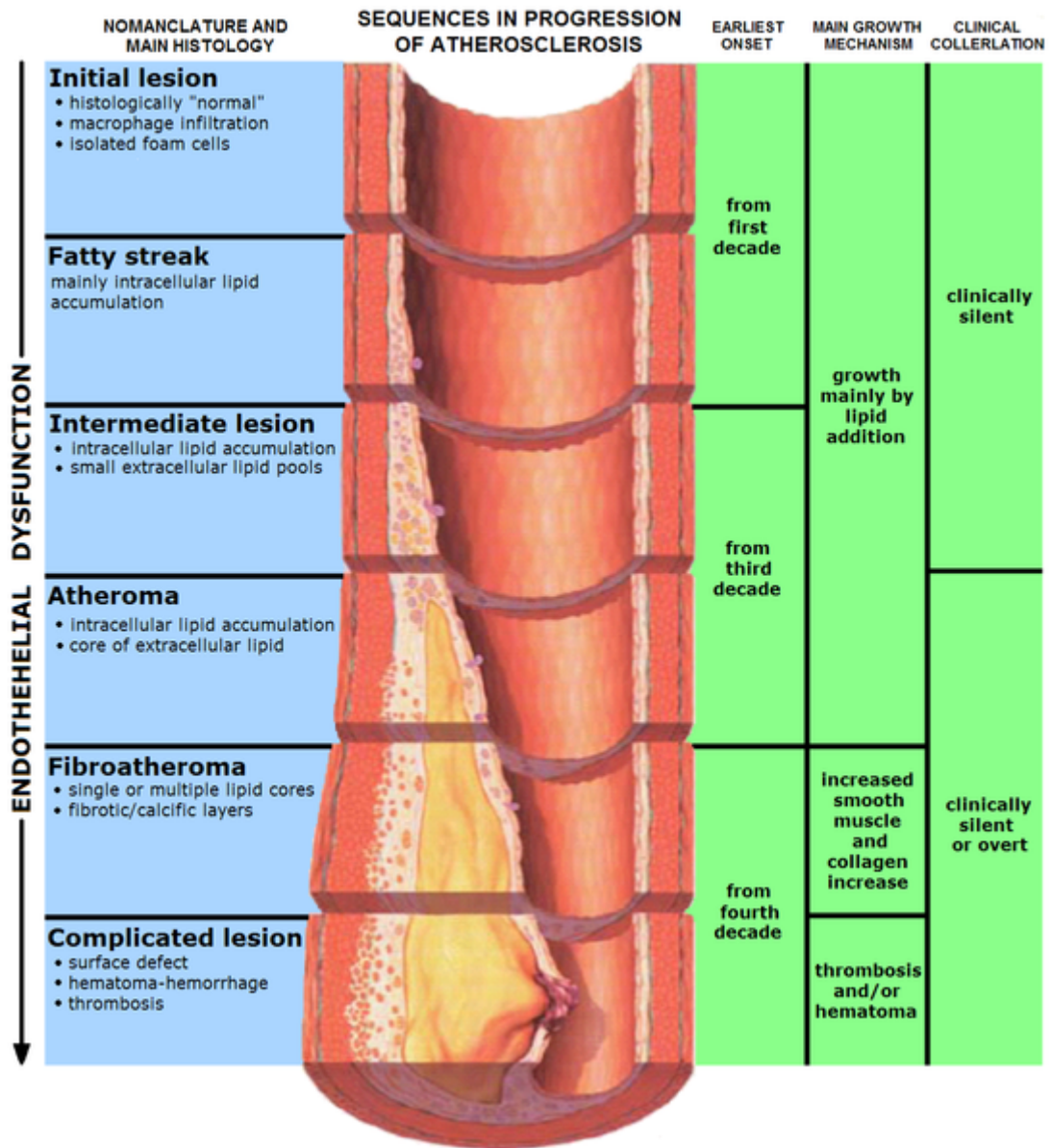
3.4.4. Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát

Vzniklý aterosklerotický plát se skládá z nekrozního jádra bohatého na lipidy a fibrózní vrstvy tvořící čepičku, která odděluje jádro od lumen cévy (38).

Další vývoj pak závisí na charakteru fibrózní vrstvy. Čím je širší a pevnější, tím je stabilnější. Stabilní plát s pevnou fibrózní vrstvou může snižovat průtok postiženou tepnou. Nestabilní plát pokryt slabou narušenou vrstvou je náchylný k rupturám. K nestabilitě plátu pravděpodobně nejvíce přispívají enzymy produkované makrofágy, které degradují kolagen, elastin a proteoglykany zpevňující fibrózní vrstvu (35).

Ruptura plátu vede k obnažení subendotelu a ateromové hmoty a zachycení trombocytů v daném místě, které tvoří tromby. Trombus může lumen artérie zužovat nebo zcela uzavřít (1,12).

Obrázek 12: Vývoj aterosklerózy v čase.



<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Ateroskleróza> (22.4. 2011)

4. MYŠÍ MODELY

Jako zvířecí modely pro studium aterogeneze bylo postupně používáno několik druhů zvířat. Slibně vypadalo především studium na králících, u kterých se sice ateroskleróza sama spontánně nevyvíjí, ale lze ji u nich vytvořit uměle v poměrně krátkém čase (43). Dále se jako modely osvědčili primáti a prasata, u kterých byly vzniklé léze podobnější těm lidským. Limitujícím faktorem pro jejich masivnější používání je cena i manipulace s tak velkými zvířaty. Proto se intenzivně hledal model malého zvířete, který by odstranil výše zmíněné problémy (44).

Myší model byl zpočátku pro studium aterogeneze nevhodný, protože myši jsou přirozeně velice odolné vůči ateroskleróze. Výjimku tvoří kmen C57BL/6, u kterého se léze (ne úplně shodné s lidskými) mohou vyvinout podáváním speciální vysokotučné stravy obsahující kyselinu cholovou. Pro tyto účely se používá tzv. Paigenova dieta obsahující 15 % tuku, 1,25 % cholesterolu a 0,5 % kyseliny cholové (44,45).

Problémem u tohoto modelu je vznik velikostně velmi malých lézí, které se obvykle nevyvinou dále než do fáze vzniku lipidových proužků. Další komplikaci představuje použitá vysokotučná strava, která sama o sobě vyvolá u myši zánětlivou odpověď. Uvedený model proto nenašel širší uplatnění (44,46).

V roce 1992 se podařilo genetickou modifikací získat model myši kmene C57BL/6 s inaktivovaným genem pro apolipoprotein E (Apo E). Představení tohoto modelu představuje zásadní zlom ve výzkumu aterosklerotických procesů (44).

Apo E je glykoprotein syntetizovaný především v játrech, který tvoří součást lipoproteinů, kde zprostředkovává vazbu těchto částic na lipoproteinové receptory. Apo E deficientní myši měly i při nízkotučné dietě výrazně vyšší hladinu celkového cholesterolu než normální myši. Zvýšené byly i koncentrace triglyceridů a VLDL částic. Hladina HDL cholesterolu byla naopak výrazně snížena (44).

Výhodou tohoto modelu oproti předchozímu je zejména fakt, že vzniklé léze u Apo E deficientních myši jsou velice podobné lidským. Léze se začínají tvořit už v 5.-6. týdnu věku, kdy jsou v cévní stěně identifikovatelná místa, kde dochází k adhezi monocytů na endotelovou vrstvu. Lipidové proužky se u myši začínají objevovat v 10. týdnu věku a už v 15. týdnu jsou v lézích k nalezení vcestovalé buňky hladkého svalstva a pěnové buňky. Fibrózní pláty jsou pozorovány po 20. týdnu života a mají typickou stavbu zahrnující nekrotické jádro pokryté fibrózní vrstvou s kolagenem a elastickými

vlány. U starších myší léze mohou dále progredovat, objevují se aneurysmata a kalcifikace. Léze spojené se vznikem trombu ale u těchto myší nalezeny nebyly (46).

Vliv podávané stravy se i u těchto myší ukázal jako zásadní. Byl vyvinut tzv. westernový typ stravy obsahující 0,15 % cholesterolu a 21 % tuku. Složení této stravy přibližně odpovídá složení lidské potravy. Apo E deficientní myši krmené tímto typem stravy měly větší a rychleji vyvinuté léze v porovnání s kontrolní skupinou, krmenou nízkotučnou stravou (46).

Rok po představení Apo E deficientní myši se objevil další myší model. Tentokrát byl inaktivován gen pro LDL receptor. Tento receptor na povrchu buněk je schopen reagovat s apolipoproteinem B na LDL částici a s apolipoproteinem E na IDL částici. Myši s touto deficiencí mají při nízkotučné stravě dvakrát vyšší hladinu cholesterolu než normální myši. Při vysokotučné stravě ovšem hladina cholesterolu stoupá extrémně, následkem čehož se tvoří masivní lipidové proužky, které se dále nevyvíjí ve fibrózní pláty (46).

