

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**Membránový endoglin a jeho úloha v patogeneze endotelovej
dysfunkcie v podmienkach *in vitro***

Dizertačná práca

Mgr. Matej Vicen

Školiteľ dizertačnej práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Pod'akovanie

Rád by som poďakoval prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za pomoc, rady a odborné vedenie počas celého doktorandského štúdia. Tiež by som chcel poďakovať všetkým spolupracovníkom z Katedry biologických a lekárskeých vied a Centra de Investigaciones Biológicas.

Tiež ďakujem za finančnú podporu EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) spolufinancované ERDF, GAUK 1216217, AZV CR 17-31754A a SVV 260 549.

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne pod vedením školiteľa. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Mgr. Matej Vicen

V Hradci Králové dňa

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Mgr. Matej Vicen

Školitel': prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Názov dizertačnej práce: Membránový endoglin a jeho úloha v patogeneze endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro*

Membránový endoglin (Eng) je transmembránový glykoproteín, ktorý plní úlohu ako pomocný receptor v signalizačnej kaskáde transformujúceho rastového faktoru β (TGF β). V posledných rokoch bola jeho expresia a funkcia intenzívne študovaná hlavne vo vzťahu k funkcii endotelu za rôznych patologických podmienok, vrátane hypercholesterolémie a aterogenézy, avšak jeho úloha v rozvoji endotelovej dysfunkcie zostáva kontroverzná. Eng prispieva k tvorbe oxidu dusnatého (NO) a je nenahraditeľný v podmienkach *in vivo* pre vývoj krvného riečiska a srdca. Na druhej strane môže zohrávať dôležitú úlohu v zápalovej infiltrácii leukocytov a adhézií trombocytov na endotel, a tým prispievať k rozvoju endotelovej dysfunkcie ako prvej fázy v rozvoji aterosklerózy.

Pre štúdium krátkodobých účinkov látok a liekov na endotel sa využívajú endotelové bunky izolované z rôznych ciev. Jedným z efektov sledovaných na bunkových kultúrach zložených z endotelových buniek je schopnosť látky navodiť stav endotelovej dysfunkcie. Endotelová dysfunkcia je v podmienkach *in vitro* definovaná ako stav so zvýšenou expresiou adhézných molekúl a zvýšenou adhéziou a transmigráciou buniek imunitného systému cez endotelovú vrstvu.

V tejto dizertačnej práci sme sa zamerali na štúdium efektov solubilného endoglínu (sEng), oxidovaných cholesterolov a vybraných sekretov makrofágov na cievny endotel. Hlavný dôraz bol kladený na sledovanie expresie membránového endoglínu (Eng), expresie jednotlivých členov jeho signalizačnej kaskády a expresie prozápalových biomarkerov endotelovej dysfunkcie vo vzťahu k rozvoju endotelovej dysfunkcie *in vitro*.

V prvej štúdií sme sa zamerali na úlohu sEng v procese rozvoja endotelovej dysfunkcie. Ľudské endotelové bunky z umbilikálnej cievy (HUVEC) boli vystavené pôsobeniu sEng v dávke 40 alebo 500 ng/mL po dobu 16 hodín. Zaznamenali sme nielen

indukciu zápalovej odpovede vo forme zvýšenej aktivity nukleárneho faktoru kappa B (NF- κ B) a interleukínu-6 (IL-6), ale aj zvýšenie syntézy membránového endoglínu, čo naznačuje prozápalové účinky solubilného endoglínu a významnú úlohu membránového Eng v skorých fázach rozvoja endotelovej dysfunkcie.

V nasledujúcej štúdií sme sa zamerali na úlohu Eng v rozvoji endotelovej dysfunkcie indukovanej oxidovaným cholesterolom. V tomto prípade sme použili ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC) premedikované rôznymi oxidovanými cholesterolmi (oxysterolmi). Z použitých oxysterolov bol schopný vyvolať endotelovú dysfunkciu iba 7-ketocholesterol (7K). 7K bol schopný zvýšiť expresiu adhézných molekúl a Eng ako aj zvýšiť adhéziu a transmigráciu monocytov cez endotelovú vrstvu. Zníženie expresie Eng prostredníctvom génového utlmenia malo za následok zníženie adhézie a transmigrácie monocytov cez membránu. Výsledky tejto štúdie zdôrazňujú zásadný význam Eng v rozvoji endotelovej dysfunkcie *in vitro*.

Na záver sme sa rozhodli zamerať na efekt zníženého množstva Eng na povrchu endotelových buniek na ich funkciu. HUVEC bunky boli inkubované v médiu obsahujúcom makrofágmi nasyntetizovanú matrixovú metaloproteinázu 12 (MMP12). MMP12 bola schopná odštepovať Eng z povrchu buniek, čo malo za následok rozvoj endotelovej dysfunkcie charakterizovaný zníženou schopnosťou buniek tvoriť cievy a zaceľovať poranenia v podmienkach *in vitro*.

Výsledky tejto dizertačnej práce teda potvrdzujú význam fyziologickej expresie membránového endoglínu endotelovými bunkami a poukazujú na to, že zásadné zmeny v expresii Eng môžu viesť k rozvoju patologických zmien v cievnom endoteli.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: M. Sc. Matej Vicen

Supervisor: Prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Membrane endoglin and its role in pathogenesis of endothelial dysfunction *in vitro*

Membrane endoglin (Eng) is a transmembrane glycoprotein that acts as a co-receptor in the transforming growth factor β (TGF β) signalling cascade. Its expression and function have been extensively studied predominantly in relation to endothelial function under various pathological conditions, including hypercholesterolemia and atherogenesis. However, its role in the development of endothelial dysfunction remains controversial. Eng contributes to the formation of nitric oxide (NO) and is crucial in *in vivo* conditions for the development of the cardiovascular system and especially the heart. On the other hand, it may play an important role in inflammatory adhesion and transmigration of leukocytes to the endothelium, thus contributing to the development of endothelial dysfunction as the first stage of atherogenesis.

Experiments on endothelial cells isolated from various blood vessels are used to study short-term effects of substances and drugs on the endothelium. One of the effects studied in endothelial cell cultures is the ability of the substance to induce endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction is defined in *in vitro* conditions as a state with increased expression of adhesion molecules and increased adhesion and transmigration of immune cells through the endothelial monolayer.

The aim of this dissertation thesis is to investigate the effects of soluble endoglin (sEng), oxidized cholesterol, and selected macrophage secretes on the vascular endothelium. The main focus is on monitoring the membrane endoglin (Eng) expression and the expression of individual members of its signalling cascade and the expression of pro-inflammatory biomarkers of endothelial dysfunction in relation to the development of endothelial dysfunction *in vitro*.

Firstly, we investigated the role of sEng in the process of endothelial dysfunction development. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with two different doses of sEng (40 or 500 ng / mL) for 16 hours. We demonstrated the induction of inflammatory response by increased activity of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and interleukin-6 (IL-6) and an increase in membrane endoglin expression. This suggests to pro-inflammatory effects of soluble endoglin and a significant role of membrane Eng in the early stages of endothelial dysfunction development.

Subsequently, we focused on the role of Eng in the development of oxidized cholesterol-induced endothelial dysfunction. In this case, we used human aortic endothelial cells (HAEC) pretreated with various oxidized cholesterols (oxysterols). Preliminary experiments showed that only 7-ketocholesterol (7K) was able to induce endothelial dysfunction. 7K was able to increase the expression of adhesion molecules and Eng as well as increase adhesion and transmigration of monocytes through the endothelial monolayer. The decrease in Eng expression through gene silencing resulted in decreased adhesion and transmigration of monocytes across the monolayer. The results of this study emphasize the crucial role of Eng in the development of endothelial dysfunction under *in vitro* conditions.

Finally, we focused on the effect of reduced Eng on the surface of endothelial cells. HUVECs were incubated in medium containing macrophage-derived matrix metalloproteinase 12 (MMP12). MMP12 was able to cleave Eng from the cell surface, resulting in the development of endothelial dysfunction characterized by the reduced ability of cells to form vessels and heal wounds under *in vitro* conditions.

The results of this dissertation thesis confirm the importance of physiological expression of membrane endoglin by endothelial cells and suggest that altered Eng expression may lead to the development of pathological changes in the vascular endothelium.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

4 β OH	4 β -hydroxycholesterol
7 α OH	7 α -hydroxycholesterol
7 β OH	7 β -hydroxycholesterol
7K	7-ketocholesterol
22OH	22-hydroxycholesterol
24OH	24-hydroxycholesterol
25OH	25-hydroxycholesterol
27OH	27-hydroxycholesterol
ABCA1	adenozíntrifosfát viažuci kazetový transportér A1
ABCG1	adenozíntrifosfát viažuci kazetový transportér G1
Akt	proteínkináza B
BH4	tetrahydrobiopterín
CD	2-hydroxypropyl- β -cyklodextrín
cGMP	cyklický guanozín monofosfát
CYP450	cytochróm P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid
DM	diabetes mellitus
EGF	epidermálny rastový faktor
EPOX	cholesterol 5,6 epoxid
Eng	membránový endoglin
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
GC	guanylátcykláza
GM-CSF	faktor stimulujúci kolónie granulocytov a monocytov

GTP	guanozín tri fosfát
HAEC	ľudské aortálne endotelové bunky
HHT	hereditárna hemoragická teleangiektázia
HIF-1	hypoxiou indukovaný faktor 1
HMEC-1	imortalizované ľudské mikrovaskulárne endotelové bunky
HMVEC	ľudské mikrovaskulárne endotelové bunky
HUVEC	ľudské endotelové bunky z umbilikálnej cievy
ICAM	medzibunková adhézna molekula
Ig	imunoglobulín
IgSF	imunoglobulínová génová superrodina
I κ B	inhibičné κ B proteíny
IL	interleukín
iNOS	inducibilná syntáza oxidu dusnatého
J774A.1	myšia monocytová bunková línia
KLF6	faktor ako Krüppel 6
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou
L-Eng	dlhá forma membránového endoglínu
LFA-1	ligand pre s lymfocytovou funkciou spojený antigén 1
LXR	pečeňový X receptor
Mac-1	makrofágový antigén 1
MCP-1	monocytový chemoatrakčný proteín 1
M-CSF	faktor stimulujúci kolónie monocytov
MMP	membránová matrixová metaloproteáza
MMP-408	inhibitor MMP12

NADPH	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NF- κ B	nukleárny faktor kappa B
nNOS	neurónová syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NR1H3	nukleárny receptor podrodina 1 skupina H člen 3
OxLDL	oxidovaný lipoproteín s nízkou hustotou
PAI-1	inhibitor plazminogénového aktivátora 1
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PECAM	doštičková endotelová adhézna molekula
PHA-408	8-(5-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)isonicotinamido)-1-(4-fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-benzo[g]indazole-3-carboxamid
PI3K	fosfatidilinozitol 3 kináza
PKC α	proteínkináza α
PTP1B	proteín tyrozín fosfatáza 1B
Rac1	substrát botulínového typu súvisiaci s Ras
Ras	rodina malých GTPáz
RELA	nukleárny faktor kappa B fosforylovaný na uhlíku 65
PSGL-1	P-selektínový glykoproteínový ligand 1
RORs	s kyselinou retínovou spojené orphan receptory
sEng	solubilná forma endoglínu
S-Eng	krátka forma membránového endoglínu
SHP-1	proteín tyrozín fosfatáza 2
SRC	nereceptorová tyrozínkináza
SV40	simian vírus 40
TGF β	transformujúci rastový faktor β

