

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium vlivu hypolipidemik na aterogenní proces ve stěně cév u
experimentálního modelu aterosklerózy IV**

Školitel: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

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

Hradec Králové 2006

Hedvika Kozáková

PODĚKOVÁNÍ

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a poskytnuté rady. Dále chci poděkovat Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. a celé katedře biologických a lékařských věd za to, že mně umožnili zabývat se tématem této diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Funkce endotelu za fyziologických podmínek.....	6
2.2 Buněčné adhezní molekuly.....	7
2.2.1 Selektiny	7
2.2.2 Integriny	8
2.2.3 Imunoglobuliny	9
2.2.4 Kadheriny	10
2.3 Endoteliální dysfunkce.....	10
2.4 Ateroskleróza.....	11
2.4.1 Rizikové faktory.....	12
2.4.2 Patofyziologie aterosklerózy	14
2.5 Endoglin.....	18
2.6 ApoE myš jako model aterosklerózy.....	18
2.7 Statiny v léčbě hypercholesterolémie	20
2.7.1 Mechanismus účinku.....	20
2.7.2 Pleiotropní účinky statinů	20
2.7.3 Atorvastatin	22
3. CÍL PRÁCE	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1 Zvířata a předepsaná dieta.....	25
4.2 Biochemická analýza	26
4.3 Imunohistochemie	26
4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí	28
4.5 Statistická analýza	29
5. VÝSLEDKY	30
5.1 Biochemická analýza	30
5.2 Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu	31
5.3 Stereologická analýza exprese endoglinu u ApoE deficientních myší	34
6. DISKUSE	36
7. ZÁVĚR	39
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	40

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

apoE	apolipoprotein E
CD 105	protein endoglin
CRP	C – reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
DM2	diabetes mellitus 2. typu
EDGF	endothelium derived growth factor, růstový faktor produkovaný endotelem
EGF	epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
eNOS	endoteliální NO syntéza
HDL	high density lipoprotein, lipoproteiny o vysoké hustotě
HMG-CoA	hydroxyl-methyl-glutaryl koenzym A
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molekule, adhezní molekula
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1	interleukin 1
LDL	low density lipoprotein, lipoproteiny o nízké hustotě
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor, růstový hormon pro makrofágy
MDGF	monocyte-derived growth factor, růstový faktor monocytů
NO	oxid dusnatý
OCT	tissue freezing medium (zmrazovací směs)
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr; pH 7,4)
PDGF	platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGI ₂	prostacyklin I ₂
TAG	triacylglyceroly
TGF β	transforming growth factor, transformující růstový faktor
TNF α	tumor necrosis factor
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule, adhezní molekula
VLDL	very low density lipoprotein, lipoproteiny o velmi nízké hustotě

1. ÚVOD

Ateroskleróza je onemocnění tepen („kornatění“), při němž se v jejich stěnách ukládají tukové látky ve formě tzv. ateromu a druhotně vápník. Tepna je takto poškozována, ztrácí pružnost a dochází k jejímu postupnému zužování až uzávěru s následnou ischemií příslušné části organismu. Nejnápadnější jsou tyto změny na věnčitých tepnách srdce (ischemická choroba srdeční), tepnách dolních končetin (ischemická choroba dolních končetin) a mozkových tepnách. Mimoto mohou být postiženy i další orgány.

Ateroskleróza se u nás podílí na víc jak polovině úmrtí. Je nejčastější příčinou infarktu myokardu a cévních mozkových příhod. Léčba již vyvinutých změn na tepnách je velice obtížná a odstraňuje jen nejdůležitější důsledky, proto je nutné tomuto onemocnění předcházet.

K rizikovým faktorům vzniku aterosklerózy patří především vysoká hladina krevních tuků (zejména cholesterolu), jež souvisí mimo jiné se způsobem výživy a životním stylem, dále hypertenze, kouření, obezita, diabetes mellitus, hyperhomocysteinémie, stres, nedostatek pohybu. S prevencí aterosklerózy by se mělo započít již v dětství (Kornacewicz-Jach 2003).

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

Tato diplomová práce se však zaměřovala zejména na změny na endotelu, ke kterým dochází ještě před formováním aterosklerotického plátu. Zabývala se také možnostmi ovlivnění vybraných markerů endotelu po krátkodobém podávání v klinické praxi hojně užívaného hypolipidemika atorvastatinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Funkce endotelu za fyziologických podmínek

Endotel je největším orgánem v lidském těle, je tvořen jednou vrstvou specializovaných buněk, které mají řadu regulačních funkcí. Endotel reguluje cévní tonus a permeabilitu, ovlivňuje strukturu cévní stěny, udržuje rovnováhu koagulačních procesů a zajišťuje interakci s buňkami v krevním oběhu (Fishman 1982).

Endotel udržuje *cévní tonus* produkcí látek s vazodilatačními a vazokonstrikčními vlastnostmi. Hlavním vazodilatačním působkem je oxid dusnatý (EDRF/NO), dalšími vazodilatačními faktory jsou např. prostacyklin (PGI₂) a bradykinin. Nejsilnějším vazokonstrikčním faktorem je endotelin-1, dalšími důležitými látkami jsou angiotensin II, acetylcholin nebo tromboxan A₂. Poškození funkce endotelu se projevuje sníženou tvorbou oxidu dusnatého, zvýšenou produkcí vazokonstrikčních faktorů a narušením vazorelaxačních schopností endotelu.

Endotel ovlivňuje *strukturu cévní stěny* produkcí látek s růst stimulujícími a růst inhibujícími účinky. Zvýšené mechanické napětí cévní stěny vede k produkci růstových faktorů jako např. PDGF (růstový faktor tvořený destičkami) a IGF-1 (inzulinu podobný růstový faktor). Také endotelin-1 a angiotensin II mají mitogenní účinek na hladné svalové buňky a endotel. Mezi látky inhibující proliferaci buněk cévní stěny patří EDRF/NO, prostacyklin nebo TGF-β (Cannon 1998).

Intaktní endotel je dokonale nesmáčivým povrchem, který udržuje rovnováhu mezi faktory *regulujícími trombotické a fibrinolytické procesy*. EDRF/NO a prostacyklin brání adhezi a agregaci trombocytů. Antikoagulační aktivita spočívá ve vytváření bariéry mezi cirkulujícími koagulačními faktory a tkáňovým faktorem a v produkci antikoagulačně působícího heparin sulfátu a trombomodulinu (působícím prostřednictvím aktivace proteinu C) (Vanhoutte 1997). V regulaci fibrinolýzy se endotel účastní tvorbou plazminogenového aktivátoru (tPA) a inhibitorů plazminogenových aktivátorů (PAI-1,2). Endotel produkuje také řadu koagulačních faktorů (faktory V, VII, tkáňový faktor, kininogen) a protrombogenní von Willebrandův faktor.

Endotel na svém povrchu exprimuje adhezivní molekuly, které zajišťují *interakci s buňkami v krevním oběhu*. Za fyziologických okolností je na povrchu endotelu jen malé množství adhezivních molekul. Při aktivaci endotelu je zvýšena exprese adhezivních molekul na povrchu endotelu a leukocytů (E-selektinu, imunoglobulinových adhezivních molekul, integrinů), která usnadňuje adhezi a průnik leukocytů do cévní stěny (Cines et al 1998).

Endotel vytváří selektivní bariéru bránící průniku škodlivých látek do cévní stěny. Za patologických situací, při poškození endotelu nebo jeho aktivaci zánětlivými působky či ischemií, se zvyšuje *propustnost endotelu* pro aterogenní lipidy a monocyty, dochází k jejich akumulaci subendoteliálně a k iniciaci pochodů vedoucích k ateroskleróze.

2.2 Buněčné adhezivní molekuly

Adhezivní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Nepůsobí pouze pasivně, ale účastní se také přenosu signálů mezi buňkami a podílejí se tak na interakci buněk s okolním prostředím. Účastní se řízení řady fyziologických dějů (embryogeneze, buněčný růst a diferenciací, hojení ran, obnova tkání), ale uplatňují se též při patologických procesech (podíl na interakcích mezi složkami imunitního systému) (Blankenberg et al 2003). Podle strukturních vlastností je můžeme rozdělit na čtyři základní skupiny: selektiny, integrity, imunoglobulinová skupina a kadheriny.

2.2.1 Selektiny

Selektiny představují skupinu tří adhezivních molekul, konkrétně E-, L- a P-selektinu. Jsou to proteiny, které obsahují na svém N-konci pektinovou nebo lecitinovou doménu, která se účastní interakce s příslušnými ligandy (nejčastěji sacharidovými) a určuje specifitu vazby. Dále obsahují EGF (epidermal growth factor) podobnou doménu, CRP domény, transmembránový úsek a cytoplazmatický C-konec (Blankenberg et al 2003).