Pro studium aterosklerotických procesů se také používají myši s dvojitou deficiencí Apo E a LDL receptoru. Bylo zjištěno, že u těchto myší se i při běžné stravě pláty rychle vyvíjí a proto je tento model vhodný ke studiu procesů aterosklerózy i bez použití aterogenní stravy. Používání myší jako modelů pro studium aterosklerózy má několik výhod, mezi které patří nízké pořizovací náklady a jednoduchá péče o ně. Nevýhodou pak je ztížené získávání vzorků vzhledem k velikosti zvířat (44).

5. ENDOGLIN

Endoglin tvoří součást receptorového komplexu pro transformující růstový faktor β (TGF β). TGF β je člen rodiny růstových faktorů tzv. TGF β superfamily, u které bylo zjištěno, že se podílí na proliferaci, diferenciaci a jiných činnostech různých buněk (47,48).

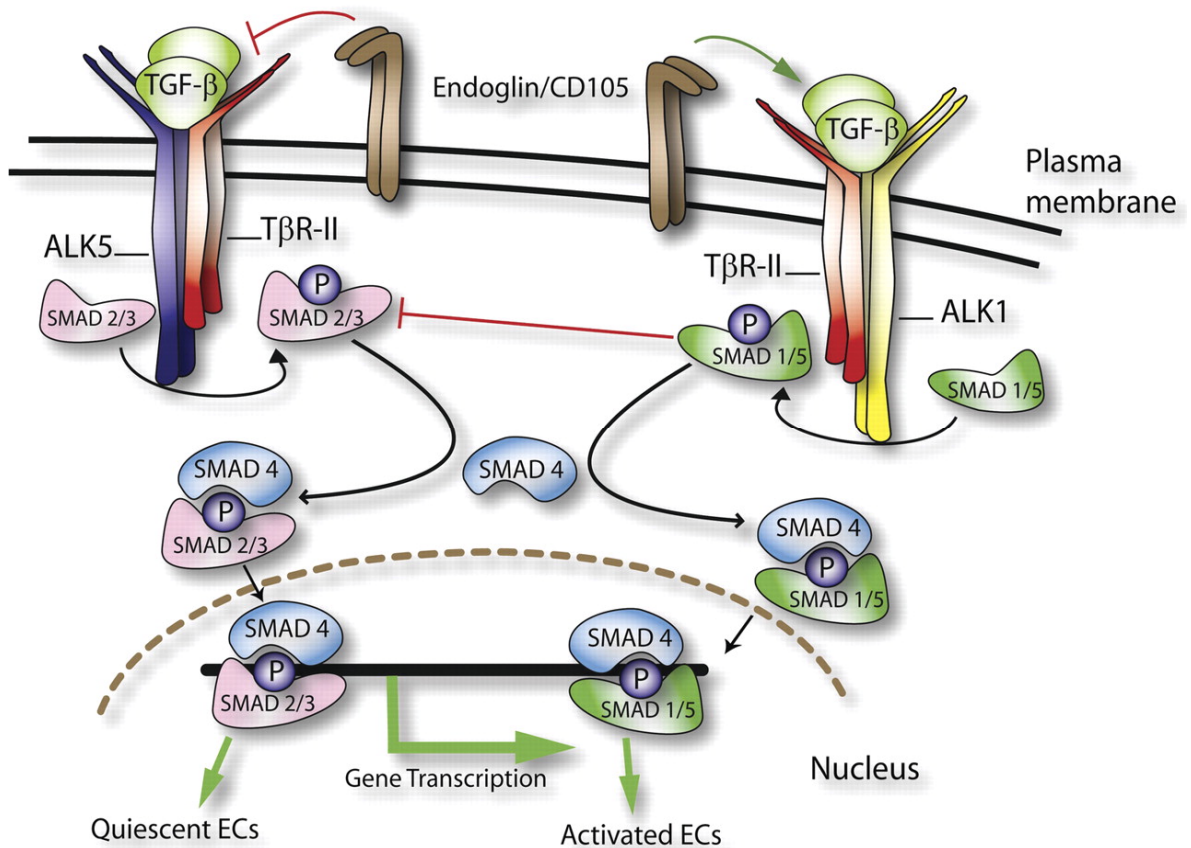
Endoglin je vysoce glykosylovaný transmembránový protein, který se skládá ze tří domén - delší extracelulární, transmembránové a kratší intracelulární. Je homodimerní a jednotlivé monomery jsou spojeny disulfidickými můstky. Endoglin je exprimován ve dvou izoformách - short (S-izoforma) a long (L-izoforma), které se liší v délce intracelulární části (49,50). Účinky obou izoform na organismus se patrně různí. Dále byl kromě těchto dvou forem endoglinu detekován i tzv. rozpustný endoglin, který je spojován s různými patologickými stavy, především pak s nebezpečnou preeklampsií (51).

Endoglin tvoří součástí receptorového komplexu pro TGF β a je schopen interagovat s dalšími členy tohoto komplexu. Jedná se o TGF β receptory typu I a II, což jsou serin/threonin kinázy. TGF β receptory typu I mají dvě důležité izoformy označované jako ALK1 a ALK5, přičemž endoglin interaguje s oběma formami. Dále je endoglin schopen vázat TGF β 1 a TGF β 3, ale pouze ve spojení s receptory (52). Aktivací receptorů ALK1 a ALK5 dochází k aktivaci Smad proteinů a následně jejich přesunu do jádra, kde vyvolají příslušný účinek (48).

Endoglin je exprimován endoteliálními buňkami a to nejvíc ve tkáních, kde probíhá angiogeneze - při hojení cévních poranění nebo v nádorech (53,54). Kromě endotelu byla exprese endoglinu popsána i u jiných buněk, např. v buňkách hladké svaloviny v cévách postižených aterosklerotickými plaky (55) a ve fibroblastech (56).

Ze studií vyplynulo, že endoglin je nezbytný pro řadu fyziologických pochodů. Endoglin deficientní myši umíraly už během embryonálního vývoje v důsledku nesprávné angiogeneze (57). Mutace lidského genu pro endoglin je příčinou hereditární hemoragické teleangiektázie typu 1. Toto autozomálně dominantní onemocnění je charakterizováno cévními malformacemi a projevuje se už v raném věku častým krvácením (58,59).

Obrázek 13: Schéma představující vliv endoglinu na signální kaskády TGF β /ALK1 a TGF β /ALK5 v endoteliálních buňkách.



<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/early/2009/10/30/cvr.cvp332/F1.expansion> (19.4.2011)

Ovlivňováním signálních kaskád aktivovaných receptory ALK1 a ALK5 se endoglin podílí na řízení buněčného růstu a diferenciace (61). Jeho zvýšené hladiny v aterosklerotických plátech ve srovnání se zdravými cévami poukazují na možnost negativního ovlivnění aterosklerózy (55). Bylo však také zjištěno, že endoglin má pozitivní vliv na expresi a aktivaci endoteliální NO syntázy, významného vazodilatačního faktoru (62). Přesné mechanismy působení endoglinu na aterosklerózu tak budou muset být teprve osvětleny.

Kromě zkoumání vlivu endoglinu na vývoj kardiovaskulárních onemocnění, se výzkum zabývá i vlivem endoglinu v jiných procesech. Kromě již zmíněné preeklampsie se studie zaměřují na roli endoglinu v onkologii díky svému vlivu na angiogenezi (51).

6. STATINY

6.1. *Farmakologie statinů*

Cholesterol má podstatnou úlohu pro fyziologické fungování organismu. Je důležitou složkou buněčných membrán a také substrátem pro syntézu steroidních látek. Zvýšená hladina cholesterolu ovšem značně podporuje vznik a vývoj aterosklerózy (34).

Statiny jsou léčiva kompetitivně inhibující 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázu, což je klíčový enzym v syntéze cholesterolu, který katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát. Nejstarší statiny (mevastatin, lovastatin) jsou produkty plísně *Penicillium citrinum*, novější se vyrábí semisynteticky (simvastatin) a nejnovější léčiva (fluvastatin, atorvastatin) jsou zcela syntetická. Simvastatin a lovastatin jsou proléčiva, ostatní statiny se podávají v již účinné formě (63,64).

Pro účinek je nezbytná podobnost části molekuly s mevalonátem. Snížení syntézy cholesterolu následně vyvolá zvýšenou expresi genů pro LDL receptory jaterních buněk a LDL částice jsou pak více vychytávány z krve. Kromě podstatného snížení hladiny LDL cholesterolu v krvi (v závislosti na dávce o 25-60 %) lze od terapie očekávat i snížení hladiny triglyceridů (o 10-30 %) a mírné zvýšení koncentrace HDL cholesterolu (o 5-10 %) (1,63).