TNF- α	tumor nekrotizujúci faktor α
TR	transmembránová časť
TSP-1	trombospondín 1
uPA	urokinázový typ plazminogénového aktivátora
THP-1	ľudská monocytová bunková línia
VCAM	cievna adhézna molekula
VE-kadherín	cievny endotelový kadherín
VEGF	cievny endotelový rastový faktor
VEGFR2	receptor pre cievny rastový faktor 2
VLA-4	veľmi neskorý antigén 4
vWF	von Willebrandov faktor
ZP	zóna pellucida

Obsah

1. Úvod	14
2. Teoretická časť	15
2.1. Fyziologická funkcia endotelovej vrstvy	15
2.2. Endotelová dysfunkcia	15
2.3. Membránový endoglin	18
2.4. Solubilný endoglin	21
2.5. Adhézne molekuly.....	24
2.5.1. Selektíny.....	24
2.5.2. ICAM-1,2,3	25
2.5.3. VCAM-1.....	26
2.5.4. PECAM-1	26
2.6. Oxysteroly	27
2.6.1. Oxysteroly enzymatického pôvodu	28
2.6.2. Oxysteroly neenzymatického pôvodu	29
2.7. Bunkové kultúry	30
2.7.1. Význam bunkových kultúr pre výskum endotelovej dysfunkcie	30
2.7.2. HUVEC	31
2.7.3. HAEC	32
2.7.4. HMVEC	33
2.7.5. Primárne monocyty a makrofágy	33
2.7.6. THP-1	35
2.8. Membránový endoglin v procese aterogenézy	36
2.9. Transkripčné faktory regulujúce expresiu membránového endoglinu	37
2.9.1. KLF6	37
2.9.2. NF- κ B.....	38
2.9.3. LXR.....	39

2.10.	Liečivá ovplyvňujúce expresiu membránového endoglínu.....	39
2.10.1.	Atorvastatín.....	39
2.10.2.	Carotuximab.....	40
2.10.3.	PHA-408.....	40
2.10.4.	2-hydroxypropyl- β -cyklodextrín.....	41
3.	Ciele práce.....	43
4.	Komentáre k prácam zahrnutým v dizertačnej práci.....	44
4.1.	MMP12, Secreted by Pro- Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells.....	44
4.2.	Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	46
4.3.	Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- κ b and IL-6 in cultured human endothelial cells.....	48
5.	Súhrnná diskusia.....	49
6.	Závery.....	53
7.	Prehľad publikačnej činnosti.....	55
8.	Prezentácie na konferenciách.....	56
9.	Použitá literatúra.....	58
10.	Podiel predkladateľa na publikovaných prácach zahrnutých v dizertačnej práci.	79
11.	Súbor publikovaných prác.....	81

1. Úvod

Membránový endoglin (Eng) plní úlohu ako pomocný receptor v signalizačnej kaskáde transformujúceho rastového faktoru β (TGF β). V posledných rokoch bola jeho expresia a funkcia intenzívne študovaná hlavne vo vzťahu k funkcii endotelu za rôznych patologických podmienok vrátane hypercholesterolémie a aterogenézy, avšak jeho úloha v rozvoji endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro* zostáva kontroverzná.

Cholesterol plní v ľudskom organizme nenahraditeľné funkcie a život bez neho nie je možný. Je súčasťou bunkových membrán, v ktorých plní stabilizačnú funkciu. Pri nízkych teplotách zvyšuje fluiditu membrány a pri vysokých ju naopak znižuje. Taktiež sa vyskytuje v myelínových puzdrách nervov a napomáha zefektívneniu prenosu signálov. Vo forme žlčových kyselín je nevyhnutný na vstrebávanie tukov a v tukoch rozpustných vitamínov. Z cholesterolu sú taktiež produkované steroidné hormóny, a teda napomáha udržiavaniu homeostázy a fyziologickému fungovaniu organizmu. Avšak patologicky zvýšená hladina cholesterolu môže mať na organizmus nepriaznivé účinky.

Hypercholesterolémia je jednou z najčastejších foriem dyslipidemií. Samotné zvýšenie hladín cholesterolu prenášaného v rámci štruktúry lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) v krvi nie je považované za ochorenie, avšak ide o významný rizikový faktor pre rozvoj ochorení, ako sú ateroskleróza či ischemická choroba srdca. Zvýšené hladiny cholesterolu a oxysterolov postupne poškodzujú endotel ciev a narušujú jeho funkciu. Endotel stráca svoje antikoaguačné a antiagregačné vlastnosti a dochádza ku vzniku endotelovej dysfunkcie. Práve rozvoj endotelovej dysfunkcie je prvým krokom pre rozvoj aterosklerózy a v konečnom dôsledku môže vyústiť do život ohrozujúcich stavov, ako sú infarkt myokardu a náhla cievna mozgová príhoda.

Táto dizertačná práca sumarizuje výsledky a závery štúdií, ktoré boli vypracované na Katedre biologických a lekárskejších vied Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy pod vedením prof. PharmDr. Petra Nachtigala, Ph.D. a Centra de Investigaciones Biológicas v Madride pod vedením prof. Carmela Bernabeu, Ph.D. v rámci dlhodobej spolupráce vo výskume endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro*.

2. Teoretická časť

2.1. Fyziologická funkcia endotelovej vrstvy

Endotel je tvorený jednou vrstvou endotelových buniek, ktoré nasadajú na bazálnu membránu a oddeľujú cirkulujúcu krv od okolitého tkaniva. Nachádza sa na vnútornej strane všetkých ciev od aorty až po krvné vlásoknice a zohráva nenahraditeľnú úlohu v regulácii cievnej homeostázy (1).

Endotelová vrstva má zásadnú úlohu v regulácii filtrácie tekutín v obličkách, riadení napätia cievnej steny, kontrole hemostázy a prestupe buniek cez cievnu stenu (2). Na povrchu endotelových buniek sa nachádza množstvo receptorov pre cirkulujúce proteíny, lipid-transportujúce častice, metabolity, hormóny ako aj junkčné proteíny pre medzibunkovú interakciu (3).

Kontrola cievneho tonusu endotelovej steny spočíva v súhre vazodilatačných a vazokonstričných mediátorov (4). Medzi látky, ktoré zabezpečujú vazodilatáciu, patrí endotelom produkovaný oxid dusnatý (NO), prostacyklín a endotelový hyperpolarizačný faktor (5, 6). Endotelové bunky produkujú aj vazokonstričné látky ako endotelín, tromboxán A₂ a angiotenzín II (7).

Ďalšou dôležitou schopnosťou endotelu je schopnosť zacelenia po poškodení. V prípade straty endotelovej vrstvy dochádza k zmnoženiu susedných endotelových buniek, ich migrácii a zaceleniu poškodenia. Okrem schopnosti opravy sú endotelové bunky schopné tvoriť aj nové cievy. Pri nedostatku kyslíka v tkanive bunky produkujú hypoxiou indukovaný faktor 1 (HIF-1), ktorý stimuluje expresiu cievneho endotelového rastového faktora (VEGF) a membránového endoglínu (Eng), čo sú faktory podporujúce tvorbu nových ciev. Endotelové bunky produkujú proteázy schopné rozložiť bazálnu membránu materskej cievy, migrujú smerom k hypoxickému signálu, proliferujú a vytvárajú nové cievy za účelom zabrániť hypoxii tkaniva a zabezpečiť dostatočný prísun živín a kyslíka pre všetky bunky (8, 9).

2.2. Endotelová dysfunkcia

Endotelová dysfunkcia je stav charakterizovaný narušenou funkciou endotelovej vrstvy. Dochádza k premene endotelového fenotypu na prozápalový, protrombotický

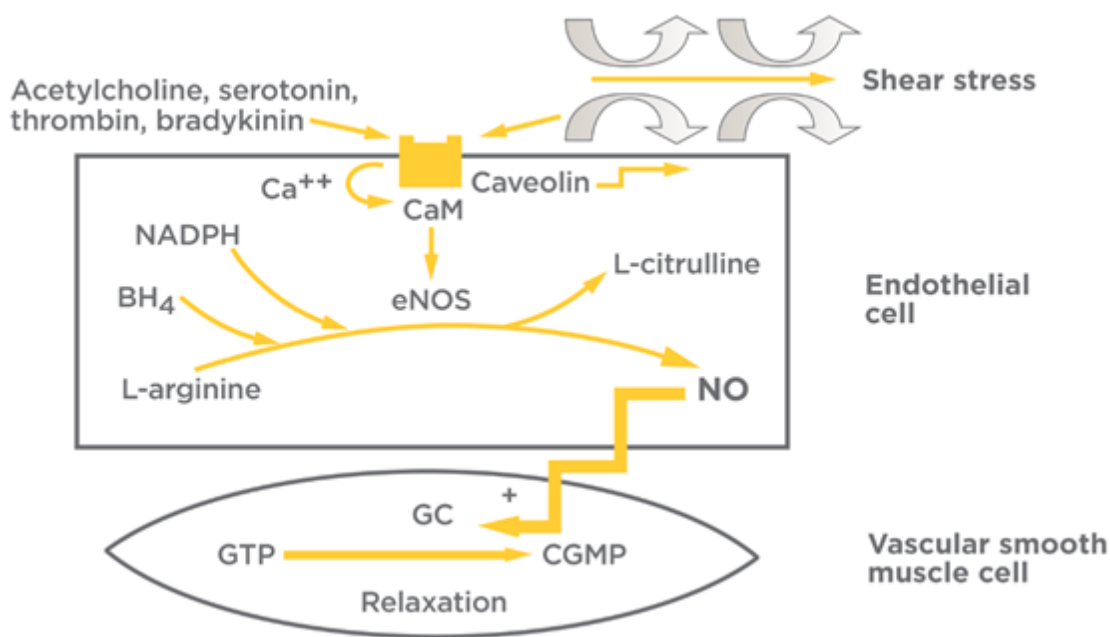
a vazokonstričný. Zvyšuje sa adhézia krvných elementov na endotel, a taktiež sa zvyšuje jeho permeabilita (10).

Rozvoj endotelovej dysfunkcie je spojený s veľkým množstvom kardiovaskulárnych ochorení ako napr. ateroskleróza, hypertenzia, chronické srdcové zlyhávanie, periférna cievna choroba, diabetes mellitus či chronické zlyhávanie obličiek (11).

V podmienkach *in vivo* sa endotelová dysfunkcia prejavuje primárne prostredníctvom narušenej endotel dependentnej vazodilatácie. Dochádza k poruche syntézy NO prostredníctvom endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS) a k zníženiu senzitivity cievy na NO (12).

Za fyziologických podmienok je NO syntetizované prostredníctvom neuronálnej, inducibilnej alebo endotelovej NOS (nNOS, iNOS, eNOS). nNOS je exprimované prostredníctvom neurónov a reguluje uvoľňovanie katecholamínov v srdci. iNOS zohráva najvýznamnejšiu úlohu v makrofágoch, kde reguluje skorú imunitnú odpoveď. eNOS je typická pre endotelové bunky a zohráva nenahraditeľnú úlohu v endotel-dependentnej relaxácii ciev. Všetky formy NOS syntetizujú NO z L-arginínu (13).