E-selektin je exprimován endotelem a zprostředkovává adhezi leukocytů na cévní endotel. Stimulem k jeho expresi je aktivace endotelu zánětlivými faktory, např. TNF α a interleukinem-1 (Joseph-Silverstein & Silverstein 1998).

L-selektin se nachází na leukocytech (B, T lymfocyty, neutrofilly, eosinofily) a také na nezralých erythrocytech. Jeho význam spočívá v zajištění vazby leukocytů na endotel v místě zánětu, ale je zde přítomen konstitučně, to znamená, že k jeho expresi není nutná aktivace (Joseph-Silverstein & Silverstein 1998).

P-selektin má největší molekulu ze skupiny selektinů. Nachází se v alfa granulích destiček a Weibel-Paladeho tělíscích endoteliálních buněk. Zprostředkovává interakce mezi krevními buňkami, leukocyty a endotelem. P-selektin je zodpovědný za adhezi leukocytů a krevních destiček na endotel. Účastní se první fáze interakce lymfocytů s endotelem, kdy dochází k tzv. kutálení neboli rollingu. Je exprimován po aktivaci způsobené vyplavením zánětlivých mediátorů – histaminu a trombinu, kdy dochází k degranulaci destiček a Weibel-Paladeho tělísek (Nachtigal et al 2004).

Exprese P- a E-selektinu je zvýšená v aterosklerotických plátech. Navíc bylo zjištěno, že P-selektin je společně s VCAM-1 exprimován endotelem ještě před akumulací mikrofágů a T lymfocytů v intimě cév. Lze tedy říci, že E- a zejména P-selektin jsou markery časně aktivace endotelu a podílejí se na iniciační akumulaci mikrofágů a T lymfocytů v intimě cév (Jang et al 1994).

2.2.2 Integriny

Integriny jsou transmembránové glykoproteiny exprimované na všech tkáních v organismu. Jde o heterodimery se dvěma nekovalentně asociovanými podjednotkami α a β . Dále obsahují N-konec, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Na buňkách se vyskytují konstitučně, ale ve dvou konformačních stavech, které se liší afinitou ke svým ligandům. V klidu jsou v nízkoafinní konformaci, po aktivaci různými stimuly (např. dvojmocnými kationty Mg^{2+} či Mn^{2+}) přecházejí do vysokoafinního stavu, který umožňuje vznik pevné vazby.

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou významné tři skupiny integrinů – β_1 , β_2 a β_3 . Do skupiny β_1 patří integriny exprimované monocyty, T lymfocyty a trombocyty a vážou složky mezibuněčné hmoty, jako je kolagen a adhezní molekuly exprimované na endotelu. β_2 jsou leukocytární integriny, které se účastní interakce mezi leukocyty a endotelem. Poslední skupinu tvoří β_3 integriny, které se účastní interakcí trombocytů se složkami mezibuněčné hmoty a hrají tak zásadní

roli při zachycování destiček v místě vaskulárního poškození. K nejznámějším zástupcům této skupiny patří integrin IIb/IIIa exprimovaný na destičkách (Mareckova et al 1999).

Z výše uvedených faktů vyplývá, že integriny jsou zásadní pro vytvoření pevné a stabilní vazby leukocytů k endotelu v místě zánětlivé reakce.

2.2.3 Imunoglobuliny

Ig skupina adhezních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50 % všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců. Patří sem celá řada molekul, např. antigenně specifické receptory T a B lymfocytů. Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci VCAM-1, ICAM-1 a PECAM-1 (Vlassara et al 1995).

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) a ICAM-1 intercellular cell adhesion molecule-1

Z hlediska struktury jsou obě adhezní molekuly transmembránové glykoproteiny obsahující N-konec, sérii Ig domén transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Obě adhezní molekuly jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami. Studie na zvířecích modelech prokázaly, že VCAM-1 je endoteliálními buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů a to v oblastech, které jsou predispoziční ke vzniku lézí. Lokalizace těchto míst bývá ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především shear stresem. Naproti tomu exprese ICAM-1 je pozorována i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí (Iiyama et al 1999).

Exprese těchto adhezních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy, např. hypercholesterolémií, oxidovanými LDL, diabetem, kouřením, hyperhomocysteinémií či hemodynamickým stresem.

PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule)

Jedná se o glykoprotein, který má šest extracelulárních Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec (Tian et al 2005).

PECAM-1 je exprimovaný hlavně na endoteliálních buňkách v místě intercelulárních spojů, na trombocytech a většině leukocytů. Hraje důležitou roli ve

vaskulogenezi, angiogenezi a významně se podílí na transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostor.

2.2.4 Kadheriny

Jedná se o transmembránové glykoproteiny, které zodpovídají za hemofilní mezibuněčnou adhezi. Tato adheze je závislá na přítomnosti extracelulárního vápníku. Jsou to hlavní strukturální glykoproteiny, které tvoří adherentní mezibuněčné spoje, zvané zonula adhaerens (Joseph-Silverstein & Silverstein 1998).

Kadheriny se podílejí na diferenciaci, proliferaci a migraci buněk při dějích jako jsou angiogeneze, vaskulogeneze nebo reparace poškozené tkáně. Tyto funkce kadherinů jsou zprostředkovány jednak jejich adhezními vlastnostmi a jednak schopností podílet se na přenosu signálů mezi buňkami

Dnes je popsáno velké množství kadherinů, ve vztahu k ateroskleróze mají největší význam epiteliální (E)-kadherin a vaskulární – endoteliální (VE)-kadherin. Exprese E-kadherinu byla zjištěna v aterosklerotických lézích u buněk, jež se transformovaly na pěnové buňky. Zdá se, že by se E-kadherin mohl podílet na agregaci těchto pěnových buněk a podílet se tak i na formování lipidového jádra. (Moiseeva 2001). VE-kadherin je exprimován cévním endotelem téměř u všech typů cév. Je hlavní adhezní molekulou adherentních spojů mezi endoteliálními buňkami. Řada studií prokázala, že dezintegrace či porušená funkce VE-kadherinu má za následek zvýšení endoteliální permeability a tím přispívá ke vzniku endoteliální dysfunkce (Bobryshev et al 1999).

2.3 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními a hemokoagulačními mechanismy (Chan et al 2003). Endoteliální dysfunkce hraje důležitou roli v patogenezi cévní aterosklerózy, arteriální hypertenze, diabetu nebo srdečního selhání. Zlepšení poškozené funkce endotelu úpravou životosprávy a vhodnou léčbou může zabránit vzniku a progresi aterosklerózy a jejích komplikací.

Endotel neustále odpovídá na řadu lokálních a systémových podnětů. *Aktivace endotelu* těmito podněty vede k různým typům odpovědi – ke změně permeability, vazospastickým reakcím, porušení hemostatických mechanismů, uvolnění růstových faktorů. Aktivace endotelu může být na rozdíl od endoteliální dysfunkce přechodnou krátkodobou epizodou, která provází např. virovou infekci, nebo krátkodobou expozici aktivačním faktorům.

Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, kouření, hyperhomocysteinémie nebo nedostatek estrogenů svým chronickým působením poškozují endoteliální funkce vedou ke vzniku *endoteliální dysfunkce*. Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované poškození endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi faktory vazorelaxačními a vazokonstrikčními, prokoagulačními a antikoagulačními, růst stimujícími a růst inhibujícími. Výsledkem je proaterogenní účinek s převahou vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů (Mizia-Stec et al 2003).

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

2.4 Ateroskleróza

Ateroskleróza je pomalu postupující onemocnění tepen, při němž je ztluštěna intima fibrózními uloženinami, které postupně zužují lumen a současně jsou místem vzniku krvácení a tvorby trombů. Etiopatogeneze aterosklerózy je multifaktoriální proces. Vzniká jako specifická reakce na nespecifické poškození cévní stěny. Neznáme sice jednoznačnou příčinu jejího vzniku, známe ale řadu faktorů, které se na jejím vzniku podílejí a nazýváme je rizikovými faktory (Muntner et al 2005).

2.4.1 Rizikové faktory

Kardiovaskulární onemocnění jsou příčinou více než poloviny všech úmrtí v západních průmyslových státech. Jedním z nejvýznamnějších úspěchů lékařství bylo odhalení rizikových faktorů, které můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné řadíme hyperlipidemii, hypertenzi, kouření, diabetes mellitus a hyperhomocysteinémii, mezi neovlivnitelné potom vyšší věk, mužské pohlaví a genetickou zátěž.