V současnosti jsou u nás registrována následující léčiva: simvastatin, lovastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin a rosuvastatin. Statiny jsou indikovány u pacientů s izolovanou hypercholesterolémií. Lze je užít i k terapii smíšených hyperlipoproteinémií, pokud hodnota triglyceridů v krvi nepřesahuje 4,0 mmol/l. Pokud je koncentrace triglyceridů vyšší, je vhodné statin zkombinovat s jiným hypolipidemikem. Kombinace statinů s dalšími léčivy jsou poměrně časté nejen u kombinovaných hyperlipoproteinémií, ale i u izolované hypercholesterolémie vzhledem k výsledkům mnoha studií, které v rámci sekundární prevence aterosklerózy doporučují razantní snížení koncentrace LDL cholesterolu. Vhodným léčivem pro kombinační terapii je pro tento účel ezetimib. Ten podle nedávno provedených metaanalýz snižuje v kombinaci se statinem LDL cholesterol významně více než samotný statin (2,65).

Statiny mají mnoho důkazů z velkých intervenčních studií, které potvrzují jejich přínos při léčbě a prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Kromě vlivu na hladiny

krevních lipidů, vykazují statiny ještě další příznivé účinky na vývoj aterosklerózy. Předpokládají se pozitivní účinky na stabilizaci plátu, zlepšení endotelové funkce, dále efekt protizánětlivý, antioxidační a antitrombotický. Některé mechanismy těchto účinků už byly popsány, otázkou zůstává, jak velkou měrou se extralipidové účinky podílí na celkovém antiaterosklerotickém efektu statinů (66,67).

Statiny jsou velmi dobře snášená léčiva, spíše vzácně se můžou objevit bolesti hlavy, gastrointestinální obtíže a přechodné zvýšení hladin jaterních aminotransferáz. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem, který byl popsán v souvislosti s užíváním statinů je myopatie, která se může vyvinout až v rabdomyolýzu (68). Rabdomyolýza je stav, při kterém dochází k poškození sarkolemy buněk kosterního svalstva, následkem čehož dochází k uvolnění obsahu svalových buněk do cirkulace. Tento stav může vést až k akutnímu renálnímu selhání. Nejvíce případů rabdomyolýzy bylo popsáno u pacientů užívajících cerivastatin, který byl následně stažen z trhu. Zvýšené riziko vzniku tohoto potenciálně smrtelného nežádoucího účinku hrozí zejména při kombinaci léčby statinů s gemfibrozilem (69,70).

Nežádoucí účinky statinů jsou závislé na dávce léčiva, proto jsou významné interakce s léčivými, které potenciálně mohou zvýšit hladinu statinů v plazmě. Protože statiny prochází metabolismem na cytochromu P450, je nutné zvážit případné lékové kombinace (71).

Metabolismem přes izoenzym 3A4 prochází lovastatin, simvastatin, atorvastatin a cerivastatin. Fluvastatin je metabolizován izoenzymem 2C9. Novější rosuvastatin vykazuje jen minimální metabolismus a pravastatin se pomocí tohoto enzymu nemetabolizuje vůbec (72,73). Klinicky významné jsou především kombinace statinů podléhajících metabolismu cytochromem P450 s inhibitory příslušných izoenzymů. Potenciální léčiva, která mohou ovlivnit plazmatické koncentrace statinů jsou uvedeny v tabulce 2 (71).

Absolutně kontraindikovány jsou statiny u těhotných a kojících žen a u pacientů s těžkým postižením jater. Relativní kontraindikaci představuje věk do 18 let a u žen fertilní věk bez účinné antikoncepce (74).

Tabulka 2: Léky potenciálně ovlivňující plazmatické koncentrace statinů (75).

Cytochrom P450	Účinek	Léky s možnou interakcí
Inhibice 3A4	↑ plazmatická koncentrace statinů	cyklofosamid, ciclosporin, diazepam, erythromycin, clarithromycin, felodipin, flukonazol, ketokonazol, kodein, lidokain, nifedipin, nitrendipin, sildenafil, terfenadin, verapamil, grapefruitová šťáva
Indukce 3A4	↓ plazmatická koncentrace statinů	barbituráty, karbamazepin, griseofulvin, fenytoin, primidon, rifampicin
Inhibice 2C9	↑ plazmatická koncentrace fluvastatinu	amiodaron, cimetidin, trimethoprim + sulfamethoxazol, fluoxetin, isoniazid, ketokonazol, metronidazol, sulfinpyrazon, tiklopidin
Indukce 2C9	↓ plazmatická koncentrace fluvastatinu	barbituráty, karbamazepin, fenytoin, primidon, rifampicin

6.2. Úloha statinů v prevenci ischemické choroby srdeční

Statiny jsou hypolipidemika s výsadním postavením, které jim daly výsledky mnoha významných studií např. 4S, REVERSAL, ASCOT-LLA, PROVE IT, ASTEROID nebo JUPITER. Z výsledků těchto velkých studií vyplývá pozitivní efekt statinů na vývoj aterosklerózy a snížení celkové i kardiovaskulární mortality. Výsledky tedy jednoznačně podporují užití v sekundární prevenci ICHS (již klinicky vyjádřené) i v rámci primárně preventivní péče (2).

6.3. Další možné terapeutické využití statinů

Extralipidové účinky statinů nejsou zkoumány pouze kvůli svému vlivu na vývoj aterosklerózy. Pozornost je věnována také jejich účinku na kostní metabolismus a osteoporózu. V experimentálních studiích bylo zjištěno, že statiny inhibují funkci osteoklastů a také podporují expresi BMP-2 (kostní morfogenetický protein-2), což je růstový faktor podporující novotvorbu kostní tkáně (76,77). Klinický význam těchto účinků ještě není objasněn.

Dalšími oblastmi, kde probíhá výzkum možného zapojení statinů do terapie, je léčba demencí a autoimunitních chorob, jako je roztroušená skleróza. I zde se teprve očekávají rozsáhlejší klinické studie, které potvrdí nebo vyvrátí benefit statinů v těchto indikacích (78,79).

6.4. Atorvastatin

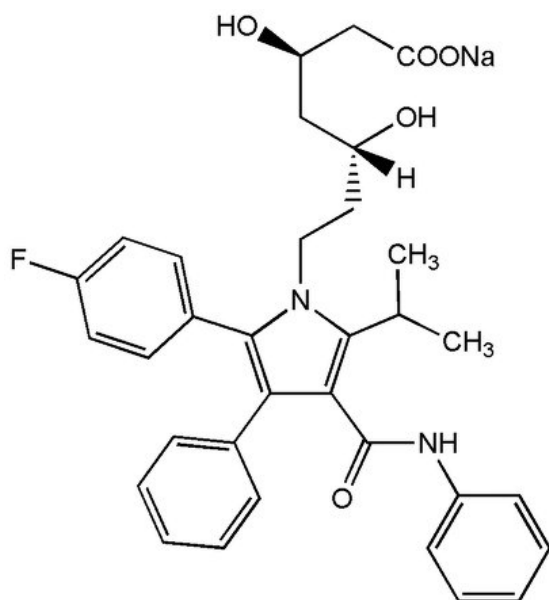
Atorvastatin je syntetický inhibitor HMG-CoA reductázy. Jeho užívání je spojeno s poklesem plazmatických koncentrací LDL cholesterolu, VLDL cholesterolu, triglyceridů a apolipoproteinu B. Studiemi byl prokázán pozitivní efekt snížení kardiovaskulárního rizika, ve výše zmíněné studii REVERSAL bylo dokázáno, že osmnáctiměsíční léčba atorvastatinem v dávce 80 mg denně (maximální denní dávka) vedla dokonce ke snížení objemu aterosklerotického plátu, patrnému na ultrazvuku (80,81).

Kromě hypolipidemického účinku jsou intenzivně studovány i jeho účinky extralipidové, které (jak bylo naznačeno už výše) se mohou podílet na celkovém příznivém účinku atorvastatinu. Jedná se především o zlepšení endotelové funkce a dále

o vliv na proliferaci buněk hladké svaloviny, adhezi leukocytů, depozici trombocytů, koagulaci a zánět (80).

K dispozici je atorvastatin samotný nebo v kombinaci. Podobně jako většina statinů je dobře snášen.

Obrázek 14: Atorvastatin.



<http://sitemaker.umich.edu/top.200/atorvastatin> (27.4. 2011)

7. CÍL PRÁCE (ZADÁNÍ)

Cílem této diplomové práce bylo popsat expresi endoglinu u Apo E/LDL receptor deficientních myší po podávání atorvastatinu. K tomu byly použity imunohistochemické metody.