Po aktivácii endotelových buniek prostredníctvom stresorov ako sú acetylcholín, serotonin, trombín, bradykinín či prietokové napätie dochádza k odstráneniu inhibítora kaveolínu z kalmodulínu a aktivácii eNOS. Pomocou kofaktorov tetrahydrobiopterínu (BH₄), kyseliny nikotínovej a nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátu (NADPH) je aktivovaná eNOS schopná produkovať NO. NO difunduje do hladkej svaloviny, kde aktivuje guanylátcyklázu (GC) a zvýši hladiny cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP), čo vyúsťuje do relaxácie hladkej svaloviny ciev a vazodilatácie (Obr. 1.) (14).



Obr. 1. Produkcia NO prostredníctvom eNOS. Aktivované endotelové bunky produkujú NO z L-arginínu za pomoci rady kofaktorov. Z endotelových buniek NO prestupuje do buniek hladkej svaloviny ciev, kde zabezpečuje relaxáciu hladkosvalových buniek (14).

Pri zníženej dostupnosti NO dochádza k poruche endotel dependentnej vazodilatácie. Znížená dostupnosť NO môže byť spôsobená zníženou expresiou eNOS, zníženou enzymatickou aktivitou eNOS, zníženou dostupnosťou L-arginínu, zníženou senzitivitou buniek na NO či zvýšenou degradáciou NO a kofaktorov, potrebných na jeho syntézu (15).

V podmienkach *in vitro* je endotelová dysfunkcia primárne charakterizovaná zvýšenou expresiou adhézných molekúl a zvýšenou mierou adhézie a transmigrácie monocytov cez endotelovú vrstvu (6). Po naviazaní prozápalových molekúl ako sú bakteriálne endotoxíny, oxidovaný lipoproteín s nízkou hustotou (OxLDL), prozápalové cytokíny (interleukín 1 (IL-1), tumor nekrotizujúci faktor α (TNF- α) či interferón γ) dochádza k dramatickej zmene fenotypu endotelových buniek. Nastáva aktivácia pleiotropných transkripčných faktorov ako napr. nukleárny faktor kappa B (NF- κ B). Aktivácia NF- κ B indukuje transkripciu adhézných molekúl na povrchu endotelových buniek a sekretovaných chemokínov, ako monocytový chemoatrakčný proteín 1 (MCP-1) či fraktalkín. Bunky imunitného systému reagujú na zvýšenú koncentráciu MCP-1,

fraktalkínu a ďalších chemokínov v okolí aktivovaných endotelových buniek a dochádza k ich akumulácií v tomto prostredí. Nasleduje interakcia ligandov na povrchu buniek imunitného systému so selektínmi na povrchu endotelových buniek. Táto interakcia je typická pre fázu rolovania buniek po povrchu cievného endotelu. K spomaleniu rolovania dochádza vďaka spojeniu ligandov na povrchu buniek imunitného systému a endotelovej cievnnej adhézne molekuly 1 (VCAM-1) (16, 17). Následné plazenie buniek po povrchu endotelových buniek je zabezpečené prostredníctvom interakcie s medzibunkovou adhéznou molekulou 1 a 2 (ICAM-1 a ICAM-2). O prestup buniek cez endotel sa stará hlavne doštičková adhézna molekula 1 (PECAM-1) (18).

Prozápalové molekuly taktiež zvýšia tvorbu protrombotických mediátorov ako von Willebrandov faktor (vWF) či inhibítor plazminogénového aktivátora 1 (PAI-1). Toto vyúsťuje v zmenu lokálneho prostredia pri endoteli, prestup buniek imunitného systému cez endotel a ich hromadenie v subendoteliálnom priestore (19).

2.3. Membránový endoglin

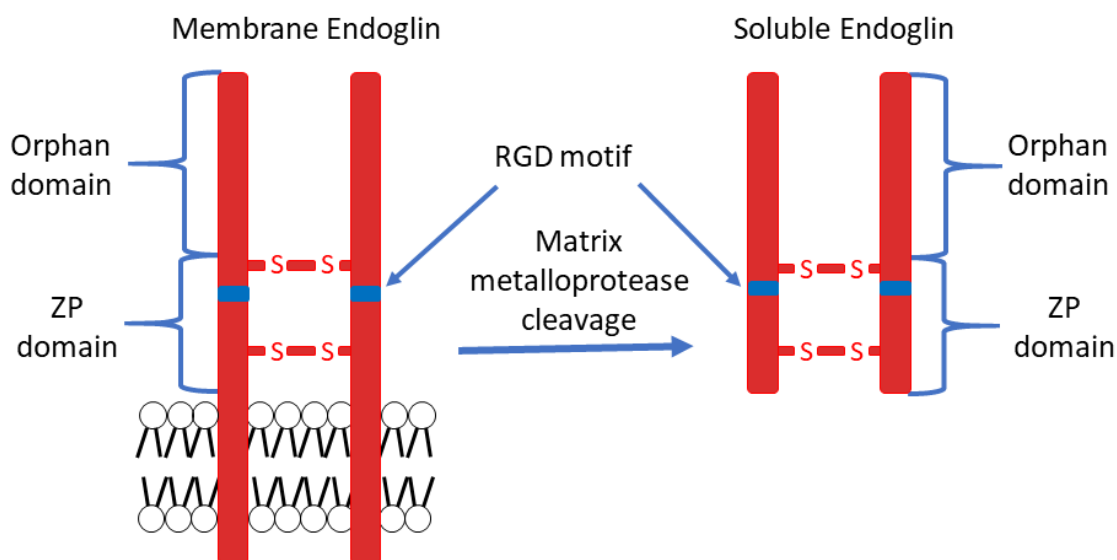
Membránový endoglin (CD105, TGF- β receptor III, Eng) je transmembránový homodimérny glykoproteín tvorený dvomi 95kDa podjednotkami spojenými disulfidickou väzbou (20, 21). V štruktúre membránového endoglinu sa dá rozoznať extracelulárna časť, hydrofóbná vnútromembránová časť a krátky cytoplazmatický región. Extracelulárna časť endoglinu pozostáva z orphan domény (časti, ktorá nevykazuje podobnosť so žiadnymi inými proteínovými rodinami) a zóny pellucidy (ZP). Časť ZP domény nazývaná RGD motív, je dôležitá pre väzbu s integrínmi a inými RGD receptormi (22, 23). ZP je taktiež dôležitá pre interakciu medzi endoglinom a TGF β receptormi I a II (24).

Expresia Eng je obmedzená predovšetkým na endotelové bunky. Je spájaná s vývojom kardiovaskulárneho systému, vývojom cievného riečiska, angiogenezou a cievnou homeostázou (25). Okrem endotelových buniek bola expresia membránového endoglinu detegovaná u aktivovaných monocytov, makrofágov, fibroblastov a buniek hladkej svaloviny (26).

Endoglin je nevyhnutný pre funkciu a stabilizáciu endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS), čo naznačuje dôležitú úlohu Eng v správnej funkcii endotelu a

regulácií cievneho napätia (27, 28). Na druhej strane štúdie *in vitro* preukazujú úlohu membránového endoglínu v procese zápalovej infiltrácie leukocytov a adhézie trombocytov na cievnu stenu (29, 30).

Syntéza Eng je regulovaná prostredníctvom rôznych transkripčných faktorov ako napr.: faktor ako Krüppel 6 (KLF6) (31), nukleárny faktor kappa B fosforylovaný na uhlíku 65 (RELA (p65 NF- κ B)) – HIF-1 (9, 32) a nukleárny receptor podrodina 1 skupina H člen 3 (NR1H3 (pečeňový X receptor (LXR))) (33). Prostredníctvom matrixových metaloproteáz (MMP14 (34), MMP12 (35)) dochádza k odštiepeniu membránovej formy endoglínu a k vzniku jeho solubilnej formy (sEng) (Obr. 2.).



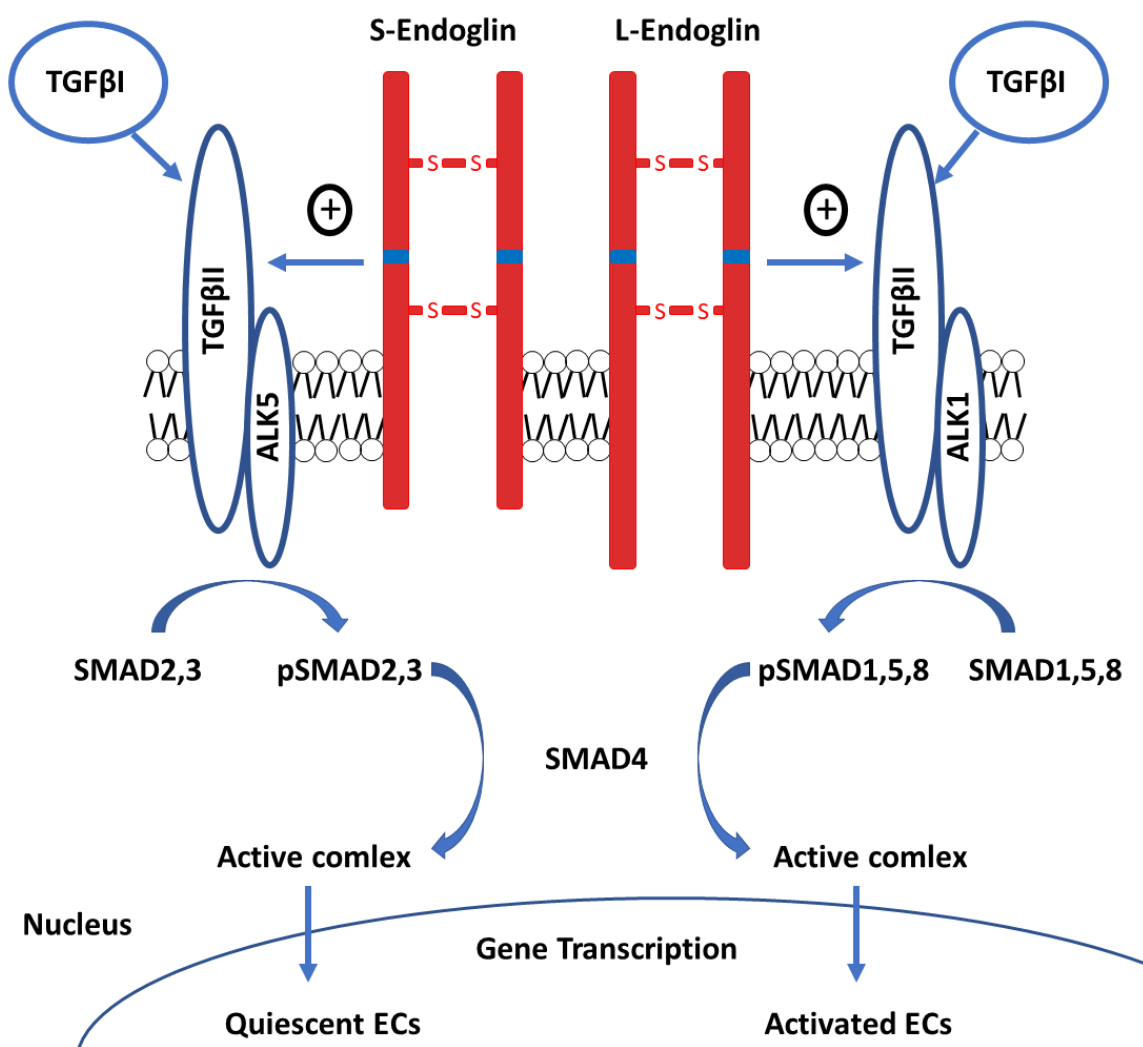
Obr. 2. Schematické znázornenie štruktúry membránového endoglínu (Eng) a jeho solubilnej formy (sEng). sEng vzniká odštiepením extracelulárnej domény Eng prostredníctvom matrixových metaloproteáz (na základe (25)).