Kouření

Kouření zvyšuje riziko úmrtí následkem koronární aterosklerózy na 1,4 až 2,4 násobek, u silných kuřáků dokonce na 3,5 násobek. Příčiny jsou zejména stimulace sympatiku nikotinem, vytěsnění kyslíku na hemoglobinu CO, zvětšená přilnavost trombocytů a zvýšená propustnost endotelu způsobená látkami obsaženými v kouři (Zieske et al 2005),

Hyperlipidemie

Nejzávažnější je zvýšená hladina plazmatické koncentrace LDL cholesterolu, která výrazně urychluje vznik aterosklerózy. Snížení jeho koncentrace o 1 % vede k poklesu rizika koronárních příhod asi o 2 %. Není zatím jasné, jaké jsou optimální koncentrace LDL cholesterolu v krvi. Současná doporučená koncentrace < 3,0 mmol/l se vztahuje k primární i sekundární prevenci ICHS (Coniglio et al 1997).

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

Zvýšená koncentrace triglyceridů je samostatným nezávislým rizikovým faktorem ICHS u žen i u mužů, vyšší riziko přináší ženám. Doporučená koncentrace triglyceridů je < 2,0 mmol/l (Stehbens 2002).

Diabetes mellitus

Působí rozvoj aterosklerózy hlavně narušením metabolismu lipidů. Nejvhodnějším léčebným postupem je dosažení co nejfyziologičtějších hodnot glykémie u pacientů (Virmani et al 2006).

Genetická predispozice a pohlaví

Genetická predispozice ovlivňuje hlavně rizikové faktory jako je hypertenze, diabetes mellitus či trombogenní faktory. Mezi nejvíce rizikové genetické predispozice patří familiární hypercholesterolémie (zvýšená hladina VLDL a LDL cholesterolu). U mužů přicházejí aterosklerotické změny o 10 let dříve než u žen. Ženské pohlavní hormony působí projektivně, po snížení jejich hladiny v menopauze dochází ke zrychlení vývoje aterosklerózy (Luft 2002).

Tělesná inaktivita a věk

Pravidelný tělesný pohyb je nedílnou součástí prevence aterosklerózy. Výskyt aterosklerózy narůstá se zvyšujícím se věkem. Za rizikové skupiny z hlediska kardiovaskulárních onemocnění je považován věk nad 45 let u mužů a nad 55 let u žen (Cheng 2005).

Nevhodná strava a obezita

Nevhodná je především energeticky nadbytečná strava s přemírou tuků, zvláště nasycených, cholesterolu a cukrů. Naproti tomu projektivně působí strava obsahující vyšší podíl nenasycených tuků (rybí olej), zeleniny a vlákniny (Cheng 2005)..

Alkohol

Negativně působí pravidelný příjem vyšších dávek alkoholu. Malé dávky naopak působí projektivně (zvláště pokud současně obsahují vyšší koncentraci flavonoidů, jako je tomu u červeného vína) (Daubresse 2000).

Železo

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

Zvýšená koncentrace plazmatického histaminu

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

Infekční agens

Uvažuje se o některých bakteriálních a virových patogenech (Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, Herpes simplex virus, Cytomegalovirus). Jedním z příčin je schopnost bakteriálních kmenů produkovat faktory shlukující trombocyty, dále stimulovat produkci zánětlivých mediátorů, které se významně podílejí na rozvoji aterosklerózy (Laurila et al 1997).

V poslední době se objevila řada dat ukazujících na význam subklinické dysfunkce štítné žlázy. Subklinická hypotyreóza se manifestuje necharakteristickými příznaky – únavností, nevykonností, depresivním laděním, apod. Tento stav je spojen se zvýšenými hladinami sérového cholesterolu. Bylo prokázáno, že nemocní se subklinickou hypotyreózou mají prokazatelně rozsáhlejší aterosklerózu aorty a častější výskyt akutního infarktu myokardu (Foldes et al 2004).

2.4.2 Patofyziologie aterosklerózy

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

Lipidní proužky – lipidní proužky jsou shluky pěnových buněk. Tento typ lézí je první fází aterosklerózy a nachází již u dětí a mladých lidí (Worthley et al 2000)

Aterogenní proces se odvíjí od endoteliální dysfunkce, popsané výše. Spolupůsobením aterogenních faktorů dochází ke zvýšené kumulaci LDL v intimě cév. Zde se oxidačními procesy mění a vážou se na subendoteliální proteoglykany a kolagen. (Thorngate et al 2002) Oxidované LDL přímo aktivují endotel, působí chemotakticky na monocyty, a zvyšují endoteliální expresi P-selektinu, VCAM-1 a ICAM-1. Výsledkem je aktivace cirkulujících monocytů a T lymfocytů a jejich prostupu do intimy cév. (Vestweber & Blanks 1999)

První fáze prostupu leukocytů do subendoteliálních prostor se nazývá „kutálení po endotelu“ a spočívá v interakci mezi lektinovými receptory leukocytů a

selektiny. Vytvoření pevné vazby je zprostředkováno interakcí mezi adhezivními molekulami VCAM-1, ICAM-1 a integriny. Transmigraci leukocytů umožňuje molekula PECAM-1, která se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk a interaguje s PECAM-1 molekulou na leukocytech. (Konstantopoulos & McIntire 1997)

V této fázi dominují v intimě monocyty. Jsou pod vlivem působení růstových faktorů jako EDGF (endothelium-derived growth factor) nebo faktorů stimulujících tvorbu kolonií jako např. M-CSF, díky kterým dochází k transformaci monocytů na makrofágy. Makrofágy vycytávají prostřednictvím svých receptorů oxidované lipoproteiny, které nemohou být katabolizovány cestou LDL receptorů. Estery cholesterolu se tedy kumulují intracelulárně. Vznikají tzv. pěnové buňky a jejich nahromaděním lipidní proužky (Boyle 2005).

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

Makrofágy, podílející se na tvorbě lipidních proužků, produkují řadu látek, které ovlivňují další formování aterosklerotické léze. Ve velké míře produkují chemokin MCP-1, který zesiluje chemotaxi a podílí se na další akumulaci makrofágů v lézi. Dále produkují společně s endotelem destičkový růstový faktor (PDGF), monocytový růstový faktor (MDGF) a zánětlivé IL-1 β a IL-8, které přispívají ke změně kontraktálního fenotypu hladkosvalových buněk na fenotyp syntetický a také podporují proliferaci a migraci hladkosvalových elementů. TNF- α produkovaný aktivovanými makrofágy společně s IL-1 β zvyšuje expresi adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 (Chepelenko 2003).

V této fázi vstupují do procesu aterogeneze hladkosvalové buňky. Normálně se nacházejí v kontraktálním stavu, podílejí na udržení cévního tonu, na syntéze extracelulární matrix v medii a na reparaci cévní stěny při různých poraněních. (Schwartz 1997) Po změně na syntetický fenotyp (pomocí růstových faktorů a chemokinů makrofágů a T lymfocytů) dochází k rozrušení bazální membrány a změně exprese některých adhezivních molekul. Hladkosvalové buňky se uvolní z vazby na extracelulární matrix v medii a transmigrují do intimy, kde se vážou prostřednictvím VCAM-1 a ICAM-1 molekul na endotelové buňky,

makrofágy a leukocyty. V intimě začnou hladkosvalové buňky produkovat složky extracelulární matrix, zejména kolagen. (Moiseeva 2001)

Kolagen je v aterosklerotických lézích tvořen nejen hladkosvalovými buňkami, ale i endoteliálními buňkami a fibroblasty. Syntéza kolagenu souvisí jak se změnou fenotypu, migrací a proliferací hladkosvalových buněk, tak s řadou lokálních i systémových činitelů (TGF- β , PDGF, angiotensin II, IL-1, homocystein a mechanické napětí stimulují tvorbu kolagenu).

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

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

Makrofágy dále pohlcují lipoproteinové částice a částečně dochází k jejich kumulaci ve střední části plátu. Zvýšeně akumulují volný cholesterol, zatímco v počátečních stádiích pohlcovaly estery cholesterolu. Cytotoxické účinky volného cholesterolu zřejmě vedou k odumírání makrofágů. Po zániku makrofágů se lipidy akumulují extracelulárně, uvolní se hydrolytické enzymy a zánětlivé substance a vytvoří se nekrotické lipidové jádro. (Williams & Tabas 1998)

Také migrace hladkosvalových buněk z intimy do medie pokračuje, a to směrem k povrchu aterosklerotického plátu přes lipidové jádro. Stále syntetizují extracelulární matrix, zejména kolagen, elastin a proteoglykany. Všechny tyto děje vedou k vytvoření tzv. fibromuskulární čepičky na povrchu aterosklerotického plátu. V nekrotických oblastech plátu navíc dochází k ukládání vápníku a mineralizaci.