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1. Zvířata

Pro pokus bylo použito 16 samic Apo E/LDL receptor deficientních myší kmene C57BL/6J. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin po osmi zvířatech. První kontrolní (cholesterolová) skupina byla 8 týdnů krmena standardní dietou s obsahem 1% cholesterolu. Po stejnou dobu byla stejnou stravou krmena i zvířata druhé (atorvastatinové) skupiny. Zvířata druhé skupiny dostávala v potravě navíc atorvastatin v dávce 50 mg na 1 kilo živé váhy denně.

Každé zvíře bylo chováno v samostatné kleci a dostávalo denně 4 g stravy (ve speciálně upravených granulích). Všechna zvířata měla neomezený přístup k vodě. Během pokusu nebyly zaznamenány žádné rozdíly ve spotřebě stravy mezi jednotlivými zvířaty.

Na konci pokusu byla zvířata přes noc vyhladověna a usmrcena éterem. Byly vyjmuty tkáňové vzorky obsahující aortu společně s horní částí srdce k následné analýze. Vzorky byly umístěny do vhodného media (Leica, Praha, Česká republika) a následně zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny při teplotě -80 stupňů Celsia. Dále byly odebrány vzorky krve pro biochemické vyšetření.

8.2. Biochemická analýza

Nejdříve byly získány jednotlivé frakce sérových lipoproteinů využitím analytické ultracentrifugace (Beckman TL 100, Palo Alto, CA, USA).

Koncentrace lipoproteinových frakcí byly zjištěny enzymaticky podle konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a pomocí spektrofotometrické analýzy (cholesterol při vlnové délce 510 nm, triglyceridy při vlnové délce 540 nm, ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Švédsko).

8.3. Histologické barvení olejovou červení

Pro detekci lipidů v aterosklerotických lézích byly použity zmrazené části vzorků. Řezy byly sušeny na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 30 minut, poté byly 30

minut vystaveny působení olejové červeně a následně barveny Gilloovým hematoxylinem.

8.4. Imunohistochemie

Pro imunohistochemickou analýzu byly nakrájeny řezy obsahující semilunární chlopně s aortou. Následně byly pořízeny příčné řezy tlusté 7 μm a umístěny na podložní sklíčko potažené vrstvou želatiny.

Pro detekci exprese endoglinu byla použita metodika avidin-biotin (ABC) s detekčním činidlem diaminobenzidinem (DAB), který v případě positivity poskytuje hnědou barevnou reakci.

Protilátky

Pro detekci endoglinu byla použita primární monoklonální protilátka rat anti-mouse Endoglin (BD Pharmingen) ve zředění 1:50. Jako sekundární protilátka byla použita monoklonální protilátka goat anti-rat Ig (Vector laboratoires, USA) ve zředění 1:400.

Postup

Podložní sklíčka s tkáňovými řezy byla na 15 minut umístěna do roztoku acetonu uchovávaného při teplotě -20 stupňů Celsia. Po krátkém oschnutí (15 minut) byl postup zopakován, čímž došlo k lepšímu přilnutí vzorku na sklíčko.

Poté byly řezy opět krátce osušeny (15 minut), následně vloženy do roztoku PBS (2x5 minut) a připraveny pro analýzu.

Nejprve byl nanesen 10 % roztok goat séra v PBS (30 minut) za účelem blokace nescifických vazebných míst. Následně se řezy inkubovaly s roztoky anti-avidinu a anti-biotinu (Vector Laboratoires, USA).

Poté byla provedena inkubace (1 hodina) s primární protilátkou při pokojové teplotě. Následoval oplach v roztoku PBS (2x5 minut) a patnáctiminutová inkubace v 3% roztoku H_2O_2 . Po dalším oplachu PBS (2x5 minut) byla nanesena sekundární protilátka (30 minut). Poté se řezy opět vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dalším krokem bylo nanesení enzymu peroxidázy konjugovaného s avidin-biotin komplexem. Následovalo přidání detekčního činidla DAB (Dako, Dánsko).

V další fázi experimentu byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xylenu (10:1, 3 minuty), aceton-xylenu (1:10, 3 minuty) a v xylenu (3x2 minuty). Závěrem byly řezy ukotveny pomocí Eukittu.

Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu byla provedena za použití digitální kamery Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Ottawa, Kanada) pomocí softwaru NIS (Laboratory Imaging, Česká republika).

8.5. *Statistická analýza*

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u skupin zvířat byl použit nepárový T test. Rozdíly byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA).

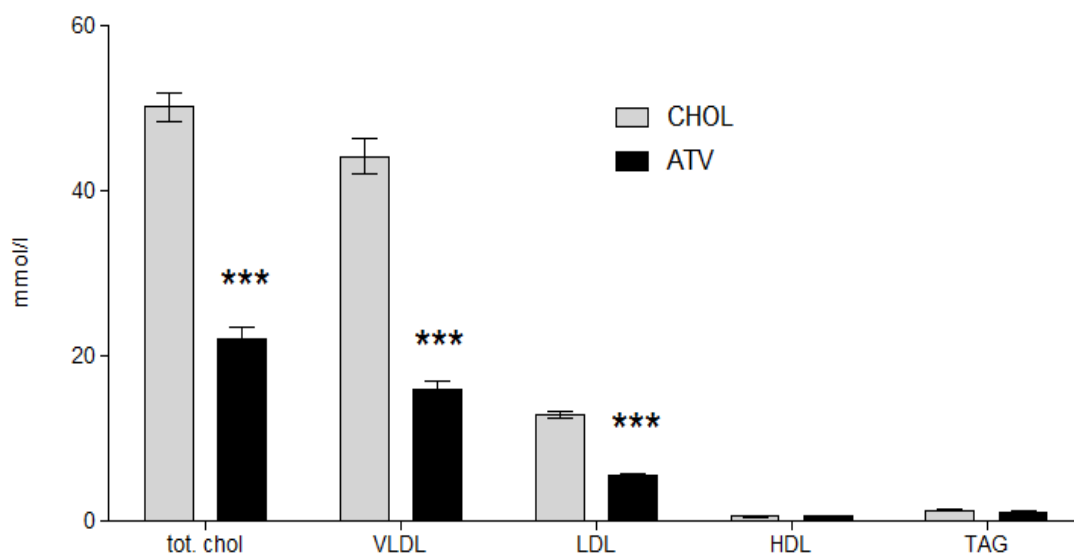
9. VÝSLEDKY

9.1. Biochemická analýza

Biochemická analýza krevních vzorků prokázala významné snížení hladiny celkového cholesterolu (50 ± 1.7 vs. 22 ± 1.4 mmol/l, $p < 0.001$), VLDL cholesterolu (44 ± 2.1 vs. 16 ± 1.0 mmol/l, $p < 0.001$) a LDL cholesterolu (12 ± 0.5 vs. 5.5 ± 0.3 mmol/l, $p < 0.001$) atorvastatinové skupiny v porovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu hladiny HDL cholesterolu (0.5 ± 0.01 vs. 0.6 ± 0.03 mmol/l) a triglyceridů (1.3 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1) nebyly významně ovlivněny atorvastatinovou léčbou (Graf 1).

Graf 1: Hladiny krevních lipidů u atorvastatinové (ATV) a kontrolní (CHOL) skupiny.