Doteraz boli identifikované dve základné izoformy membránového endoglínu (36). Líšia sa v množstve aminokyselín v ich cytoplazmatickej časti molekuly, úrovni fosforylácie a afinite k receptorom (Obr.3.) (37).

Na povrchu endotelových buniek prevažuje dlhá forma endoglínu (L-Eng). L-Eng obsahuje vo svojej cytoplazmatickej časti 47 aminokyselín a je dôležitý pre stimuláciu migrácie, proliferácie a angiogenézy prostredníctvom signalizačnej cesty Eng/ALK1/SMAD1/5/8 v endotelových bunkách. Krátka forma endoglínu (S-Eng) je

zastúpená na povrchu endotelových buniek v menšej miere. Jej cytoplazmatická časť obsahuje 14 aminokyselín. S-Eng pravdepodobne inhibuje migráciu a proliferáciu endotelových buniek a indukuje ich senescenciu prostredníctvom Eng/ALK5/SMAD2/3 signalizačnej kaskády. Presná úloha S-Eng na endoteli stále nebola úplne objasnená (36, 38).

Keďže sa na povrchu endotelových buniek nachádza významne viac L-Eng v porovnaní s S-Eng budeme v celej práci používať označenie Eng pre L-Eng.



Obr. 3. Úloha rôznych izoform Eng v endotelových bunkách. S-Eng má afinitu k TGFβII/ALK5 komplexu, kde indukuje SMAD2/3 fosforyláciu. Fosforylovaný SMAD2/3 (pSMAD2/3) sa viaže na mediátor SMAD4 a vytvára aktívny komplex ktorý prestupuje do

jadra a indukuje transkripciu génov spojených s pokojovým fenotypom endotelových buniek. Na druhej strane L-Eng má afinitu k TGFβII/ALK1 komplexu, kde indukuje SMAD1/5/8 fosforyláciu. Po naviazaní fosforylovaného SMAD1/5/8 (pSMAD1/5/8) s SMAD4 vzniká aktívny komplex, ktorý sa translokuje do jadra bunky a indukuje transkripciu génov spojených s aktivovaným fenotypom endotelových buniek (na základe (25)).

2.4. Solubilný endoglin

Solubilný endoglin je produkt vznikajúci štiepením membránového endoglinu prostredníctvom MMP. MMP sú na zinku závislé endopeptidázy s rôznymi a často protichodnými účinkami. Sú schopné štiepiť veľké množstvo cieľov, ako napr. Eng, chemokíny, cytokíny či adhézne molekuly. Delia sa na základe štruktúry do 4 hlavných skupín: gelatinázy (MMP2, MMP9), matrilysinázy (MMP7, MMP26), archetypické MMP (MMP1, MMP8, MMP13, MMP3, MMP10, MMP12, MMP19, MMP20, MMP27) a furínom aktivované MMP (MMP11, MMP21, MMP28, MMP14, MMP15, MMP16, MMP24, MMP17, MMP25, MMP23) (39).

V súčasnosti bolo dokázané iba dvom MMP, že sú schopné štiepiť Eng. Ide o MMP12 (35) a MMP14 (40). Zaujímavé je, že o obidvoch týchto MMP je známe, že sa podieľajú na rozvoji rôznych vaskulárnych ochorení ako je napr. ateroskleróza. Zvýšená expresia týchto MMP bola nájdená v ľudských aterosklerotických plátoch (41) a penových bunkách izolovaných z králikov kŕmených cholesterolom (42, 43). Taktiež indukcia proaterogénnymi cytokínmi a rastovými faktormi viedla k zvýšeniu expresie týchto MMP, čo poukazuje na možnú úlohu MMP12 (44) a MMP14 (45) v rozvoji aterosklerózy.

MMP14 je kolagenáza membránového typu, ktorá je exprimovaná prevažne v endotelových bunkách. Bola dokázaná jej schopnosť štiepiť Eng z povrchu rôznych buniek vrátane endotelových (34). Presné miesto, v ktorom táto MMP odštiepuje Eng je G-L väzba na pozícií 586-587. MMP12 je makrofágová metalloelastáza produkovaná prozápalovými makrofágmi (35). Môžeme preto skonštatovať, že MMP12 zohráva najvýznamnejšiu úlohu v odštiepaní Eng za podmienok, keď prebieha zápalový proces

a makrofágy majú prozápalovú polarizáciu, zatiaľ čo MMP14 zohráva najvýznamnejšiu úlohu v prípade, že aktivované makrofágy nie sú prítomné.

Je dobre známe, že sEng môže byť použitý ako biomarker rôznych ochorení kardiovaskulárneho systému, avšak v posledných rokoch pribúdajú štúdie, ktoré poukazujú na to, že sám môže zohrávať významnú úlohu pri vzniku a rozvoji kardiovaskulárnych ochorení.

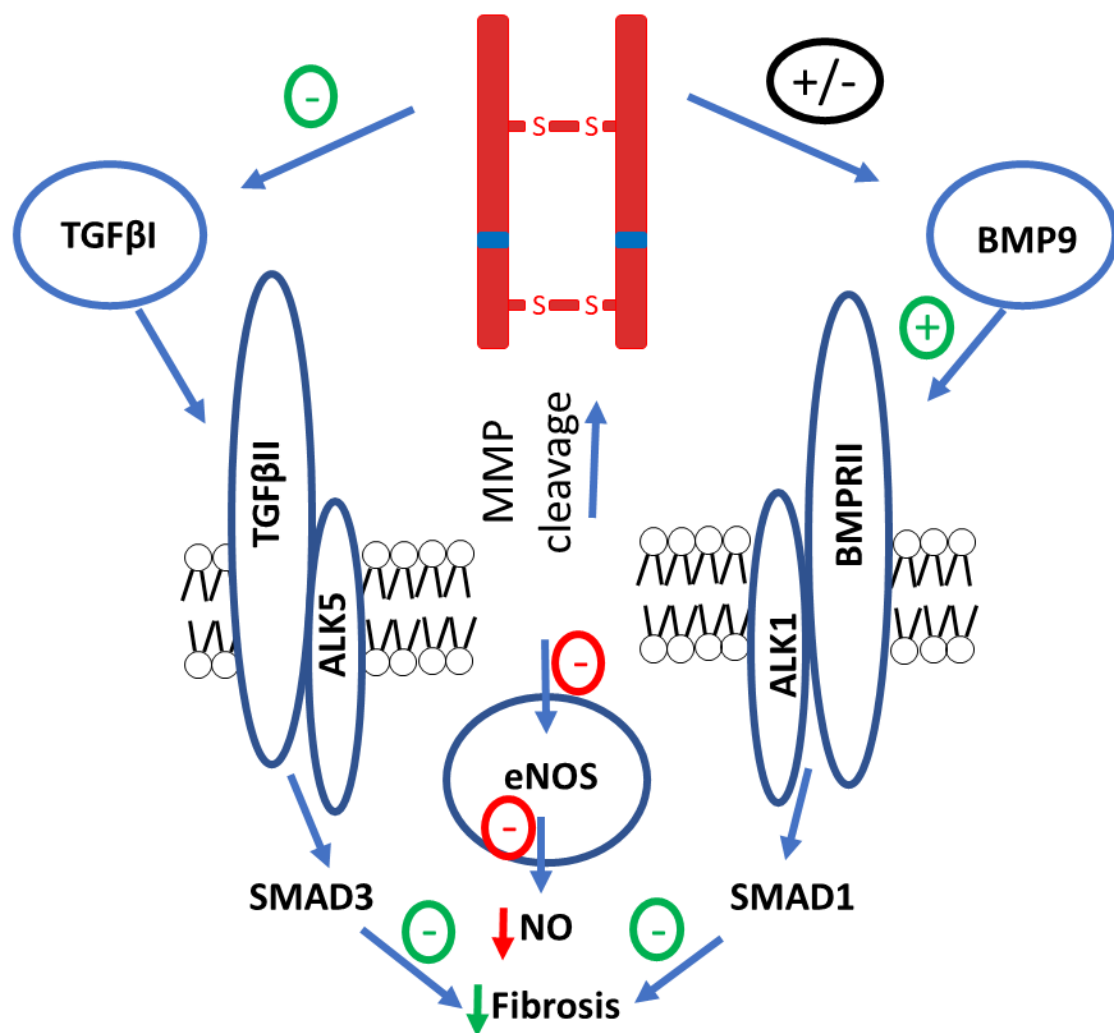
Zvýšené hladiny sEng boli zaznamenané u pacientov s hypercholesterolémiou (46) a familiárnu hypercholesterolémiou (47), ako aj v experimentálnom myšom modeli aterosklerózy s hypercholesterolémiou ešte pred formuláciou viditeľných prejavov aterosklerózy v aorte, ako aj počas formulácie pokročilých prejavov (48-50). Hladina sEng korelovala s hladinou cholesterolu v krvnej plazme (51), ako aj s veľkosťou aterosklerotických plakov (48, 49). Taktiež bola dokázaná asociácia hladín sEng a rizika rozvoja aterosklerózy u ľudí (52, 53).

Hladiny sEng boli zvýšené nielen pri hypercholesterolémií ale aj pri hyperglykémii. Plazmatická koncentrácia sEng bola zvýšená u pacientov trpiacich diabetom mellitom (DM) a pozitívne korelovala so závažnosťou diabetických vaskulárnych komplikácií, ako je retinopatia (54), diabetická periférna neuropatia (55) a nefropatia (56, 57). Zvýšenie hladín sEng je spojené so znížením hladín NO u pacientov trpiacich DM (57, 58).

Avšak sEng nie je iba markerom, ktorého zvýšené hladiny boli pozorované pri viacerých ochoreniach. Venkatesha s kolektívom ako prví dokázali, že sEng zohráva dôležitú úlohu v rozvoji hypertenzie, proteinúrie či HELLP syndrómu (hemolýza, zvýšené pečeňové enzýmy a znížené množstvo krvných doštičiek). Na experimenty použili sEng vyprodukovaný v placentе tehotných preeklamptických žien, ktorý bol schopný v podmienkach *in vitro* inhibovať tvorbu kapilár a v podmienkach *in vivo* zvyšovať priepustnosť endotelu a zhoršovať hypertenziu u potkanieho modelu preeklampsie (59). Zvýšené hladiny sEng mali taktiež za následok zvýšenú expresiu adhézných molekúl, aktiváciu NF- κ B a produkciu solubilných foriem E-selektínu, VCAM-1 a IL6, čo naznačuje pro-zápalové pôsobenie sEng (60, 61).

Tieto výsledky naznačujú, že zvýšené koncentrácie sEng sú negatívnym prognostickým znakom pre pacientov trpiacich ochoreniami kardiovaskulárneho systému. Avšak nie vždy má sEng iba negatívny efekt na prognózu ochorenia, hlavne v prípade, že sú vysoké hladiny sEng jediným prítomným rizikovým faktorom. Kapur

s kolektívom dokázali prostredníctvom injekcie sEng zabrániť rozvoju srdcovej fibrózy a znížiť množstvo kolagénu syntetizovaného v ľudských srdcových fibroblastoch (Obr. 4) (62).