Pokročilé aterosklerotické léze jsou vždy potenciálně velmi nebezpečné, protože často způsobují stenózu cévy. Pokud se propustnost cévy zmenší pod 15%, dochází často k projevům ischemie, nejčastěji anginy pectoris. Klinické komplikace aterosklerózy jako je infarkt myokardu však nezávisí na stupni cévní obstrukce, ale vznikají především jako následek trombózy. (Hackman et al 1996)

Vznik trombu – Toto stádium je vlastně již klinickou komplikací aterosklerózy. Ke vzniku trombu může dojít buď při erozi endotelu nebo při ruptuře plátu. Na vzniku trombózy se podílí celá řada faktorů, které často patří mezi obecné rizikové faktory aterosklerózy. Jsou to hyperlipidémie, hyperhomocysteinémie, diabetes, zvýšená koagulační aktivita, snížená fibrinolytická aktivita, atd (Boyle 2005).

Malá eroze endotelu znamená expozici kolagenu a tkáňového faktoru destičkám, čímž vznikají mikrotromby. Vznik těchto mikrotrombů nemá žádný klinický význam. Pokud je eroze a destrukce endotelu větší, dochází ke vzniku tzv. červeného trombu, který obsahuje velké množství destiček, červených krvinek a fibrinu. Tento trombus postupně uzavírá lumen cévy a může dojít až k úplné okluzi. Kromě toho se v místě vzniku trombu rozvíjí zánětlivá reakce s akumulací makrofágů a T lymfocytů (Badimon et al 1999).

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

Ruptura aterosklerotického plátu je způsobena hlavně mechanickými silami, které působí na plát, a které převládají nad mechanickými vlastnostmi plátu. Stabilitu plátu významně oslabují makrofágy a T lymfocyty produkcí zánětlivých cytokinů a proteolytických enzymů (metaloproteináz), které snižují syntézu a zvyšují degradaci extracelulární matrix. Stabilita je oslabena také kumulací lipidů, degradací kolagenu, apoptózou a sníženou migrační a proliferační aktivitou hladkosvalových buněk (Afzal et al 1999).

2.5 Endoglin

Endoglin (CD 105) je protein důležitý pro angiogenezi. Je exprimován na buněčném povrchu jako homodimerický transmembránový protein o velikosti 180 kDa. Jeho externí doména váže transformační růstový faktor β (TGF β -1) a jeho tři izoformy. Transmembránová a intracelulární doména vykazuje 71% podobnost s betaglykanem (Obreo et al 2004).

Krátce po objevení endoglinu byly odhaleny jeho další důležité funkce; mnoho těchto funkcí je pravděpodobně spjato se signalizací prostřednictvím TGF- β . Tvzení, že endoglin může být spojován s angiogenezí v různých nádorových tkáních, má kořeny v pozorování, že jeho exprese je zvýšena v endotelu nádorových tkání ve srovnání s normálními tkáněmi.

Studie provedené v různých laboratořích s použitím různých protilátek proti CD 105 prokázaly zvýšenou expresi endoglinu v širším rozsahu v nádorových tkáních včetně nádorů střeva, prsu, mozku, plic či nádoru děložního čípku, což připouští možnost, že endoglin pozitivně ovlivňuje angiogenezi v nádorových tkáních (Guerrero-Esteo et al 1999).

Mutace genu pro endoglin navíc vede k rozvoji hereditární hemorrhagické telangiektázie. (Bourdeau et al 1999)

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

2.6 ApoE myš jako model aterosklerózy

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u

vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (Jawien et al 2004).

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

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE) (Tian et al 2005). ApoE jsou tvořeny primárně v játrech, mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myši se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myši se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneurysmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly (Hofker et al 1998).

Jeden ze spouštěcích mechanismů aterosklerózy je její exacerbace stravou bohatou na cholesterol a tuky. ApoE deficientní myši tento mechanismus napodobují. Pokud jsou tyto myši krmeny stravou obsahující 0,15 % cholesterolu

a 21 % tuků, vzroste hladina jejich cholesterolu 3 – 4x a jejich aterosklerotické léze progredují.

2.7 Statiny v léčbě hypercholesterolemie

Statiny (někde uváděny též pod názvem vastatiny) jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktázy). Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením, tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizací aterosklerotických plátů aj (Stancu & Sima 2001). Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

2.7.1 Mechanismus účinku

Statiny blokují jeden z časných kroků endogenní biosyntézy cholesterolu, přeměnu HMG-CoA na mevalonát inhibicí HMG-CoA reduktázy. Výsledkem inhibice syntézy cholesterolu je snížená buněčná koncentrace cholesterolu zejména v hepatocytu, která vede ke zvýšené syntéze jaterních LDL receptorů, čímž dochází k rychlejšímu odstraňování LDL cholesterolu z oběhu. Hladiny triglyceridů a VLDL cholesterolu jsou rovněž snižovány, HDL cholesterol se mírně zvyšuje nebo zůstává nezměněn (Davignon & Mabile 2001)..

2.7.2 Pleiotropní účinky statinů

Několik velkých randomizovaných studií prokázalo, že pacienti léčení statiny měli významně nižší riziko koronárních příhod než pacienti léčení jinými hypolipidemiky i přes srovnatelný pokles sérové hladiny cholesterolu. Ke klinickému prospěchu z léčby statiny tedy zřejmě přispívají jejich extralipidové účinky, které nejsou závislé na snížení koncentrace LDL cholesterolu (Calabro & Yeh 2005). Významné antiaterogenní účinky statinů spočívají v příznivém ovlivnění funkce endotelu, zánětlivých parametrů, formaci trombů, stability plátů, inzulinové rezistence a kostní formace, což jsou mechanismy a procesy uplatňující se v patofyziologii aterosklerózy, ischemické cévní mozkové příhody, demence,

osteoporózy nebo diabetes mellitus. Tyto vlastnosti statinů by mohly rozšířit spektrum jejich doposud známých farmakodynamických účinků a umožnit tak jejich využití v jiných než kardiovaskulárních indikacích (Arnaud & Mach 2005).

Protizánětlivé účinky statinů se projevují především snížením hladin C-reaktivního proteinu, inhibicí interakce mezi endotelovými buňkami a leukocyty a snížením počtu zánětlivých buněk v aterosklerotickém plátu.

Příznivé ovlivnění stavu endoteliální dysfunkce spočívá pravděpodobně v jejich schopnosti zvyšovat expresi a aktivitu endoteliální NO syntézy (dochází zde k ovlivnění posttranskripčních a posttranslačních dějů, ne však ke zvýšené genové transkripci eNOS). Zvýšení syntézy NO indukované statiny může kompenzovat nedostatečnou tvorbu NO v aterosklerotických lézích a působit tak proti progresi aterosklerózy.

Některé (především lipofilnější statiny) snižují migraci a proliferaci hladkosvalových buněk a to nezávisle na svých hypocholesterolemických vlastnostech, čímž zpomalují vznik aterosklerotické léze. Statiny též inhibují expresi tkáňového faktoru u lidských makrofágů, což může vést ke snížení intenzity trombózy doprovázející rupturu plátu; dále snižují syntézu metaloproteináz (proteolytických enzymů produkovaných aktivovanými makrofágy), které způsobují oslabení fibrózního krytu plátu. Snížení syntézy metaloproteináz znamená také snížení rizika ruptury plátu (Andrejak et al 2003).

Snížení hladin triglyceridů statiny může být zodpovědné za snížení inzulinové rezistence u nemocných s DM2 posunem od volných mastných kyselin zpět ke glukóze jako hlavnímu intracelulárnímu zdroji energie periferních tkání. Protizánětlivé vlastnosti statinů mohou zase zpomalit vývoj inzulinové rezistence zprostředkovaný některými cytokiny z tukové tkáně obézních pacientů.

Experimentální podávání statinů bylo spojeno se snížením intracelulárních a extracelulárních hladin amyloidu β . Omezení tvorby β -amyloidních plaků je zapříčiněno snížením množství membránového cholesterolu v membránách mozkových buněk, čímž se zpomaluje progresse Alzheimerovy choroby. Statiny mohou působit na rozvoj demence ještě dalším mechanismem nezávislým na metabolismu cholesterolu. Autoři nedávno publikované studie zjistili vztah mezi podáváním statinů a jejich schopností inhibovat lidské cholinesterázy, zejména

butyrylcholinesterázu, která bývá u pacientů s Alzheimerovou chorobou patologicky zvýšená (Duriez 2003).

Statiny by mohly působit i při novotvorbě kostní hmoty zvýšením exprese genu pro kostní morfogenetický protein-2. Tento protein je růstový faktor, který umožňuje proliferaci a zrání osteoblastů a novotvorbu kostí. V několika observačních studiích bylo zjištěno přibližně 50% snížení rizika zlomenin u pacientů užívajících statiny ve srovnání s pacienty s nestatinovými hypolipidemiky nebo bez hypolipidemické léčby.