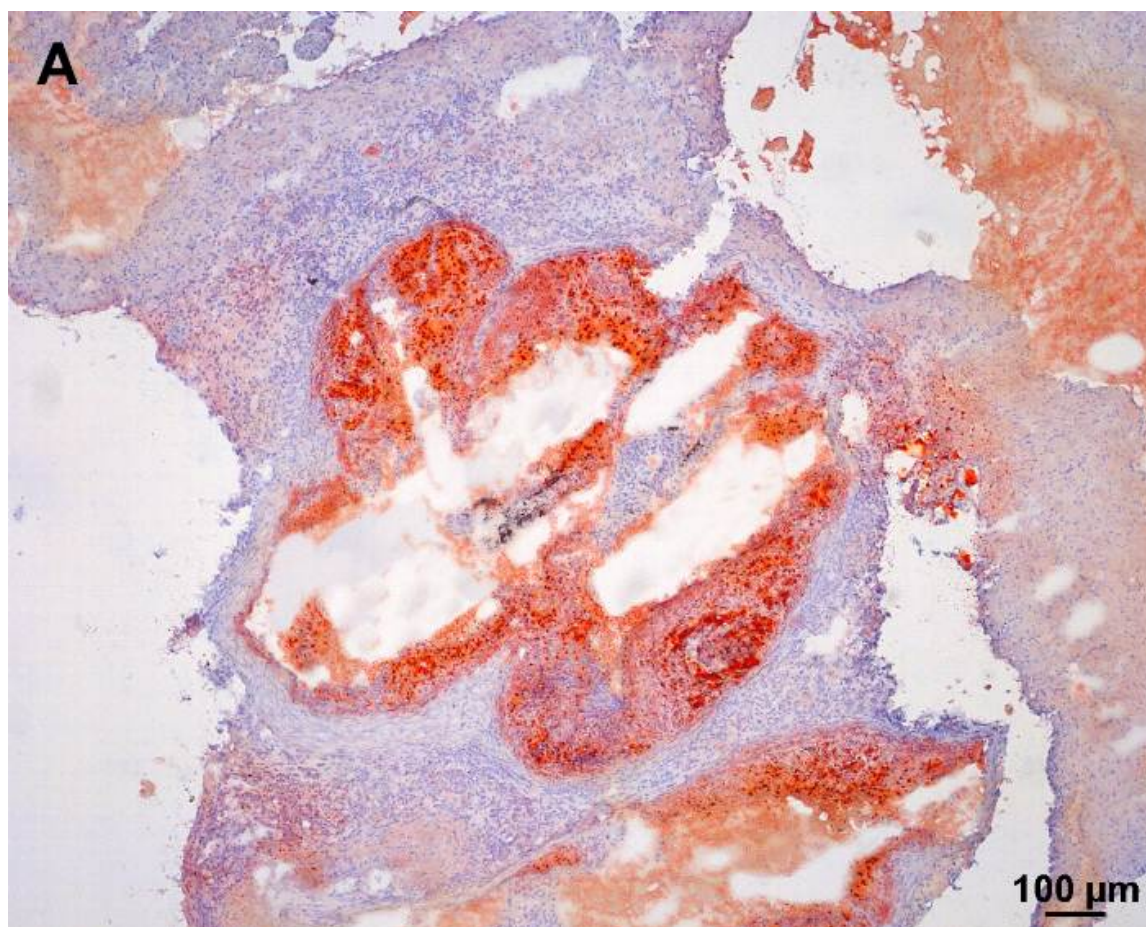
*Atorvastatinová léčba významně snížila hladiny celkového, VLDL a LDL cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou. Hladiny HDL cholesterolu a triglyceridů (TAG) nebyly významně ovlivněny. (***) $p < 0.001$*



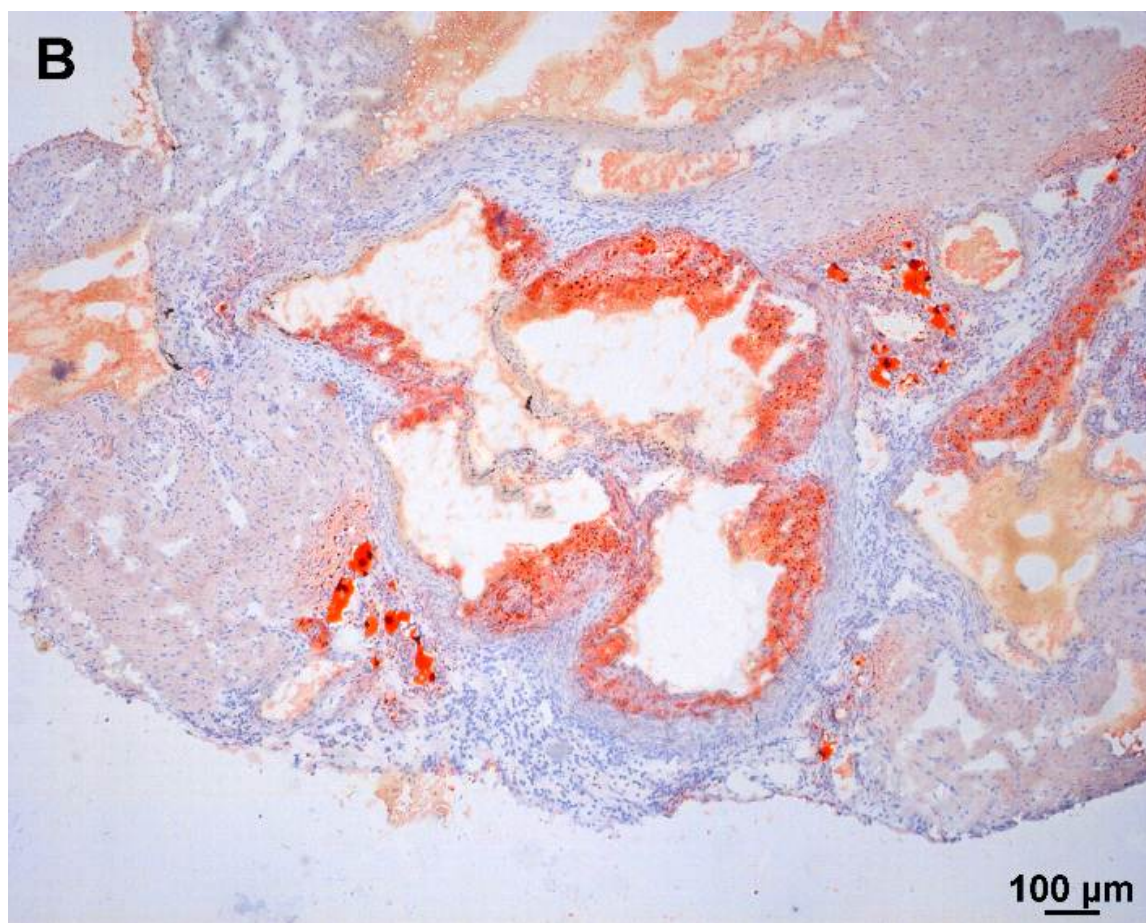
9.2. Histologické barvení olejovou červení

Tato metoda byla použita pro porovnání velikosti aterosklerotických plátů. Olejová červeně detekuje přítomnost tuků v histologických řezech, a proto byla použita pro stanovení jejich akumulace v aortě. Pro hodnocení barvení bylo použito 5 sklíček z každého zvířete, dohromady tedy bylo hodnoceno 40 sklíček pro každou skupinu. Pozorováním v mikroskopu jsme zjistili zmenšení plochy aterosklerotických lézí u myši z atorvastatinové skupiny v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 15, 16).

Obrázek 15: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u kontrolní (cholesterolové) skupiny zvířat.



Obrázek 16: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u atorvastatinové skupiny zvířat.

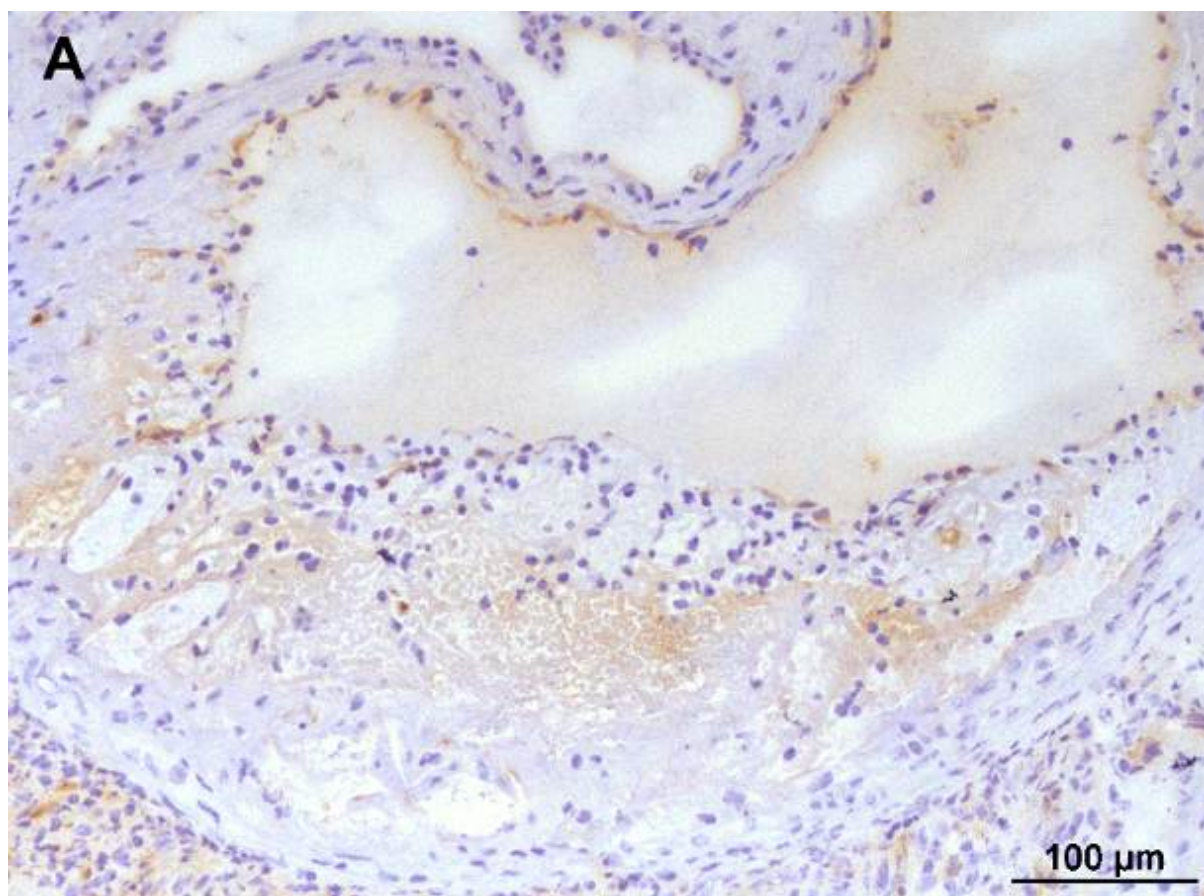


V porovnání s kontrolní skupinou je u atorvastatinové skupiny zvířat patrné zmenšení plochy barvených lézí.