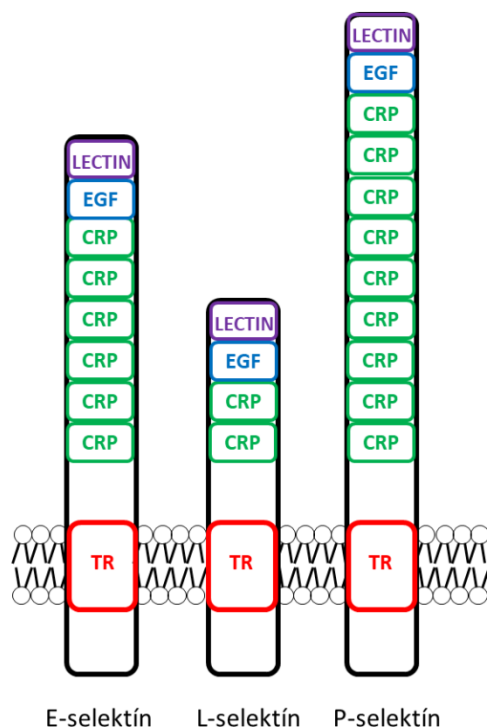
Obr. 4. Úloha sEng v rozvoji srdcovej fibrózy (na základe (62-64)). sEng je schopný utlmiť TGFβ/ALK5/SMAD3 profibrotickú cestu a neovplyvňuje BMP9/ALK1/SMAD1 antifibrotickú cestu. Odštiepenie Eng prostredníctvom MMP v konečnom dôsledku vedie k zníženej produkcii kolagénu, zmierneniu srdcovej fibrózy a zníženej produkcii NO.

2.5. Adhézne molekuly

Adhézne molekuly sa rozdeľujú do 5 základných skupín: integríny, selektíny, imunoglobulíny, kadheríny a ostatné (65). V úvodných fázach adhézie monocytov na endotelovú vrstvu zohrávajú dôležitú úlohu selektíny. V pokročilých fázach adhézie a počas transmigrácie buniek zohrávajú dôležitejšiu úlohu glykoproteíny patriace do imunoglobulínovej rodiny – medzibunkové adhézne molekuly (ICAM 1,2,3), cievna bunková adhézna molekula 1 (VCAM-1) a doštičková endoteliálna bunková adhézna molekula 1 (PECAM-1) (66).

2.5.1. Selektíny

Selektíny sú rodina troch blízko príbuzných glykoproteínov. Patria sem P-, E- a L-selektín (Obr. 5.), avšak iba P- a E-selektín sú exprimované endotelovými bunkami. P-selektín je v pokojovom stave skladovaný vo vnútri endotelových buniek vo Wiebel-Paladových telieskach a po aktivácii bunky dochádza k rýchlej exocytóze teliesok a prezentácii molekúl selektínu leukocytom (67). Na rozdiel od P-selektínu, E-selektín nie je v bunke skladovaný a po stimulácii endotelových buniek sa musí nasyntetizovať *de novo* (68). Selektíny sú nevyhnutné pre počiatočné fázy prestupu leukocytov (rolovanie) z krvného riečiska (69).



Obr. 5. Schematické znázornenie štruktúry selektínov na membráne. Selektíny obsahujú lektínovú časť, časť podobnú epidermálnemu rastovému faktoru (EGF), rozdielne množstvo CRP častí, transmembránovú časť (TR) a intracelulárnu časť (na základe (70)).

2.5.2. ICAM-1,2,3

Medzibunkové adhézne molekuly (ICAM-1,2,3) patria spoločne s vaskulárnou bunkovou adhéznou molekulou 1 (VCAM-1) a doštičkovou endotelovou bunkovou adhéznou molekulou 1 (PECAM-1) do imunoglobulínovej génovej superrodiny (IgSF) (Obr. 6.) (70). ICAM-1 je exprimovaný na leukocytoch, endotelových bunkách, doštičkách fibroblastoch, epiteliálnych bunkách a ďalších typoch buniek. Jeho expresia v jednotlivých miestach cievneho riečiska sa významne líši (71). Zvýšená expresia ICAM-1 na endoteliálnych bunkách predstavuje dôležitý prejav zápalu. Je významným ligandom pre s lymfocytovou funkciou spojený antigén 1 (LFA-1) a makrofágový antigén 1 (Mac-1), ktoré sú lokalizované na povrchu leukocytov (72), avšak dokáže viazať aj fibrinogén, hyaluronan či plasmodium falciparum. ICAM-1 je dôležitý pre adhéziu a transmigráciu leukocytov cez endotel počas rôznych zápalových ochorení (73). Po naviazaní antigénu na ICAM-1 endoteliálnych buniek dochádza k aktivácií nереceptorovej tyrozínkinázy Src cez proteín tyrozín fosfatázu SHP-2. Následne je aktivovaná fosfatidylinozitol 3 kináza (PI3K), proteínkináza B (Akt) a eNOS. Toto vedie

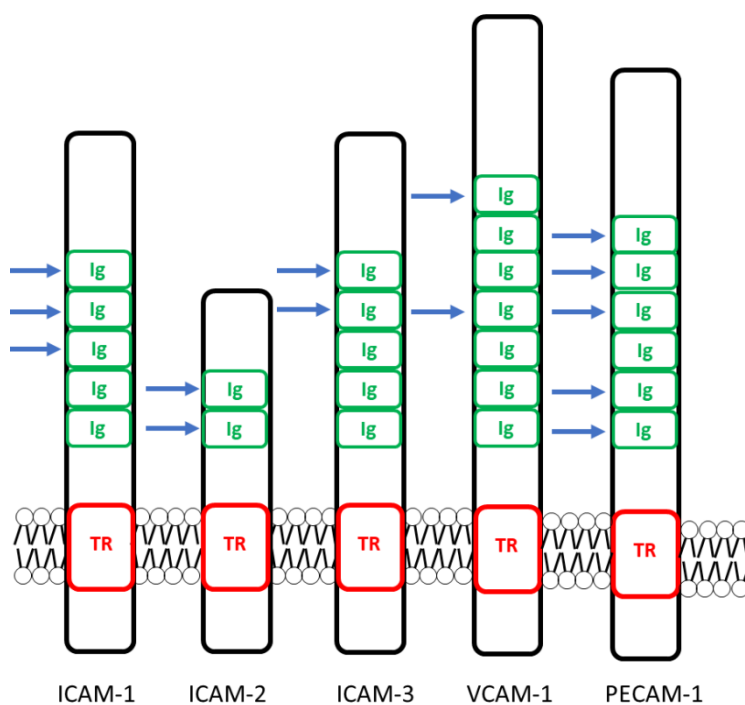
k zvýšenému viazaniu PECAM-1 a transendoteliálnej migrácii buniek imunitného systému (74). ICAM-1 môže byť odštepovaný z bunkovej membrány a jeho zvýšené plazmatické hladiny sa dajú detegovať pri množstve zápalových ochorení (75). ICAM-2 predstavuje skrátenu formu ICAM-1 a je exprimovaný prevažne na endotelových bunkách. Jeho expresia nie je zvýšená v aktivovaných endotelových bunkách ani po stimulácií cytokínmi (76, 77). Rovnako ako ICAM-1 aj ICAM-3 zohráva dôležitú úlohu v procesoch adhézie a transmigrácie. ICAM-3 sa vyznačuje zásadne odlišnou expresiou. Je exprimovaný leukocytmi v pokojovom stave- monocytmi, lymfocytmi, neutrofilmi a antigén-prezentujúcimi bunkami (78).

2.5.3. VCAM-1

Na rozdiel od ICAM-1 je množstvo VCAM-1 na povrchu nestimulovaných endotelových buniek zanedbateľné. VCAM-1 (CD106) je 90kDa glykoproteín exprimovaný predovšetkým endotelovými bunkami. Jeho expresia môže byť stimulovaná napr. prozápalovými cytokínmi (vrátane TNF α), OxLDL, vysokou koncentráciou glukózy, agonistami toll-like receptorov a prietokovým napätím. Zohráva dôležitú úlohu v procese rolovania, adhézie a transmigrácie leukocytov z krvného obehu. Jeho väzobným miestom na leukocytoch je veľmi neskorý antigén 4 (VLA-4, integrín α 4 β 1) (79, 80). Po naviazaní ligandu na VCAM-1 dochádza k aktivácií vápnikových tokov a substrátu botulínového typu 1 súvisiaceho s Ras (Rac1). To vyvolá aktiváciu nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát (NADPH) oxidázy 2 a produkciu reaktívnych foriem kyslíka. Nasleduje aktivácia proteín kinázy C α (PKC α) a proteín tyrozín fosfatázy 1B (PTP1B). Celý proces vedie k oslabeniu medzibunkových väzieb medzi endotelovými bunkami a transmigrácií buniek imunitného systému (79).

2.5.4. PECAM-1

PECAM-1 je člen imunoglobulínovej génovej superrodiny so 6-timi extracelulárnymi Ig podjednotkami a molekulovou hmotnosťou 130 kDa. Nachádza na povrchu krvných doštičiek, monocytov, neutrofilov a vo veľkých množstvách v medzibunkových spojeniach endotelových buniek (81). Zohráva dôležitú úlohu v procese adhézie buniek na endotel, angiogenéze, trombóze a odpovedi na prietokové napätie, ale jeho najdôležitejšia úloha je v regulácií medzibunkového prestupu leukocytov cez endotelovú vrstvu (82).



Obr. 6. Schematické znázornenie štruktúry adhézných molekúl patriacich do imunoglobulínovej génovej superrodiny na membráne spolu so znázornením ich väzobných miest (šípky) a počtu imunoglobulínových podjednotiek (Ig) (na základe (70)).

2.6. Oxysteroly

Oxysteroly sú deriváty cholesterolu, ktoré vznikajú jeho oxidáciou. Majú 2-rádovo vyššiu reaktivitu ako samotný cholesterol a na rozdiel od cholesterolu sú vďaka prídavnému kyslíku schopné prestupovať lipofilné membrány (83). Sú schopné modifikovať bunkový metabolizmus, vnútrobunkovú signalizáciu, diferenciáciu, transkripciu génov, zápalovú imunitnú odpoveď, transport sterolov a môžu mať cytotoxické a pro-apoptické účinky (84). Podľa spôsobu vzniku sa rozdeľujú na oxysteroly neenzymatického a enzymatického pôvodu (85). V mnohých štúdiách *in vivo* bolo dokázané, že oxysteroly prijaté stravou zohrávajú dôležitú úlohu v procese rozvoja aterosklerózy (86-88). Na štúdium efektov oxysterolov prijatých stravou v podmienkach *in vivo* boli použité LDL receptor deficientné myši a Apo E deficientné myši kŕmené prostredníctvom klasickej stravy, ku ktorej bolo pridané 1 % cholesterolu v kontrolnej skupine a 0,95 % cholesterolu a 0,05 % oxysterolov v experimentálnej skupine. Po 7 mesiacoch (LDL receptor deficientné myši) alebo 4 mesiacoch (Apo E deficientné myši) boli vyhodnotené koncentrácie oxidovaných cholesterolov v sére myši a plocha tukových

pruhov v aorte. V prípade oboch myších kmeňov nastalo signifikantné zvýšenie koncentrácie 7-ketocholesterolu a α -epoxycholesterolu u myši kŕmených stravou obsahujúcou oxidované cholesteroly. Taktiež plocha tukových prúžkov bola v skupine myši kŕmených oxidovaným cholesterolom rozsiahlejšia (87). Nasledujúca štúdia bola zameraná na schopnosť oxidovaných cholesterolov prestupovať zo stravy do krvného riečiska. Bolo dokázané, že oxysteroly prijaté prostredníctvom stravy sú schopné prestupovať do cirkulácie zdravého človeka a hladina oxysterolov v plazme je zvýšená po dobu 72 hodín od ich prijatia stravou. Výsledky tejto štúdie poukazujú na významnú úlohu oxysterolov neenzymatického pôvodu v procese rozvoja endotelovej dysfunkcie ako prvého kroku v rozvoji aterosklerózy (86). Review z roku 2017 pekne zhrnula štúdie zamerané na proaterosklerotické pôsobenie oxysterolov a jej autori dospeli k názoru, že oxysteroly môžu byť jedným z faktorov, ktoré akcelerujú rast aterosklerotických lézií (88).