Výše popsané účinky, založené ve většině případů na modulaci biosyntézy mevalonátu, výrazně přispívají ke snížení rizika aterosklerotických komplikací a mohly by být v budoucnu využity i v dalších indikacích, jako je snížení rizika nového vývoje DM2, demence či osteoporózy. Použití statinů v jiných než hypolipidemických indikacích však zatím brání nedostatek randomizovaných klinických studií, takže obecně platí názor, že extralipidové účinky statinů efektivně doplňují jejich přímý účinek na hladinu lipidů (Wierzbicki et al 2003)..

2.7.3 Atorvastatin

Atorvastatin je podáván ve formě aktivní látky. Po perorálním užití je rychle absorbován, většina dávky je vycytována z krve v játrech v průběhu jediného průchodu tímto orgánem. Tak se atorvastatin koncentruje v hlavním cílovém orgánu, tedy v játrech. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 1–2 hodinách. Váže se asi z 98% na plazmatické proteiny. Je metabolizován cytochromem P450 3A4, z velké části na biologicky aktivní metabolity. Je vylučován žlučí po hepatální a extrahepatální metabolizaci. Asi 80 % podané dávky se objevuje ve stolici (Vaughan et al 1996).

Atorvastatin se používá pro léčbu hypercholesterolemie způsobené zvýšením plazmatických koncentrací LDL cholesterolu – zvláště jsou vhodné pro familiární hypercholesterolemii typu IIa. Při samotné léčbě statiny se sníží koncentrace LDL cholesterolu přibližně o 40 %. Pokud se statiny kombinují s iontoměničím, lze dosáhnout snížení LDL až o 60 % při současném příznivém vlivu na průběh koronární aterosklerózy (Stancu & Sima 2001).

Atorvastatin je kontraindikován při jaterních onemocněních v aktivním stavu nebo s neobjasněným zvýšením sérových transamináz na více než trojnásobek normálních hodnot, při myopatii, u žen v reprodukčním věku bez spolehlivě zajištěné antikoncepce, u těhotných žen. Vzhledem k nedostatečným zkušenostem je léčba atorvastatinem u dětí vyhrazena pouze specialistům a pro děti s těžkou formou hypercholesterolemie (Andrejak et al 2003). Incidence nežádoucích účinků při léčbě statiny je relativně nízká.

3. CÍL PRÁCE

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

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

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

4.1 Zvířata a předepsaná dieta

Všechny myši byly ve 4 týdnech života ostaveny od matky a náhodně rozděleny do 2 skupin.

ApoE deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení standardní laboratorní stravou 12 týdnů (apoE^{-/-} neléčená skupina). V atorvastatinové skupině byly myši krmeny standardní laboratorní stravou, do níž byl přidáván atorvastatin v dávce 10mg/kg/den dalších 8 týdnů po odstavení (apoE^{-/-} atorvastatinová skupina).

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

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

4.2 Biochemická analýza

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

4.3 Imunohistochemie

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C . Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy po patnáctiminutovém usušení vložily na 10 minut do destilované vody, následně se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). V další fázi byly na sklíčka nepipetovány roztoky anti avidinu a anti biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut), dále do roztoku 3% H_2O_2 (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy inkubovaly se sekundárními protilátkami (30 minut) – goat anti-hamster IgG a goat anti-rat IgG (Vector Laboratories), které byly značeny biotinem a opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dále byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories). K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontována do eukittu.

Byly použity následující primární protilátky:

monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) – zředění 1/100

monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) – zředění 1/100

monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) – zředění 1/50.

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

Pracovní postup

nechat uschnout řezy	60 minut
fixace aceton (uschovaný v -20°C)	15 minut
usušit	15 minut
PBS	10 minut
10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	30 minut
Inkubace s avidinem D	15 minut
oplach v PBS	5 minut
Inkubace s biotinem	15 minut
PBS	oplach
primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
PBS 1	2x5 minut
10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	15 minut
sekundární protilátka (+ mouse sérum v PBS)	30 minut
PBS 3	5 minut
3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
PBS 4	2x5 minut
ABC komplex elite	30 minut
PBS 5	5 minut
DAB (podle návodu)	nutno určit čas
destilovaná voda	oplach
aceton	oplach
aceton – xylen (10:1)	3 minuty
aceton – xylen (1:10)	3 minuty
3x xylen	2 minuty
Eukitt – montování krycího sklíčka	

4.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí

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

$$estA = a * P,$$

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

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

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

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

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

4.5 Statistická analýza

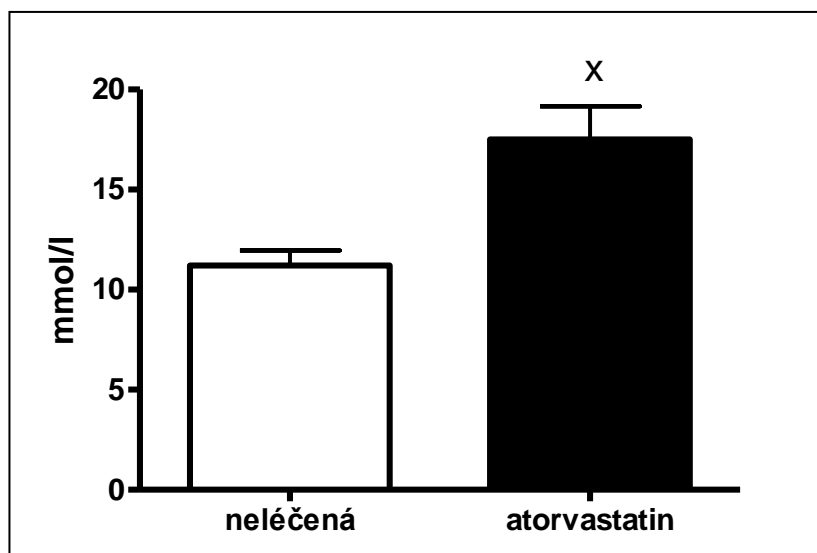
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (One Way Anova). Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$ kde $\alpha=0,05$. Pokud se mezi skupinami vyskytl statisticky významný rozdíl, byl použit Tukey test pro mnohočetná porovnání.

5. VÝSLEDKY

5.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu. Osmítýdenní podávání atorvastatinu překvapivě vedlo ke zvýšení hladiny celkového cholesterolu u atorvastatinové skupiny ve srovnání s neléčenými zvířaty ($11,21 \pm 0,75$ vs. $17,51 \pm 1,16$ mmol/l, $P = 0,005$) (viz. obr.1)

Obrázek 1. Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší. Osmítýdenní podávání atorvastatinu signifikantně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. ($XP = 0,005$).