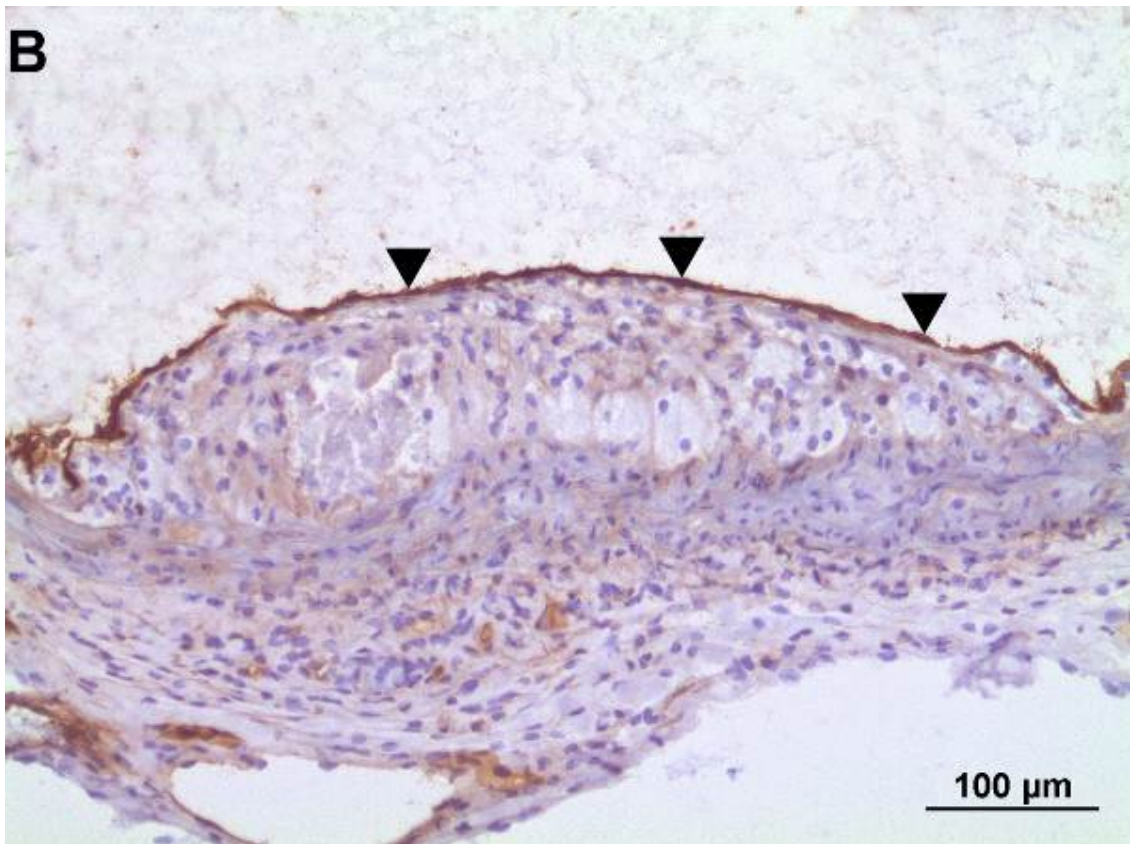
9.3. *Imunohistochemie*

Expres endoglinu byla viditelná především na endotelu aterosklerotické léze, endotelu aortálních chlopní a dále v oblastech mimo léze a v kapilárách myokardu. Expres endoglinu byla pozorovatelná u obou skupin myší. Pro hodnocení barvení bylo použito 5 sklíček z každého zvířete, dohromady bylo hodnoceno 40 sklíček pro každou skupinu. Prohlížením preparátů v mikroskopu jsme zjistili, že expres endoglinu je po podávání statinů výrazně silnější zejména na povrchu aterosklerotických plátů ve srovnání s neléčenou skupinou (obr. 17, 18).

Obrázek 17: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení endoglinu u kontrolní (cholesterolové) skupiny zvířat.



Obrázek 18: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení u atorvastatinové skupiny zvířat.



V endotelu aterosklerotického plátu u atorvastatinové skupiny byla exprese endoglinu dobře pozorovatelná a silnější než v jiných místech v porovnání s kontrolní skupinou. Preparáty byly dobarveny hematoxylinem.

10. DISKUSE

Ateroskleróza je dnes považována za chronické zánětlivé onemocnění cév, v jejíž patogenezi hraje velmi důležitou roli mimo jiné také cholesterol.

K tomuto faktu se dospělo během několika posledních let, kdy se postupně upravovala teorie o aterogenezi. První představa nastíněná teorií Rokitanského se zakládala na tzv. inkrustační teorii, kde ateroskleróza vznikala díky ukládání fibrinu do cévní stěny. Později následovaly další teorie založené na pasivním ukládání cholesterolu ve tkáních a také na teorii zvané „response to injury“, kde se předpokládalo, že aterogenní proces začíná porušením integrity cévního endotelu (83). Teprve později bylo definováno, že cholesterol a zánětlivá reakce jsou základem pro rozvoj aterogenního procesu (84).

Transformující růstový faktor β (TGF β) je multifunkční cytokin, člen rodiny strukturálně podobných polypeptidů označované jako tzv. transforming growth factor superfamily, který se podílí na řadě regulačních činností souvisejících s proliferací, diferenciací, migrací a přežíváním různých buněk v lidském těle (85). TGF β působí přes různé typy receptorů ke kterým patří TGF β receptor I, TGF β receptor II a TGF β receptor III neboli endoglin. Endoglin tvoří součást receptorového komplexu pro TGF β a hraje roli v některých procesech s ním spojených. Exprese endoglinu byla prokázána v lidských (87,93), prasečích (88) a myších (86) aterosklerotických lézích.

Zvýšené sérové hladiny endoglinu objevené u preeklampsie (89), aterosklerózy (90), diabetu a hypertenze (91) naznačují, že endoglin hraje roli v patofyziologii kardiovaskulárních onemocněních.

Statiny jsou látky, které kompetitivně inhibují 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reductázu, klíčový enzym syntézy cholesterolu. Důležitým zástupcem této skupiny léčiv je atorvastatin (63). Jeho užívání je spojeno s významným poklesem sérových hladin LDL a VLDL cholesterolu, triglyceridů a apolipoproteinu B. Kromě tohoto hypolipidemického vlivu je věnována pozornost také jeho extralipidovým účinkům, které se snad podílí na antiaterogenním efektu léčiva (80).

V této diplomové práci jsme se zaměřili na změny exprese endoglinu po podávání atorvastatinu u spontánně hypercholesterolemických myší. Tato práce byla součástí popisu celé kaskády, kterou endoglin může ovlivňovat a navazovala na předcházející studie (86).

Během pokusu u Apo E/LDL receptor deficientních myší bylo zjištěno, že u myší, které dostávaly ke stravě navíc atorvastatin, došlo k významnému hypolipidemickému účinku. Dále u nich bylo pozorováno zmenšení plochy aterosklerotických lézí. Imunohistochemická analýza odhalila signifikantní zvýšení exprese endoglinu v cévní stěně. Exprese endoglinu byla zjištěna výlučně v endotelu a to u myší atorvastatinové i kontrolní skupiny. Výsledky analýzy korespondují s výsledky podobných předchozích experimentálních studií, kdy zvýšená exprese endoglinu byla popsána právě v myších endoteliálních buňkách (86,92). U lidí byl endoglin zjištěn v endotelu, buňkách hladké svaloviny nebo v makrofázích (87,55,93).