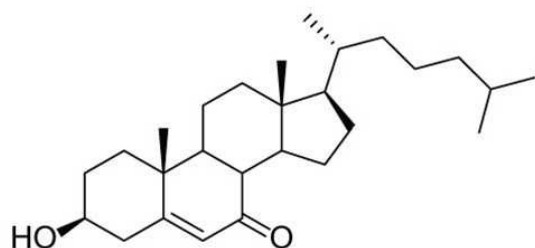
2.6.1. Oxysteroly enzymatického pôvodu

Oxysteroly enzymatického pôvodu vznikajú intracelulárne prostredníctvom enzymatických modifikácií cholesterolu v rámci buniek a zohrávajú nezastupiteľnú úlohu v intracelulárnom metabolizme lipidov. Ide o významných endogénnych agonistov pečňových X receptorov (LXR) (89, 90). Najdôležitejšie oxysteroly sú syntetizované v mitochondriách a endoplazmatickom retikule buniek prostredníctvom cholesterolových hydroxylácií patriacich do rodiny cytochrómu P450. Do tejto skupiny oxysterolov sa zaraďujú napr. 7 α -hydroxycholesterol (7 α OH), 4 β -hydroxycholesterol (4 β OH) 27-hydroxycholesterol (27OH), 25-hydroxycholesterol (25OH), 24-hydroxycholesterol (24OH) alebo jeden z najsilnejších známych endogénnych agonistov LXR - 22-hydroxycholesterol (22OH) (85, 91). V centrálnom nervovom systéme je prostredníctvom CYP46A1 syntetizovaný 24OH. 7 α OH a 27OH sú syntetizované primárne v bunkách pečene prostredníctvom cytochrómov CYP7A1 a CYP27A1 počas syntézy žlčových kyselín. Medzi oxysteroly, ktorých syntéza môže byť výrazne zvýšená prostredníctvom liečiv indukujúcich enzýmy CYP450, patrí 4 β OH. Tento oxysterol je syntetizovaný prostredníctvom CYP3A4, ktorý je indukovaný napr. liečivami používanými na liečbu epilepsie. Oxysteroly enzymatického pôvodu zohrávajú významnú úlohu nielen v metabolizme cholesterolu, ale aj prostredníctvom ovplyvnenia Hedgehog signalizácie, s kyselinou retínovou spojených orphan receptorov (RORs) a estrogénových receptorov ovplyvňujú vnútrobunkovú signalizáciu, vývoj a diferenciáciu

organizmu. Taktiež sú prostredníctvom ovplyvnenia LXR a sterol viažucich regulačných proteínov (SREBP) schopné ovplyvniť transkripciu génov a metabolizmus cholesterolu, avšak priamy vplyv oxidovaných cholesterolov enzymatického pôvodu na rozvoj aterosklerózy ešte nebol dokázaný (84). Na druhej strane silnejšia cytotoxicita a schopnosť navodiť endotelovú dysfunkciu bola dokázaná pri oxysteroloch s neenzymatickým pôvodom, čo naznačuje možnú úlohu tejto skupiny oxysterolov v rozvoji aterosklerózy (85).

2.6.2. Oxysteroly neenzymatického pôvodu

Do tejto skupiny patrí napr. 7 β -hydroxycholesterol (7 β OH), 7-ketocholesterol (7K) alebo cholesterol 5,6 epoxid (EPOX) (85). Tieto oxysteroly vznikajú autooxidáciou cholesterolu pri spracovaní potravy, pôsobením voľných radikálov a ďalšími vplyvmi. Najvyššiu koncentráciu z oxysterolov neenzymatického pôvodu v krvnej plazme dosahuje 7K (Obr. 7.) (92). Jeho schopnosti indukovať zápal, endotelovú dysfunkciu a bunkovú smrť sú dobre známe (85, 93, 94). V makrofágoch indukuje syntézu prozápalových mediátorov, ako napríklad IL-8 a MCP-1. 7K je schopný zvýšiť expresiu adhézných molekúl (ICAM-1 a VCAM-1) na ľudských aortálnych endotelových bunkách (HAEC) a zvýšiť adhéziu a transmigráciu monocytov cez HAEC vrstvu. Taktiež sa akumuluje v makrofágoch a aterosklerotických plátoch, čo naznačuje jeho významnú úlohu v procese rozvoja aterosklerózy. Po vystavení primárnych makrofágov a bunkovej línie J774A.1 pôsobeniu OxLDL po dobu 24 hodín boli tieto bunky schopné vychytať oxidované cholesterol z média a viabilita buniek ostala nad 85 %. V rámci buniek sa 7K a jeho esterifikované formy akumulovali v plazmatickej membráne, endozómoch, ale hlavne v lyzozómoch a bunky sa menili na penové bunky (95).



Obr. 7. Schematické znázornenie štruktúry 7-ketocholesterolu (na základe (84)).

2.7. Bunkové kultúry

2.7.1. Význam bunkových kultúr pre výskum endotelovej dysfunkcie

Bunkové kultúry majú nenahraditeľné miesto v základnom výskume. Napriek množstvu nevýhod, ktoré plynú z vyňatia určitého druhu buniek zo systémovej regulácie má použitie bunkových kultúr v praxi mnohé výhody oproti *in vivo* zvieracím modelom. V prvom rade ide o to, že bunkové kultúry sú ľudského pôvodu, a teda sa nemusíme zaoberať problematikou medzidruhových rozdielov pri analýze a interpretácii výsledkov.

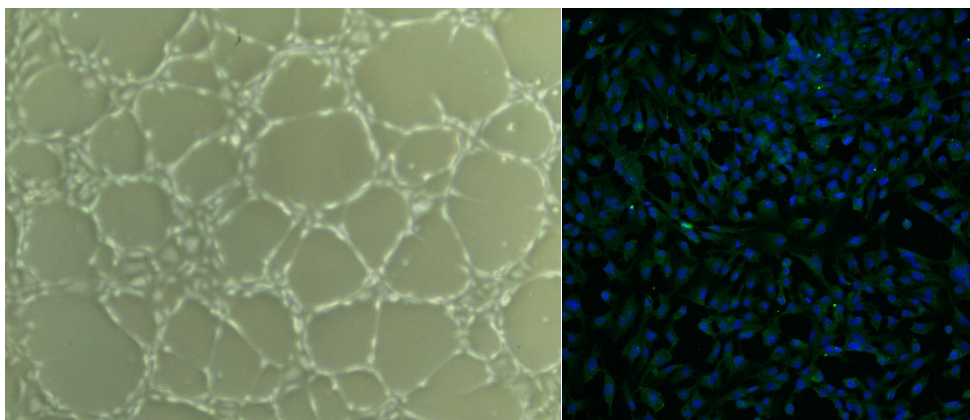
Vývoj a výskum *in vitro* modelov bunkových kultúr neustále napreduje a stále viac sa približujú podmienkach *in vivo*. 3D modely tumorov sú bežne používané pri testovaní protinádorových liečiv (96), bunkové modely zložené z izolovaných primárnych neurónov, mikrogliových buniek, hippokampálnych buniek a ďalších typov nervových buniek sa používajú pri štúdiu Alzheimerovej choroby (97), prionóz (98) a Parkinsonovej choroby (99).

Vo výskume kardiovaskulárnych ochorení zohrávajú prvoradú úlohu endotelové bunky a bunky imunitného systému. Endotelové bunky vystielajú celý kardiovaskulárny systém od srdca až po krvné vlásoknice. V závislosti na orgáne a časti kardiovaskulárneho systému, v ktorej sa nachádzajú, sa rozvinuli značne odlišné fenotypy endotelových buniek. Táto heterogenita v rámci endotelových buniek vysvetľuje rozdielne odpovede

endotelových bunkových kultúr izolovaných z rozdielnych častí kardiovaskulárneho systému na vonkajšie impulzy, ktorým sú vystavené (6, 100).

2.7.2. HUVEC

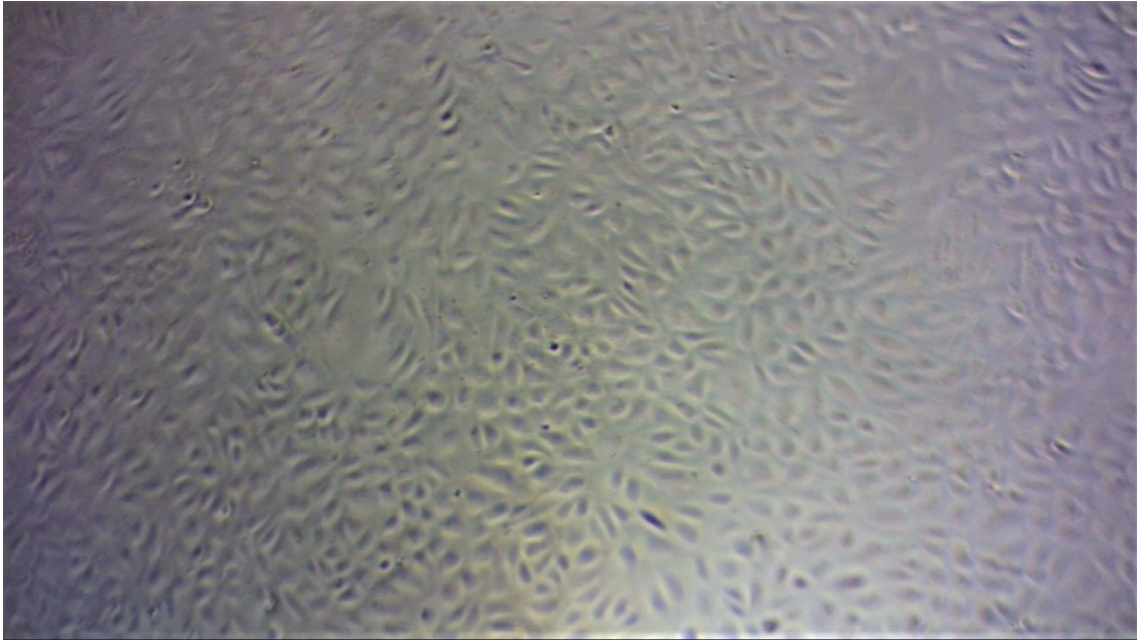
Maryuama ako prvý v histórii popísal izoláciu primárnej kultúry ľudských endotelových buniek z pupočníkovej cievy (HUVEC) za pomoci perfúzie pupočníkovej cievy pomocou trypsínu v roku 1963 (101). Odvtedy sa HUVEC stali najpopulárnejším typom endotelových buniek používaných v podmienkach *in vitro* (Obr. 8.). Ich izolácia z pupočníkovej cievy je relatívne jednoduchá a pupočníková cieva je dostupná ako biologický odpad po narodení dieťaťa (102). HUVEC exprimujú množstvo endotelových markerov ako napríklad ICAM-1, VCAM-1, selektíny, von Willebrandov faktor a sú schopné produkovať NO (103, 104). Taktiež sú schopné reagovať na množstvo impulzov ako hyperglykémia, stimulácia prostredníctvom lipopolysacharidu, či prietokovým napätím (105-107). Môžu byť kultivované v mikrofluidných zariadeniach (108), diferencované do 3D sféroidov, kokultivované v 3D systémoch s inými bunkovými líniami, či kultivované v matrigele pri štúdiu tubulogenézy (109, 110). Medzi endotelovými bunkovými líniami sa HUVEC považujú za zlatý štandard a sú najpoužívanejšou bunkovou líniou, avšak ich použitie na modelovanie dospelých ciev zostáva zložité. Medzi hlavné nevýhody HUVEC patria rozdiely medzi jednotlivými donormi z ktorých boli bunky izolované, obtiažnosť ich transfekcie a limitovaná životnosť, pričom senescenciu dosahujú približne po 15-20-tich deleniach. Z HUVEC boli pripravené imortalizované bunkové línie EA.hy 926, hTERT a HUV-ST (111, 112). Ea.hy 926 sú jednou z najpopulárnejších imortalizovaných bunkových línii vôbec. Boli vytvorené fúziou HUVEC s bunkovou líniou pľúcnych nádorových buniek A549 (113). Napriek tomu, že si Ea.hy zachovali väčšinu dôležitých endotelových markerov, existujú závažné rozdiely v ich reakcii na rôzne stimuly, ako napríklad oxidovaný LDL či VEGF oproti reakcii primárnej bunkovej línie HUVEC (114, 115).