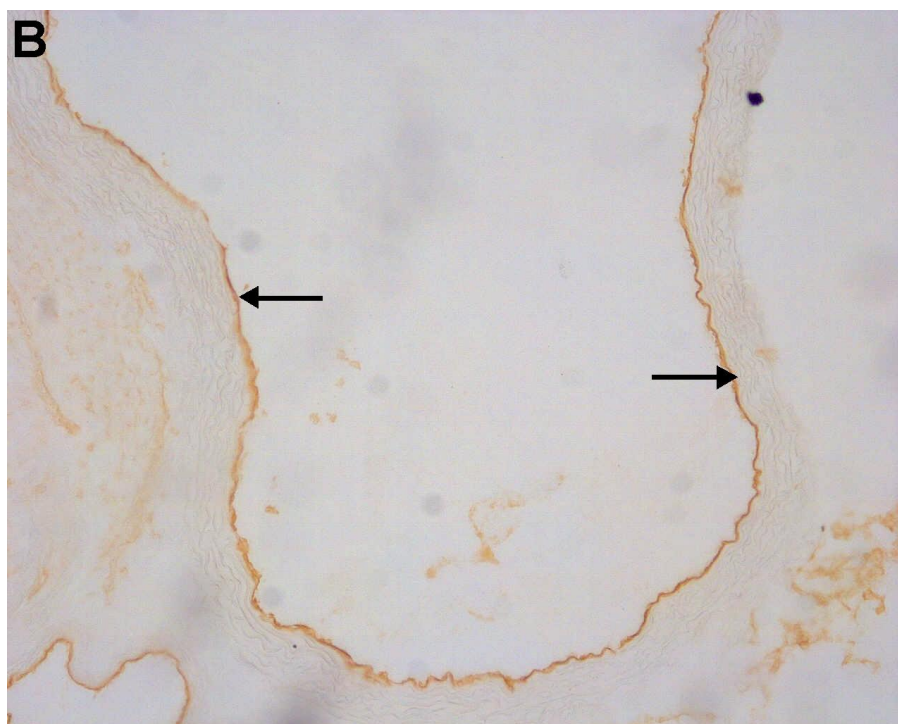
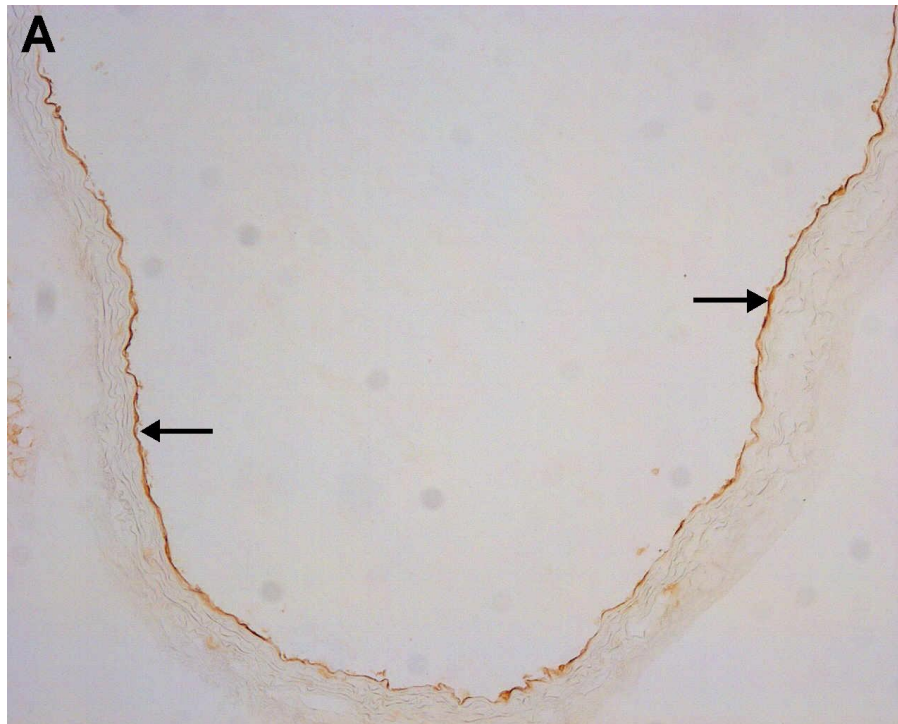
5.2 Imunohistochemické barvení VCAM-1 a endoglinu v oblasti aortálního sinu

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

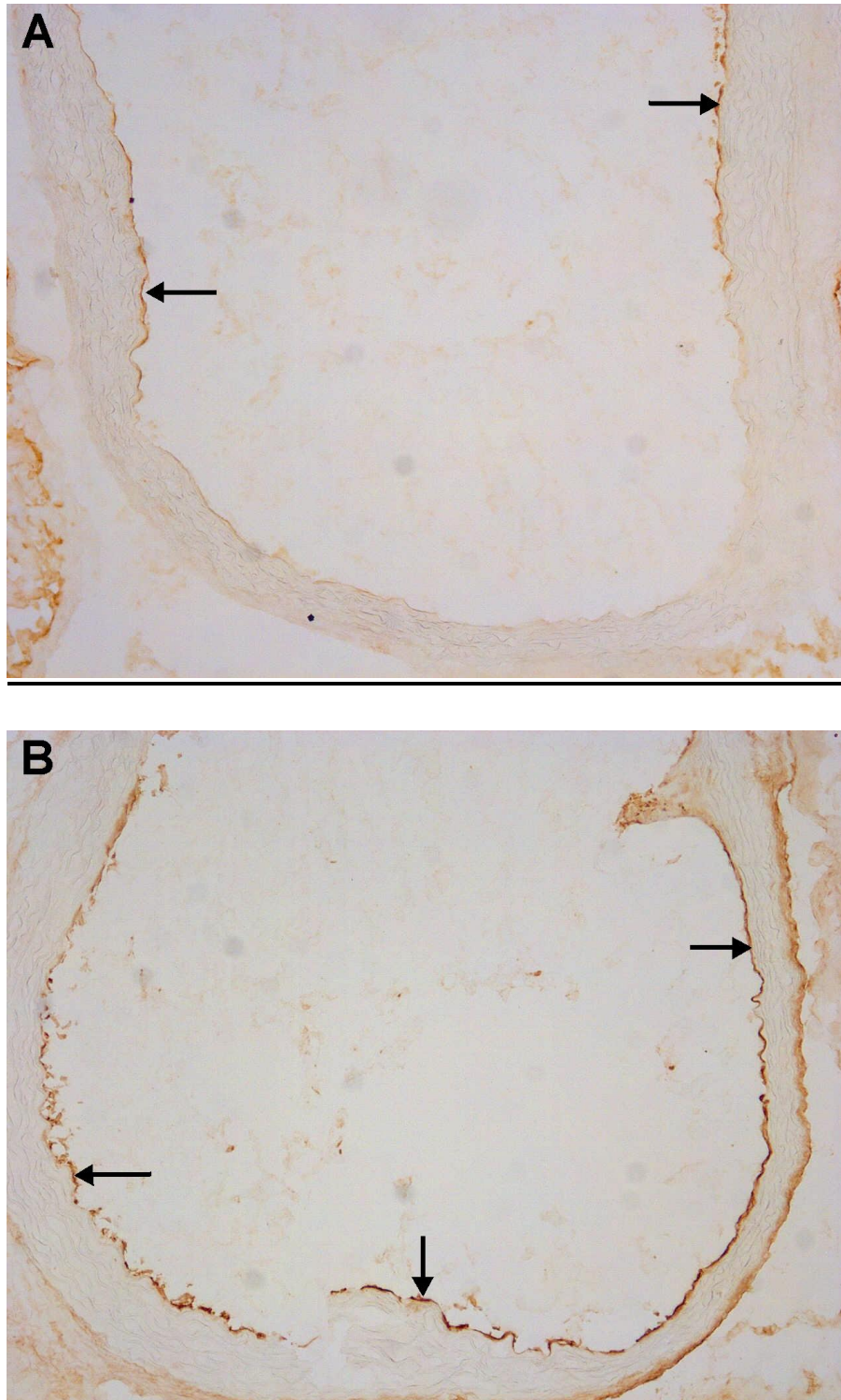
Expresí VCAM-1 byla pozorována převážně v endotelu aorty u obou skupin zvířat. (viz obr. 1) Pouze velmi slabá exprese byla nalezena v kapilárách okolního myokardu. Podávání atorvastatinu neovlivnilo intenzitu barvení VCAM-1. (viz. obr. 1).

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

Obrázek 2. Expresi VCAM-1 v endotelu aortálního sinu u neléčené skupiny zvířat (A) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B). Expresi je pozorována pouze v endoteliálních buňkách (viz šipky). Z obrázku je patrné, že podávání atorvastatinu neovlivnilo expresi VCAM-1 ve srovnání s neléčenou skupinou. Zvětšení 100x.



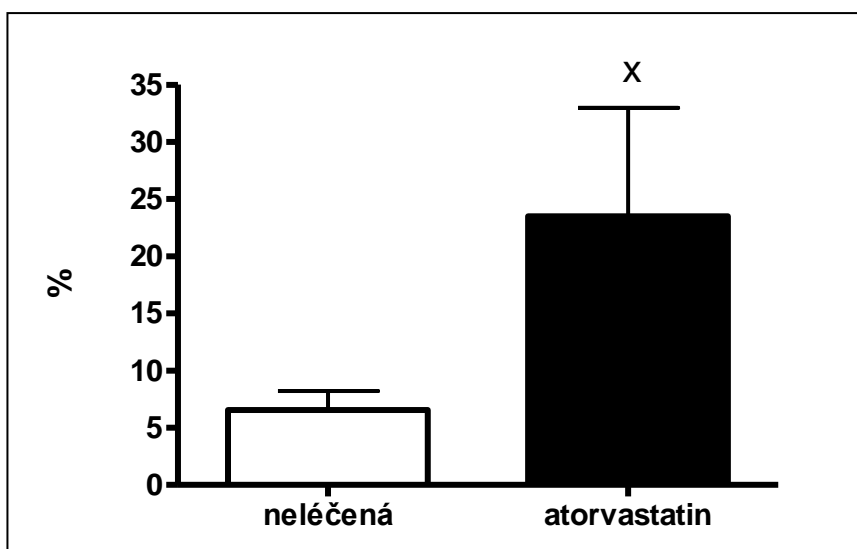
Obrázek 3. Exprese endoglinu v endotelu aortálního sinu u neléčené skupiny zvířat (A) a skupiny, které byl podáván atorvastatin (B). Endoteliální exprese endoglinu se výrazně zvýšila po podávání atorvastatinu (B). Zvětšení 100x.