Zvýšení exprese endoglinu po podávání statinů je efekt, který je zajímavý zejména vzhledem k účinkům endoglinu. Endoglin mimo jiné zvyšuje expresi endoteliální NO syntázy, což je protektivní enzym, který hraje důležitou roli v ochraně cévního endotelu a také v protekci z hlediska aterogeneze (94). Takto je možné konstatovat, že by atorvastatin mohl přes zvyšování exprese endoglinu zvyšovat také expresi endoteliální NO syntázy a tím i NO. Tento veskrze pozitivní efekt by mohl částečně přispět k protektivním účinkům v aterogenezi. Kromě toho bylo také prokázáno, že endoglin zvyšuje expresi a aktivitu dalších členů, kteří patří k jeho signalizační kaskádě jako je Smad2 protein (95). Některé studie prokázaly protizánětlivé účinky Smad2 proteinu díky inhibici nukleárního faktoru-kappa B (NF- κ B) a také jeho podíl na stabilizaci aterosklerotických plátů (93,96).

Všechny tyto výsledky tedy poukazují na fakt, že zvyšování exprese endoglinu by mohlo hrát protektivní roli v aterogenezi s ohledem na zlepšení funkce endotelu, protizánětlivé účinky a stabilizaci aterosklerotických plátů. Je ovšem nutno také konstatovat, že tato tvrzení budou předmětem další studií na katedře biologických a lékařských věd.

11. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zaměřila na sledování vlivu podávání atorvastatinu na expresi endoglinu v aterosklerotických plátech u hypercholesterolemických Apo E/LDL receptor deficientních myší.

Podávání atorvastatinu v dávce 50mg/kg/den pro každé zvíře vedlo k signifikantnímu poklesu hladin celkového, LDL a VLDL cholesterolu.

Dále došlo také k poklesu velikosti aterosklerotických plátů.

Imunohistochemická analýza prokázala expresi endoglinu na cévním endotelu aorty i v kapilárách okolního myokardu u obou skupin zvířat.

Podávání atorvastatinu dále vedlo ke zvýšení exprese endoglinu v porovnání s kontrolní skupinou.

Závěrem lze vzhledem k popsaným efektům endoglinu na endoteliální dysfunkci, zánět a stabilitu plátu konstatovat, že zvýšení exprese endoglinu by mohlo mít protektivní vliv na aterosklerotický proces, což by mohlo přispívat k pozitivnímu vlivu statinů na aterogenezi.

12. SEZNAM ZKRATEK

4S	The Scandinavian Simvastatin Survival Study
ABC	Avidin-Biotin metodika
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ALK 1	activin receptor-like kinase 1
ALK 5	activin receptor-like kinase 2
Apo E	apolipoprotein E
ASCOTT-LLA	Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial – Lipid Lowering Arm
ASTEROID	A Study To evaluate the Effect of Rosuvastatin On Intravascular ultrasound-Derived coronary atheroma burden
AT1	angiotenzinové receptory typu 1
BMI	body mass index
BMP-2	kostní morfogenetický faktor 2 (bone morphogenetic protein-2)
DAB	diaminobenzidin
DM	diabetes mellitus
EC	endoteliální buňky (endothelial cells)
FGF	růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor)
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
IDL	lipoproteiny o střední hustotě (intermediate density lipoproteins)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1	interleukin 1
JUPITER	Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin
KV	kardiovaskulární
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
NF- κ B	nukleární faktor-kappa B
NO	oxid dusnatý
PBS	fosfátový pufr
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
PROVE-IT	Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection therapy

REVERSAL	Reversing Atherosclerosis with Lipid Lowering
RF	rizikový faktor
SMAD	protein regulující funkci TGF- β , fungující jako transkripční faktor
TG	triglycerid
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TK	krevní tlak
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins)

13. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. J. Vlček, D. Fialová a kol. *Klinická farmacie I*. 1. vydání. Grada Publishing a.s. 2010. 368 s. ISBN: 978-80-247-3169-8.
2. J. Marek a kol. *Farmakoterapie vnitřních nemocí 4., zcela přepracované a doplněné vydání*. 4. vydání. Grada Publishing a.s. 2010. 777 s. ISBN: 978-80-247-2639-7.
3. J. Hradec, S. Býma. *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Prevence kardiovaskulárních onemocnění*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP. 2009. ISBN: 978-80-86998-32-9.
4. J. Hradec, S. Býma. *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Ischemická choroba srdeční*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2009. ISBN: 978-80-86998-36-7.
5. L. C. Junqueira, J. Carneiro, R. O. Kelley. *Základy histologie*. 1. vydání (překlad 7. vydání). nakladatelství H+H 1997. [s. 204-218]. ISBN: 80-85787-37-7.
6. V. Konrádová, J. Uhlík, L. Vajner. *Funkční histologie*. 2. vydání. nakladatelství H+H 2000. [s. 115-126]. ISBN: 80-86022-80-3.
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2216> (20.4. 2011)
8. L. C. Junqueira, J. Carneiro. *Basic Histology: Text and Atlas, by Junqueira*, 11th Edition, McGraw-Hill Medical Publishing 2005. 544 s. ISBN: 9780071440912.
9. <http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/capillaries/> (20.4 2011)
10. <http://anteportaminferam.blog.cz/rubrika/matuni-otazky-do-osetrovatelstvi> (21.4.2011)
11. <http://www.siumed.edu/~dking2/crr/CR025b.htm> (20.4. 2011)
12. M. Štejfa a kol. *Kardiologie 3., zcela přepracované a doplněné vydání*. 3. vydání. Grada Publishing a.s. 2007. [s. 471-475], ISBN: 978-80-247-1385-4.
13. J. Mačák, J. Mačáková. *Patologie*. 1. Vydání. Grada Publishing a.s. 2004. [s. 171- 172] ISBN: 80-247-0785-3.
14. S. Silbernagl, F. Lang. *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vydání. Grada Publishing a.s. 2001. [s. 236-239] ISBN: 80-7169-968-3.
15. <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1480/figures.htm> (21.4. 2011)

16. S. J. George, J. Johnson. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. 1st Edition. Wiley-VCH 2010. [s. 5] ISBN: 978-3527324484.
17. <http://www.athero.cz/odkazy-a-zdroje-informaci/vypocet-rizika/tabulka-kardiovaskularniho-rizika.html> (21.4. 2011)
18. H. Vaverková a kol. Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti, vypracované výborem České společnosti pro aterosklerózu. *Vnitřní lékařství* 2007;53(2):181-197.
19. I. Karen, J. Widimský. *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Doporučení diagnostických a léčebných postupů u arteriální hypertenze*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2008. ISBN: 80-86998-20-7.
20. S.M Grundy, J.I. Cleeman, C.N. Bairey a kol. Implication of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation* 2004;110:227–39.
21. V. Bláha, R. Češka, O. Herber. *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Dyslipidémie*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2009. ISBN: 978-80-86998-34-3.
22. W.Y. Craig, G.E. Palomaki, J.E. Haddow. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ* 1989;298(6676):784-8.
23. J. Čupka a kol. *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Léčba závislosti na tabáku v ordinaci praktického lékaře*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2005. ISBN: 80-903573-7-7.
24. J. Martínková a kol. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů* 1. vydání. Grada Publishing a.s. 2007 [s. 204]. ISBN: 978-80-247-1356-4.
25. <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/kombinacni-lecba-hypertenze-v-roce-2009-447152> (21.4. 2011)
26. M. Kalousová a kol. *Patobiochemie ve schématech*. 1. vydání. Grada Publishing a.s. 2006. 264 s. ISBN: 80-2471-522-8.
27. I. Karen a kol. *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Diabetes mellitus*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2009. ISBN: 978-80-86998-30-5.
28. P. Hlúbik a kol. *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Obezita*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2009. ISBN: 978-80-86998-31-2.
29. P. Poirier, T.D. Giles, G.A. Bray, Y. Hong, J.S. Stern, F.X. Pi-Sunyer, R.H. Eckel. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and

- effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006;113:898–918.
30. <http://www.vychovakezdravi.cz/clanky/vyziva/edukacni-materialy.html> (21.4.2011)
31. B. Wajchenberg. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697–738.
32. Taylor R a kol. Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 2004;116:682–692.
33. D.S. Celermajer. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997;30: p. 325–333.
34. S. Trojan a kol. *Lékařská fyziologie*. 4. vydání. Grada Publishing a.s. 2004. 772 s. ISBN: 80-247-0512-5.
35. J. Vojáček, M. Malý a kol. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vydání. Grada Publishing a.s. 2004. [s. 33-43]. ISBN: 80-247-0501-X.
36. A. P. Selwyn a kol. Atherogenic Lipids, Vascular Dysfunction, and Clinical Signs of Ischemic Heart Disease. *Circulation* 1997;95:5-7.
37. J. Racek a kol. *Klinická biochemie*. 1. vydání. Galén 1999. [s. 163-168]. ISBN: 80-7262-023-1.
38. R. Rubin, D.S. Strayer et al. *Essentials of Rubin's Pathology*. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins 2008. [s. 73-114]. ISBN: 978-07817-9516-6.
39. ftplf2.agarek.com/fyziologia/interna/atero+ichs.ppt (23.4. 2011)
40. G.K. Hansson, P. Libby, U. Schonbeck, Z.Q. Yan. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91:281–291.
41. http://www.med.muni.cz/patfyz/powerpnt/0607/11_atero.pdf (23.4. 2011)
42. <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Ateroskleróza> (22.4. 2011)
43. J. Drobnik, R. Dabrowski, A. Szczepanowska, L. Giernat, J. Lorenc. Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vasopressin - induced hypertension or hypercholesterolemia.. *J Physiol Pharmacol* 2000;51:521-533.
44. J. Jawień, P. Nastalek, R. Korbut. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology* 2004;55:503-517.