Obr. 8. HUVEC bunky sú v matrigéle schopné tvoriť tubulárne štruktúry (vľavo). Taktiež dokážu syntetizovať NO prostredníctvom eNOS (vpravo). HUVEC bunky zafarbené prostredníctvom 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI, modrá farba-jadrá) a primárnej protilátky proti eNOS v kombinácii so sekundárnou protilátkou Alexou fluor 488 (zelená farba-expressia eNOS proteínu) (vlastné výsledky).

2.7.3. HAEC

Ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC) boli v aorte vystavené silným hemodynamickým silám, ktoré ovplyvnili ich fenotyp a pozmenili mieru expresie povrchových proteínov. Medzi tieto proteíny patrí aj membránový endoglin. Sú schopné produkovať látky ovplyvňujúce cievny tonus, angiogézu či zápalovú odpoveď. HAEC sú schopné rásť v monovrstve na plastoch s adhezívnym povrchom (Obr. 9.) alebo tvoriť tubulárne štruktúry v matrigele. Môžu byť kokultivované s inými bunkovými líniami ako napríklad s THP-1 monocytmi pri štúdiu adhézie a transmigrácie monocytov cez endotelovú vrstvu. Z týchto dôvodov ide o najvhodnejšiu bunkovú líniu na štúdium endotelu veľkých artérií. So zvyšujúcou sa pasážou buniek dochádza k postupnej zmene expresie povrchových proteínov a senescenciu dosahujú približne po 15-20-tich deleniach (116, 117). HAEC sú používané primárne na štúdium rozvoja endotelovej dysfunkcie a aterosklerózy. Z HAEC bola vytvorená immortalizovaná línia TeloHAEC, avšak jej použitie je obmedzené (118).



Obr. 9. HAEC sú schopné vytvárať celistvú bariéru (vlastné výsledky).

2.7.4. HMVEC

Najčastejšími zdrojmi ľudských mikrovaskulárnych endotelových buniek (HMVEC) sú koža, pľúca a srdce. Ich fenotyp bol pozmenený nízkym tlakom krvi v kapilárach a používajú sa prevažne na štúdium angiogenézy, bunkovej transmigrácie, hojenia rán a zápalovej reakcie (119). Medzi typické vlastnosti HMVEC patrí rast v monovrstve, expresia a sekrécia von Willebrandovho faktora, vychytávanie LDL a rýchla formulácia tubulárnych štruktúr v matrigéle. Izolácia čistej bunkovej kultúry HMVEC je zložitá a izolované bunky dosahujú senescenciu zvyčajne po 15-20-tich deleniach. Z týchto dôvodov sa pristúpilo k tvorbe immortalizovaných bunkových línií derivovaných z primárnych HMVEC. Na tvorbu immortalizovaných bunkových línií bola použitá transfekcia pomocou katalytického komponentu telomerázy alebo plazmidu kódujúceho simian virus (SV40). Príkladom immortalizovanej bunkovej línie, ktorá vznikla transfekciou HMVEC prostredníctvom SV40 je bunková línia HMEC-1 (120, 121).

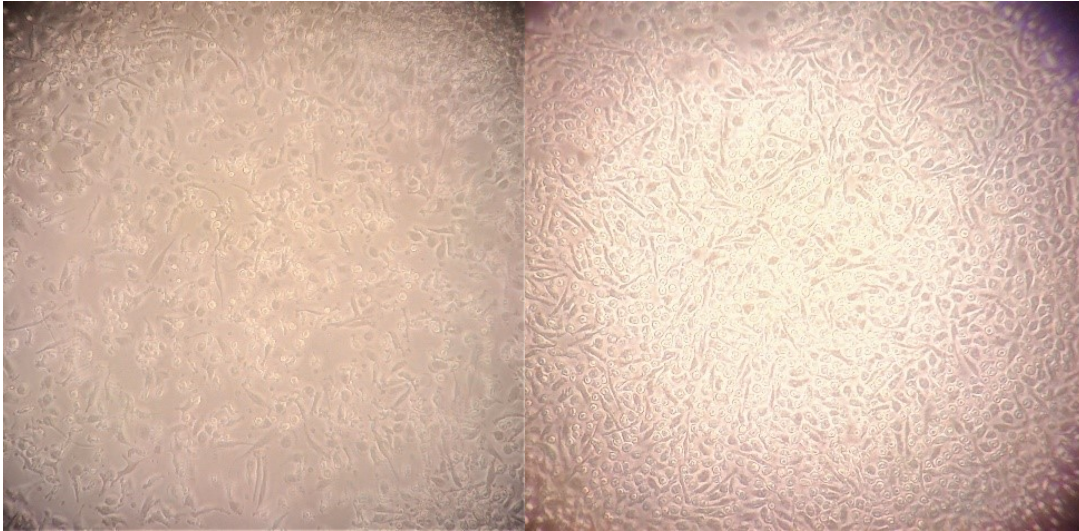
2.7.5. Primárne monocyty a makrofágy

Monocyty sú tvorené hematopoetickými kmeňovými bunkami v kostnej dreni (122). Po vzniku cirkulujú v krvi po dobu približne troch dní (123). V krvi cirkulujúce nestimulované monocyty sa nedokážu deliť. V pokojovom stave prestupuje cez endotel iba $\leq 1\%$ cirkulujúcich monocytov (124-126). Na základe génovej expresie a funkcie

môžeme monocyty rozdeliť na tri základné typy – klasické, ktoré predstavujú 80-90 % všetkých monocytov a majú za úlohu fagocytózu, prechodné, ktoré predstavujú 2-11 % monocytov a sú výrazne prozápalové a neklasické (10-20 %), ktoré zohrávajú významnú úlohu v ochrane tkanív a protivírusovej ochrane (127).

Po stimulácii endotelu prozápalovými cytokínmi dochádza k aktivácii endotelu a zvýšenej expresii adhézných molekúl (P-, E-selektínov, ICAM-1, VCAM-1...) (128, 129). Interakcia selektínov nachádzajúcich sa na povrchu endotelových buniek a P-selektínového glykoproteínového ligandu 1 (PSGL-1) nachádzajúceho sa na povrchu cirkulujúcich monocytov je významná pre fázu rolovania monocytov po endoteli (130). K spomaleniu a zastaveniu rolovania dochádza vďaka spojeniu monocytového VLA-4 a endotelového VCAM-1 (16, 17). Adhézia monocytov na endotel je regulovaná prostredníctvom C-C a C-X-C chemokínov (131, 132). Následné intraluminálne plazenie monocytov je zabezpečené prostredníctvom interakcie monocytového s fúziou spojeného antigénu 1 (LFA-1) a makrofágového antigénu 1 (Mac-1) s ICAM-1 a ICAM-2 (18).

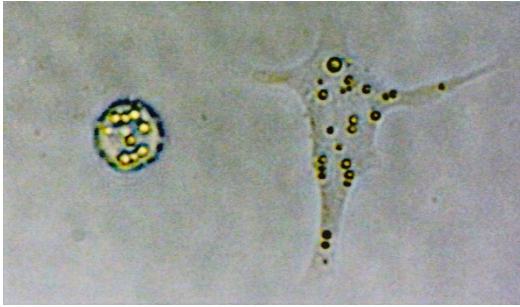
Po procese adhézie nasleduje proces transmigrácie. Za normálnych okolností 70-90 % adherovaných monocytov transmigruje cez medzibunkové priestory v endotelovej monovrstve a iba 10-30 % migruje priamo cez endotelové bunky (133). V procese medzibunkovej transmigrácie monocytov cez endotelovú vrstvu zohráva významnú rolu PECAM-1 (134). Po prestupe monocytov do tkanív dochádza k ich diferenciácii na makrofágy alebo dendrické bunky (Obr.10.) (123). Makrofágy sú schopné produkovať rôzne rastové faktory, cytokíny, chemokíny a proteolytické enzýmy ktorými dokážu ovplyvňovať okolité tkanivo (135, 136). Počas rozvoja aterosklerózy nadobúdajú makrofágy prozápalový fenotyp, pohlcujú lipidy, menia sa na penové bunky a prispievajú k progresu aterosklerózy (137).



Obr. 10. Primárne monocyty počas procesu diferenciácie na makrofágy prostredníctvom stimulačných cytokínov (vlastné výsledky).

2.7.6. THP-1

THP-1 bunková línia sa od svojej prvej izolácie v roku 1980 (138) stala jednou z najpoužívanejších bunkových línií na výskum funkcie monocytov a makrofágov v kardiovaskulárnom systéme (Obr. 11.). Ide o bunkovú líniu izolovanú z pacientov s akútnou monocytovou leukémiou. Napriek tomu, že sa vyznačuje určitými odlišnosťami oproti primárnym monocytom, zastáva významné miesto v štúdiu aterosklerózy a ďalších ochorení kardiovaskulárneho systému. Medzi tieto odlišnosti patrí napr. potreba silnejšieho stimulu ako je to v prípade primárnych monocytov. Na to, aby THP-1 monocyty znížili expresiu LDL receptorov, vyžadujú vyššie dávky LDL ako primárne monocyty (139). Na druhej strane majú THP-1 monocyty aj rad výhod. Medzi významné výhody THP-1 monocytov patrí nízka genetická variabilita (140), vysoká efektivita transfekcií (141), dlhovekosť a možnosť skladovania neobmedzený čas v tekutom dusíku (139).



Obr. 11. Fotografia THP-1 monocytu a diferencovaného makrofágu. V bunkách sú viditeľné vakuoly naplnené sérom (výživa pre bunky) (vlastné výsledky).