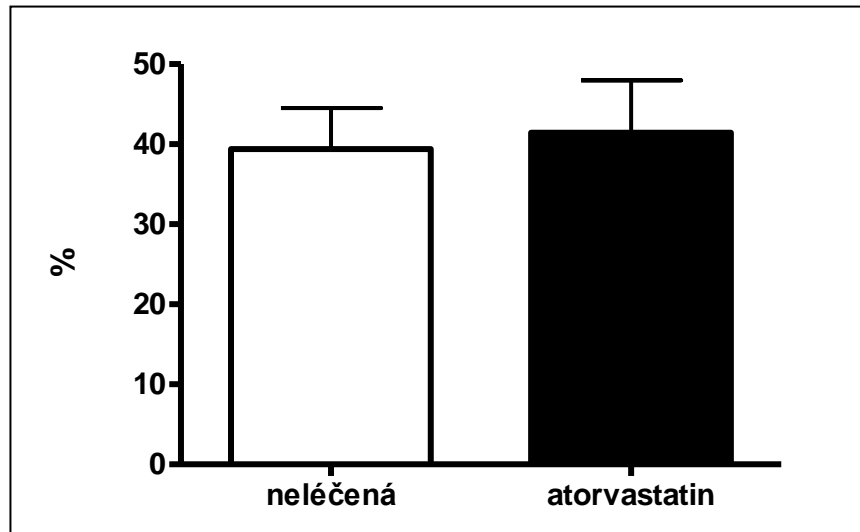
5.3 Stereologická analýza exprese endoglinu u ApoE deficientních myší

Stereologická analýza imunohistochemického barvení endoglinu prokázala signifikantní zvýšení jeho exprese po 8 týdnech podávání atorvastatinu ve srovnání s neléčenou skupinou ($6,6 \pm 1,5$ vs. $23,5 \pm 9,5$ %, $P=0,021$) (obr.4). Dále jsme prokázali, že stereologická analýza exprese VCAM-1 neprokázala žádný vliv podávání atorvastatinu na endoteliální expresi VCAM-1 ($39,4 \pm 5,1$ vs. $41,4 \pm 6,6$ %, $P=0,959$) v porovnání s neléčenými myšmi. (obr.5).

Obrázek 4. Procento aktivovaných endoteliálních buněk pro VCAM-1 v aortálním sinu a oblouku. Exprese endoglinu se signifikantně zvýšila po 8 týdnech podávání atorvastatinu ($+P=0,021$).



Obrázek 5. Procento aktivovaných endoteliálních buněk pro VCAM-1 v aortálním sinu a oblouku. Exprese VCAM-1 nebyla podáváním atorvastatinu ovlivněna ($P=0,818$).



6. DISKUSE

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

CD 105 endoglin je homodimerický transmembránový protein o 180 kDA. Je součástí receptorového komplexu TGF- β . (Raab et al 1999) Exprese endoglinu převládá na endoteliálních buňkách, makrofázích, fibroblastech a hladkých svalových buňkách medie (Obreo et al 2004)

Kromě toho bylo demonstrováno, že exprese endoglinu je zvýšena během angiogeneze a při vývoji nádorového onemocnění. Mimoto byla exprese endoglinu zvýšena v hladkosvalových buňkách a endoteliálních buňkách v pokročilých aterosklerotických lézích v prasečích karotidách. (Behr-Roussel et al 2000)

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

Adhezní molekula VCAM-1 je považována za marker endoteliální dysfunkce a to jak v časných, tak i pokročilejších stádiích aterogeneze. Její exprese se zvyšuje při hypercholesterolémii a je zásadní pro vstup makrofágů a lymfocytů do cévní intimy, čímž se výrazně podílí na progresi aterosklerotických změn (Liuba et al 2003)

Statiny kompetitivně inhibují HMG-CoA reductázu, enzym, který katalyzuje biosyntézu cholesterolu. Kromě toho současné experimentální a klinické důkazy naznačují, že další účinky nezávislé na cholesterolu (pleiotropní), zahrnují zlepšení a obnovu endoteliálních funkcí, zvýšení stability aterosklerotického plátu, snížení oxidativního stresu a zánětu, útlum trombogenních reakcí ve stěně cév. (LaRosa 2001)

ApoE deficitní myš je v současnosti velmi používaný zvířecí model pro studium aterosklerózy, přičemž tento model vykazuje určité podobnosti s hyperlipoproteinémií typu III. u člověka. Mimoto bylo prokázáno, že podávání statinů a tohoto modelu nevede k očekávanému hypolipidemickému účinku a tudíž

je možné tento model považovat za vhodný ke studiu pleiotropních účinků statinů. (Sparrow et al 2001) Na druhou stranu ale někteří autoři prokázali opačný vliv podávání statinů u tohoto modelu aterosklerózy. Wang et al a Bea et al prokázali hyperlipidemický účinek simvastatinu, který byl navíc doprovázen progresí aterogenních změn u těchto myší (Bea et al 2002; Wang et al 2002).

V souladu s těmito výsledky jsme zjistili hyperlipidemický efekt atorvastatinu i v naší práci. Důvodem tohoto hypercholesterolemického efektu je pravděpodobně syntéza VLDL lipoproteinů v játrech, které jsou extrémně bohaté na cholesterol a to pouze po podávání statinů (Fu & Borensztajn 2006). Navíc bylo prokázáno, že tento hyperlipidemický efekt atorvastatinu způsobil signifikantní navýšení exprese endoglinu. Další výsledky na katedře Biologických a lékařských věd však ukazují, že exprese endoglinu může být snížena u apoE myší, pokud statiny neovlivňují hladiny lipidů (Černý, Diplomová práce 2006, nepublikované výsledky). Navíc práce na dalších myších modelech prokázaly, že exprese endoglinu klesá zároveň se snižováním hladiny cholesterolu (Metelková, Diplomová práce 2006). Z toho lze tedy vyvozovat, že exprese endoglinu je ovlivňována hladinou cholesterolu v krvi. Navíc lze říci, že podávání atorvastatinu mění jeho expresi jak díky jeho pleiotropním účinkům, tak díky hypolipidemickým účinkům. Jak již bylo naznačeno dříve, endoglin je schopen modulovat účinky významného cytokinu TGF- β . Bylo například prokázáno, že endoglin antagonizuje inhibiční účinky TGF- β na endotelové buňky, což pak má za následek rozvoj angiogeneze. (Li et al 2000) Vzhledem k tomu, že TGF- β působí protizánětlivě, inhibuje činnost makrofágů a T lymfocytů a snižuje expresi adhezních molekul (Mallat et al 2001), lze předpokládat, že zvýšená exprese endoglinu by mohla tyto účinky inhibovat a přispívat tak k rozvoji aterogenních změn. Tudíž snížení exprese endoglinu po podávání statinů by mohlo představovat další z možných mechanismů, jak statiny mohou ovlivňovat aterogenní proces. Tuto hypotézu bude však nutno ještě ověřit v dalších experimentech.

V předcházející práci bylo prokázáno, že čtyřtýdenní podávání atorvastatinu nesnížilo hladiny lipidů apoE^{-/-} myší a navíc vedlo k signifikantnímu snížení exprese VCAM-1 ve stěně cévy (Nachtigal et al 2004). V této práci ale nebyla exprese VCAM-1 podáváním statinů ovlivněna, což lze přičíst právě hypercholesterolemickému efektu atorvastatinu po jeho osmitýdenním podávání.

Z výše uvedených výsledků tedy vyplývá, že hypercholesterolemický efekt atorvastatinu vedl k potlačení jeho pozitivních účinků ve stěně cévy, které byly pozorovány v předcházejících studiích.

7. ZÁVĚR

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

Naše studie prokázala, že osmitýdenní podávání atorvastatinu zvyšuje hladinu celkového cholesterolu u apoE deficientního myšního modelu aterosklerózy.

Expres obou studovaných markerů endoglinu a VCAM-1 byla detekována u všech skupin zvířat v endotelu aortálního sinu a aortálního oblouku, dále též v kapilárách a malých cévách myokardu.

Osmitýdenní podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu zvýšení endoteliální exprese endoglinu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Naopak endoteliální exprese VCAM-1 nebyla podáváním atorvastatinu ovlivněna.