45. B. Paigen, C. Morrow, C. Brandon a kol. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 1985; 57:p.65-73.
46. J. L. Breslow. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996, Vol. 272, Iss. 5262, pg. 685, 4 pgs.
47. S. Cheifetz a kol. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:19027–19030.
48. K. J. Gordona a G. C. Blob. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008. Vol 1782, Issue 4, Pages 197-228.
49. T. Bellon a kol. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 1993;23:2340–2345.
50. A. Gougos, M. Letarte. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990;265: 8361–8364.
51. J. M. López-Novoa, C. Bernabeu. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:959-974.
52. N.P. Barbara, J.L. Wrana, M. Letarte. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999;274:584–594.
53. F. Tian, A.X. Zhou, A.M. Smits, E. Larsson, M.J. Goumans, C.H. Heldin a kol. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/alk-1/smad1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392:283-8.
54. P. Dijke, M.J. Goumans, E. Pardali. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 2008;11:79-89.
55. B.A. Conley, J.D. Smith, M. Guerrero-Esteo, C. Bernabeu, C.P. Vary. Endoglin, a TGF- β receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000;153:323–335.
56. S. St-Jacques, U. Cymerman, N Pece, M. Letarte. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor beta binding protein of endothelial and stromal cell. *Endocrinology* 1994; 134:2645-57.

57. D.Y. Li, L.K. Sorensen, B.S Brooke, L.D. Urness, E.C. Davis, D.G. Taylor, B.B. Boak, D.P. Wendel. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 1999; 284: 1534–1537.
58. K.A. McAllister, K.M. Grogg, D.W. Johnson, C.J Gallione, M.A. Baldwin a kol. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8: 345–351.
59. F.S. Govani, C.L. Shovlin. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 2009;17:860–871.
60. <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/early/2009/10/30/cvr.cvp332/F1.expansion> (19.4.2011)
61. C. Bernabeu, B.A. Conley, C.P. Vary. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem* 2007;102(6):1375-88.
62. M. Jerkic, J.V. Rivas-Elena, M. Prieto, R. Carrón, F. Sanz-Rodríguez, F. Pérez-Barriocanal, A. Rodríguez-Barbero, C. Bernabéu, J.M. López-Novoa. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 2004;18:609–611.
63. H. Lüllmann, K. Mohr, M. Wehling. *Farmakologie a toxikologie. 2. vydání.* Grada Publishing a.s. 2004. [s. 238-244]. ISBN: 80-247-0836-1.
64. M. Manzoni, M. Rollini. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002. Volume 58, Number 5, 555-564.
65. D.P. Mikhailidis, G.C. Sibbring, C.M. Ballantyne, G.M. Davies a A.L. Catapano. Meta-analysis of the cholesterol-lowering effect of ezetimibe added to ongoing statin therapy. *Current Medical Research and Opinion* 2007, Vol. 23, No. 8 :Pages 2009-2026.
66. L.G. Stead, L. Vaidyanathan, G. Kumar, M.F. Bellolio, R.D. Brown Jr., S. Suravaram, S. Enduri a kol. Statins in Ischemic Stroke: Just Low-Density Lipoprotein Lowering or More? *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2009, Volume 18, Issue 2, Pages 124-127.
67. Gorecká K, Tilšer I, Nachtigal P a kol. Extralipidové účinky statinů – nový pohled na farmakodynamiku inhibitorů HMG-CoA reduktázy. *Remedia* 2004;14: p. 355-363.
68. I. Hsu, S.A. Spinler, N.E. Johnson. Comparative evaluation of the safety and efficacy of HMGCoA reductase inhibitor monotherapy in the treatment of primary hypercholesterolemia. *Ann Pharmacother* 1995;29:743–59.

69. L.H. Moghadasian. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci* 1999;65:1329-37.
70. A. Jabor a kol. *Vnitřní prostředí*. 1. vydání. Grada Publishing a.s. 2008. [s. 339]. ISBN: 978-80-247-1221-5.
71. T. Doležal. Rabdomyolýza jako nežádoucí účinek statinů. *Remedia* 12/2. s 144-145.
72. D. Williams, J. Feely. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(5):343-70.
73. M.S. Kostapanos, H.J. Milionis, M.S. Elisaf. Rosuvastatin-associated adverse effects and drug-drug interactions in the clinical setting of dyslipidemia. *Am J Cardiovasc Drugs* 2010;10(1):11-28.
74. R. Češka a kol. *Doporučený postup pro praktické lékaře – Dyslipidémie*. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2004. ISBN: 80-903573-4-2.
75. L. Špinarová, J. Vítovec. Statiny a srdeční transplantace. *Remedia* 2/2005. 154-157.
76. S.B. Jadhav, G.K. Jain. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006). pp. 3–18.
77. G. Mundy, R. Garrett, S. Harris a kol. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946–9.
78. M.S. Weber, S.S. Zamvil. Statins and demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;318:313-24.
79. B. McGuinness, D. Craig, R. Bullock, P. Passmore. Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Apr 15;(2):CD003160.
80. R. Češka, K. Urbánek. Atorvastatinum. *Remedia* 2004;2: s. 110-120.
81. S.E. Nissen, E.M. Tuzcu, P. Schoenhagen, B.G. Brown a kol. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *Jama* 2004;291(9):1071-80.
82. <http://sitemaker.umich.edu/top.200/atorvastatin> (27.4. 2011)
83. J.F. Keaney, Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. 2000;21:99-166.
84. M.J. Goumansand, C. Mummery. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol*. 2000;44:253-265.

85. B. Chen, X. Peng, L. Pentassuglia, C.C. Lim a D.B. Sawyer. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7:114-121.
86. P. Nachtigal, N. Pospisilova, L. Vecerova, S. Micuda, E. Breckova, K. Pospeschova a V. Semecky. Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in Apo E/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16:265-274.
87. M. Piao a O. Tokunaga. Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study. *J Atheroscler Thromb.* 2006;13:82-89.
88. X. Ma, M. Labinaz, J. Goldstein, H. Miller, W.J. Keon, M. Letarte a E. O'Brien. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2546-2552.
89. R.W. Powers, A. Jeyabalan, R.G. Clifton, P. Van Dorsten, J.C. Hauth, M.A. Klebanoff, M.D. Lindheimer, B. Sibai, M. Landon a M. Miodovnik. Soluble fms-Like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PlGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. *PLoS One.* 2010;5:e13263.
90. R.J. Levine, C. Lam, C. Qian, K.F. Yu, S.E. Maynard, B.P. Sachs, B.M. Sibai, F.H. Epstein, R. Romero, R. Thadhani a S.A. Karumanchi. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006;355:992-1005.
91. A.M. Blazquez-Medela, L. Garcia-Ortiz, M.A. Gomez-Marcos, J.I. Recio-Rodriguez, A. Sanchez-Rodriguez, J.M. Lopez-Novoa a C. Martinez-Salgado. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med.* 2010;8:86.
92. P. Nachtigal, L. Vecerova, N. Pospisilova, S. Micuda, E. Breckova, E. Navarro Hernandez, K. Pospeschova a V. Semecky. Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol.* 2009;24:1499-1506.
93. P.T. Bot, I.E. Hoefler, J.P. Sluijter, P. van Vliet, A.M. Smits, F. Lebrin a kol. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke* 2009;40:439-47.

94. W.C. Sessa. eNOS at a glance. *J Cell Sci* 2004;117:2427-2429.
95. J.F. Santibanez, A. Letamendia, F. Perez-Barriocanal, C. Silvestri, M. Saura, C.P. Vary, J.M. Lopez-Novoa, L. Attisano a C. Bernabeu. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol.* 2007;210:456-468.
96. Y. Yao, A.F. Zebboudj, A. Torres, E. Shao a K. Bostrom. Activin-like kinase receptor 1 (ALK1) in atherosclerotic lesions and vascular mesenchymal cells. *Cardiovasc Res.* 2007;74:279-289.