Výsledky této práce tedy poukazují na negativní vliv překvapivého hypercholesterolemického efektu atorvastatinu na markery jako endoglin a VCAM-1 ve stěně cévy u apoE deficientního myšního modelu aterosklerózy.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Afzal, M. N., Saeed, S. A., Shah, B. H. (1999) Atherosclerosis and plaque rupture: an update. *J Pak Med Assoc.* **49**: 37-43
- Andrejak, M., Gras, V., Massy, Z. A., Caron, J. (2003) [Adverse effects of statins]. *Therapie.* **58**: 77-83
- Arnaud, C., Mach, F. (2005) Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **98**: 661-666
- Badimon, J. J., Lettino, M., Toschi, V., Fuster, V., Berrozpe, M., Chesebro, J. H., Badimon, L. (1999) Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation.* **99**: 1780-1787
- Bea, F., Blessing, E., Bennett, B., Levitz, M., Wallace, E. P., Rosenfeld, M. E. (2002) Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**: 1832-1837
- Behr-Roussel, D., Rupin, A., Simonet, S., Bonhomme, E., Coumilleau, S., Cordi, A., Serkiz, B., Fabiani, J. N., Verbeuren, T. J. (2000) Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* **102**: 1033-1038
- Blankenberg, S., Barbaux, S., Tiret, L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **170**: 191-203
- Bobryshev, Y. V., Cherian, S. M., Inder, S. J., Lord, R. S. (1999) Neovascular expression of VE-cadherin in human atherosclerotic arteries and its relation to intimal inflammation. *Cardiovasc Res.* **43**: 1003-1017
- Bourdeau, A., Dumont, D. J., Letarte, M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* **104**: 1343-1351
- Boyle, J. J. (2005) Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol.* **3**: 63-68
- Cannon, R. O., 3rd (1998) Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* **44**: 1809-1819

- Coniglio, R. I., Colombo, O., Vasquez, L., Salgueiro, A. M., Otero, J. C., Malaspina, M. M. (1997) [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. *Medicina (B Aires)*. **57**: 21-28
- Daubresse, J. C. (2000) [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux*. **21**: A359-362
- Davignon, J., Mabile, L. (2001) [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)*. **62**: 101-112
- Duriez, P. (2003) [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie*. **58**: 5-14
- Fishman, A. P. (1982) Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci*. **401**: 1-8
- Foldes, J., Banos, C., Winkler, G. (2004) [Subclinical hypothyroidism and arteriosclerosis]. *Orv Hetil*. **145**: 1601-1607
- Fu, T., Borensztajn, J. (2006) Simvastatin causes the formation of cholesterol-rich remnants in mice lacking apoE. *Biochem Biophys Res Commun*. **341**: 1172-1176
- Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendia, A., Perez-Alvarez, M. J., Langa, C., Lopez, L. A., Fabra, A., Garcia-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M., Bernabeu, C. (1999) Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. **78**: 614-623
- Gundersen, H. J., Bendtsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B., Vesterby, A., et al. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. **96**: 379-394
- Hackman, A., Abe, Y., Insull, W., Jr., Pownall, H., Smith, L., Dunn, K., Gotto, A. M., Jr., Ballantyne, C. M. (1996) Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation*. **93**: 1334-1338
- Handzha, I. M. (2001) [Viral infection, atherosclerosis, and ischemic heart disease]. *Lik Sprava*. 65-67
- Hofker, M. H., van Vlijmen, B. J., Havekes, L. M. (1998) Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **137**: 1-11
- Chan, N. N., Vallance, P., Colhoun, H. M. (2003) Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional

- risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**: 1048-1054
- Cheng, T. O. (2005) Obesity, like atherosclerosis, starts early in life. *Bmj.* **331**: 1145
- Chepelenko, G. V. (2003) [Pathogenesis of atherosclerosis in patients with lipid metabolism disturbances: hypothesis on cholesterol utilization and atheromatous plaque formation]. *Angiol Sosud Khir.* **9**: 20-25
- Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., Li, H., DiChiara, M., Medoff, B. D., Cybulsky, M. I. (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res.* **85**: 199-207
- Jang, Y., Lincoff, A. M., Plow, E. F., Topol, E. J. (1994) Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **24**: 1591-1601
- Joseph-Silverstein, J., Silverstein, R. L. (1998) Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest.* **16**: 176-182
- Konstantopoulos, K., McIntire, L. V. (1997) Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest.* **100**: S19-23
- Kornacewicz-Jach, Z. (2003) [Early diagnosis of atherosclerosis in clinical practice. Who, when and how should be examined]. *Kardiol Pol.* **58**: 227-231
- LaRosa, J. C. (2001) Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. *Am J Cardiol.* **88**: 291-293
- Laurila, A., Bloigu, A., Nayha, S., Hassi, J., Leinonen, M., Saikku, P. (1997) Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**: 2910-2913
- Li, C., Hampson, I. N., Hampson, L., Kumar, P., Bernabeu, C., Kumar, S. (2000) CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J.* **14**: 55-64
- Liuba, P., Pesonen, E., Paakkari, I., Batra, S., Andersen, L., Forslid, A., Yla-Herttuala, S., Persson, K., Wadstrom, T., Wang, X., Laurini, R. (2003) Co-infection with Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori results in vascular endothelial dysfunction and enhanced VCAM-1 expression in apoE-knockout mice. *J Vasc Res.* **40**: 115-122
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., Fradelizi, D., Tedgui, A. (2001) Inhibition of transforming growth factor-

- beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* **89**: 930-934
- Mareckova, Z., Heller, S., Horky, K. (1999) [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek.* **45**: 46-50
- Mizia-Stec, K., Zahorska-Markiewicz, B., Goliszek, L. (2003) [Adhesion molecules: atherosclerosis and coronary artery disease]. *Przegl Lek.* **60**: 147-150
- Moiseeva, E. P. (2001) Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res.* **52**: 372-386
- Muntner, P., He, J., Astor, B. C., Folsom, A. R., Coresh, J. (2005) Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 529-538
- Nachtigal, P., Semecky, V., Kopecky, M., Gojova, A., Solichova, D., Zdansky, P., Zadak, Z. (2004) Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract.* **200**: 219-229
- Obreo, J., Diez-Marques, L., Lamas, S., Duwell, A., Eleno, N., Bernabeu, C., Pandiella, A., Lopez-Novoa, J. M., Rodriguez-Barbero, A. (2004) Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem.* **14**: 301-310
- Raab, U., Lastres, P., Arevalo, M. A., Lopez-Novoa, J. M., Cabanas, C., de la Rosa, E. J., Bernabeu, C. (1999) Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Lett.* **459**: 249-254
- Schwartz, S. M. (1997) Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest.* **100**: S87-89
- Sparrow, C. P., Burton, C. A., Hernandez, M., Mundt, S., Hassing, H., Patel, S., Rosa, R., Hermanowski-Vosatka, A., Wang, P. R., Zhang, D., Peterson, L., Detmers, P. A., Chao, Y. S., Wright, S. D. (2001) Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21**: 115-121
- Stancu, C., Sima, A. (2001) Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* **5**: 378-387
- Stehbens, W. E. (2002) Relevance of hypercholesterolemia to fetal and pediatric atherosclerosis. *Pediatr Pathol Mol Med.* **21**: 259-278

- Thorngate, F. E., Strockbine, P. A., Erickson, S. K., Williams, D. L. (2002) Altered adrenal gland cholesterol metabolism in the apoE-deficient mouse. *J Lipid Res.* **43**: 1920-1926
- Tian, J., Pei, H., James, J. C., Li, Y., Matsumoto, A. H., Helm, G. A., Shi, W. (2005) Circulating adhesion molecules in apoE-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun.* **329**: 1102-1107
- Vanhoutte, P. M. (1997) [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **90 Spec No 6**: 9-19
- Vaughan, C. J., Murphy, M. B., Buckley, B. M. (1996) Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet.* **348**: 1079-1082
- Vestweber, D., Blanks, J. E. (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* **79**: 181-213
- Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. (2006) Morphological characteristics of coronary atherosclerosis in diabetes mellitus. *Can J Cardiol.* **22 Suppl B**: 81B-84B
- Vlassara, H., Fuh, H., Donnelly, T., Cybulsky, M. (1995) Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med.* **1**: 447-456
- Wang, Y. X., Martin-McNulty, B., Huw, L. Y., da Cunha, V., Post, J., Hinchman, J., Vergona, R., Sullivan, M. E., Dole, W., Kauser, K. (2002) Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the presence of apolipoprotein E. *Atherosclerosis.* **162**: 23-31
- Wierzbicki, A. S., Poston, R., Ferro, A. (2003) The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther.* **99**: 95-112
- Williams, K. J., Tabas, I. (1998) The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol.* **9**: 471-474
- Worthley, S. G., Helft, G., Zaman, A. G., Fuster, V., Badimon, J. J. (2000) Atherosclerosis and the vulnerable plaque--pathogenesis: Part I. *Aust N Z J Med.* **30**: 600-607
- Zieske, A. W., McMahan, C. A., McGill, H. C., Jr., Homma, S., Takei, H., Malcom, G. T., Tracy, R. E., Strong, J. P. (2005) Smoking is associated with advanced coronary atherosclerosis in youth. *Atherosclerosis.* **180**: 87-92