2.8. Membránový endoglin v procese aterogenézy

Úloha membránového endoglínu v procese aterogenézy zostáva nejasná. Stále nie je dostatočne objasnené, v ktorých fázach rozvoja aterosklerózy má Eng pro-aterogénne a v ktorých proti-aterogénne účinky a akou mierou prispieva k rozvoju ochorenia.

Je však známa spojitosť medzi expresiou Eng a produkciou NO prostredníctvom eNOS. Eng je schopný stabilizovať eNOS proteín (27), zvyšuje fosforyláciu a stabilitu SMAD2 a zvyšuje expresiu eNOS (142). Endotelová syntáza oxidu dusnatého je nevyhnutná pre správnu funkciu endotelu a jej znížená aktivita pri hypercholesterolémii a/alebo zápale môže vyústiť ku zmenám vo funkčnosti ciev a rozvoju endotelovej dysfunkcie (143).

Úloha endoglínu na cievnom endoteli však nespočíva iba v podpore funkcie eNOS. Jerkic s kolektívom na bunkách izolovaných z vaječného žĺtka myší preukázali dôležitú úlohu Eng pri stabilizácii endotelovej vrstvy a regulácií permeability endotelu. Na experiment použili bunky izolované počas 8,5 dňa embryonálneho vývoja z homozygotných Eng^{-/-}, heterozygotných Eng^{+/-} a kontrolných Eng^{+/+} myší. V Eng deficientných bunkách preukázali znížené množstvo endotel stabilizujúcich faktorov, ako je receptor pre cievny rastový faktor 2 (VEGFR2), proteínkináza PAK-1, cievny endotelový kadherín (VE-kadherín) či signálny proteín Rac-2, a zvýšené množstvo endotel destabilizujúcich faktorov, ako trombospondín 1 (TSP-1) a tyrozín fosfatáza CD148. Naznačili, že znížené množstvo Eng na bunkách môže súvisieť so zvýšenou permeabilitou endotelu a rozvojom endotelovej dysfunkcie (144). Úlohu endoglínu v regulácií endotelovej permeability potvrdzuje aj štúdia Rossi a jej kolektívu vykonaná na kombinácii murálnych a endotelových buniek. Preukázali, že adhézia murálnych buniek na endotelové bunky je aspoň sčasti závislá na Eng. Zníženie expresie Eng na

endotelových bunkách v konečnom dôsledku vyústilo do zvýšenej permeability endotelovej vrstvy (145).

V nasledujúcich štúdiách Rossi s kolektívom demonštrovali interakciu medzi leukocytovým integrínom $\alpha 5\beta 1$ (30), prípadne doštičkovým $\alpha IIb\beta 3$ s časťou molekuly Eng nazývanej RGD motív (29). Poukázali na to, že znížené hladiny Eng v zápalových podmienkach mali za následok zníženie množstva leukocytov, ktoré transmigrovali cez endotel. Z týchto dôvodov naznačujú, že by sa Eng dal považovať za adhéziu molekulu, ktorá podporuje rozvoj endotelovej dysfunkcie, ak je prítomná zápalová reakcia organizmu (30). Dôležitosť Eng ako molekuly regulujúcej permeabilitu endotelu pre imunitnú odpoveď organizmu preukázala Ojeda-Fernandez a jej kolektív. Porovnávali imunitnú odpoveď u myši, ktoré neexprimovali endoglin v myeloidnej línii buniek (Eng KO) s bežnými myšami. Zistili, že Eng KO myši trpeli spontánnymi infekciami mäkkého tkaniva, transmigrácia leukocytov cez endotel bola poškodená, expresia génov v makrofágoch bola pozmenená a ich schopnosť fagocytózy bola znížená. Tieto výsledky poukazujú na to, že Eng nie je dôležitý iba pre funkciu endotelu, ale aj pre funkciu imunitného systému a rozvoj fyziologickej zápalovej odpovede na infekčné agensy (146).

Eng zohráva komplexnú úlohu v organizme, a to za fyziologických, ako aj za patologických stavov. Je pravdepodobné, že sa jeho úloha v procese rozvoja aterosklerózy mení. V súčasnosti však nie je možné s istotou dokázať, že Eng prispieva alebo chráni pred rozvojom aterosklerózy.

2.9. Transkripčné faktory regulujúce expresiu membránového endoglinu

2.9.1. KLF6

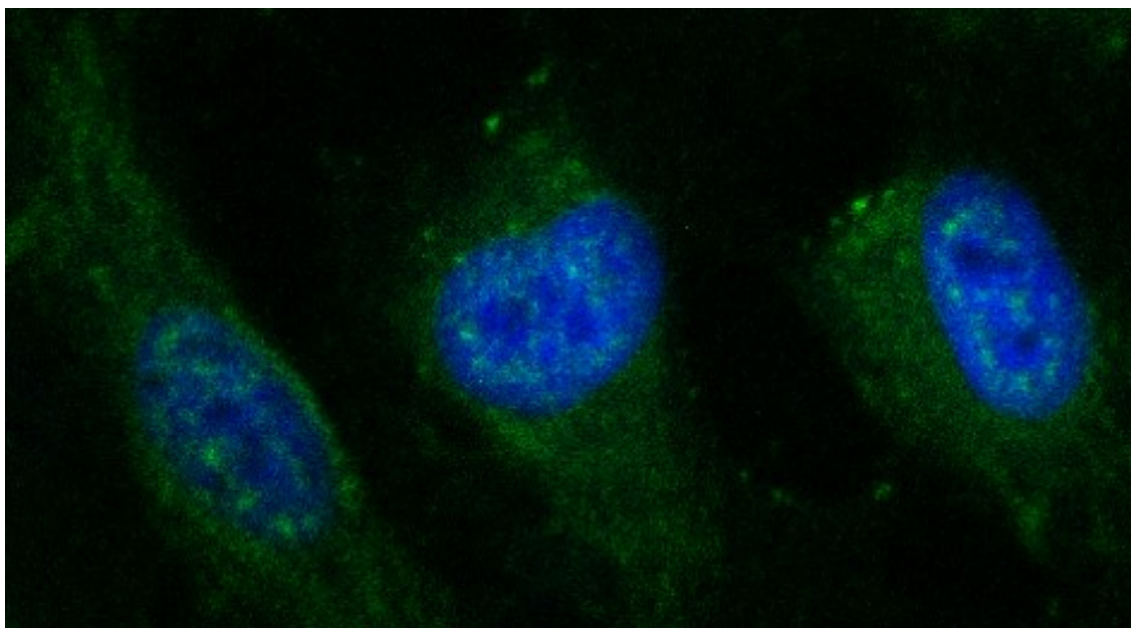
Faktor ako Krüppel 6 (KLF6) je transkripčný faktor obsahujúci zinok a rozpoznávajúci GC box motív v reagujúcich génoch (147, 148). Bola dokázaná zvýšená expresia KLF6 na miestach s poškodeným cievny endotelom a jeho schopnosť aktivovať gény priamo sa podieľajúce na reakcii na cievne poškodenie – kolagén I, transformujúci rastový faktor βA (TGF- βA), receptory pre transformujúci rastový faktor I, II (T β RI, T β RII) a urokinázový typ plazminogénového aktivátora (uPA) (149, 150). Zvýšené koncentrácie KLF6 boli objavené u potkana po balónikovom poškodení cievy na miestach, v ktorých nastala indukcia expresie Eng. Rovnako poškodenie monovrstvy

HUVEC buniek viedlo k zvýšeniu expresie KLF6, ktorá bola v priebehu 6 hodín sprevádzaná zvýšenou expresiou Eng. Taktiež bolo dokázané, že účinky KLF6 sú potencované špecifickým proteínom 1 (Sp1). Tieto výsledky poukazujú na to, že KLF6 je schopný v spolupráci s Sp1 aktivovať expresiu Eng a ďalších členov TGF- β signalizačnej kaskády (151).

Okrem účinku na expresiu Eng dokáže KLF6 zvýšiť expresiu MMP14, a teda zvýšiť koncentráciu sEng v krvnej plazme (31). KLF6 taktiež zvyšuje aktivitu NF- κ B (152, 153), prispieva k migrácii makrofágov, ich prozápalovej polarizácii a progresu zápalovej reakcie (154).

2.9.2. NF- κ B

Nukleárny faktor kappa B (NF- κ B) zohráva nenahraditeľnú úlohu v metabolizme buniek a odpovedi na stresové a zápalové stimuly (Obr. 12.). Po aktivácii NF- κ B dochádza k presunu transkripčného faktoru z cytoplazmy do bunkového jadra, kde aktivuje mimo iných expresiu hypoxiou indukovaného faktoru 1 (HIF-1) (32, 155). HIF-1 sa viaže na hypoxia-responzívne elementy a aktivuje expresiu veľkého množstva génov, okrem iných gény pre vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF) (156), erytropoetín (157) a indukovateľnú NO-syntázu (158). Taktiež bolo dokázané, že HIF-1 tvorí s Sp1 a Smad3 komplex, ktorý sa viaže na endoglinový promoter a indukuje expresiu Eng (8).



Obr. 12. Vnútrobnková lokalizácia $NF-\kappa B$ v cytoplazme HAEC (zelená) a v jadre (svetlomodrá). Jadrá sú zafarbené prostredníctvom DAPI (modrá) (vlastné výsledky).

2.9.3. LXR

Pečeňový X receptor (LXR) zohráva zásadnú úlohu v regulácii intracelulárnych hladín cholesterolu (159). Po aktivácii LXR prostredníctvom oxysterolov dochádza k aktivácii génov pre adenosíntrifosfát viažuci kazetový transportér A1 a G1 (ABCA1, ABCG1), ktoré sú nenahraditeľné pre efflux cholesterolu z buniek (160). Po stimulácii buniek prostredníctvom selektívneho LXR agonistu T0901317 nastalo významné zvýšenie expresie Eng na úrovni mRNA, ako aj na proteínovej úrovni, čo naznačuje významnú úlohu LXR v regulácii expresie Eng (33).

2.10. Liečivá ovplyvňujúce expresiu membránového endoglinu

2.10.1. Atorvastatín

Statíny sú najpoužívanejšími liečivami pri liečbe hypercholesterolémie a aterosklerózy. Prostredníctvom inhibície enzýmu zodpovedného za syntézu cholesterolu v pečeni (3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzým A reductázy) sú schopné znižovať množstvo proaterogénnych molekúl oxLDL v cirkulácii. Okrem silných hypolipidemických efektov vykazujú aj iné prospešné efekty (pleiotropné efekty) na organizmus. Medzi tieto pleiotropné efekty patria modulácia zápalovej reakcie

organizmu, zvýšenie stability aterosklerotického plaku či inhibícia krvného zrážania (161). V myšom modeli aterosklerózy bol atorvastatín schopný znížiť koncentráciu cholesterolu a sEng v plazme a súčasne zvýšiť expresiu Eng a eNOS v aorte (48, 162). V podmienkach *in vitro* bol schopný zvýšiť expresiu Eng na HUVEC a zabrániť zníženiu expresie Eng a eNOS počas zápalovej odpovede endotelových buniek na tumor nekrotizujúci faktor α (TNF- α) (163). Spoločne tieto štúdie naznačujú pozitívny vplyv atorvastatínu na rozvoj aterosklerózy a zápalovej reakcie organizmu, avšak stále chýbajú štúdie, ktoré by objasnili, akú úlohu zohráva ovplyvnenie Eng statínmi v procese vzniku a rozvoja aterosklerózy.

2.10.2. Carotuximab

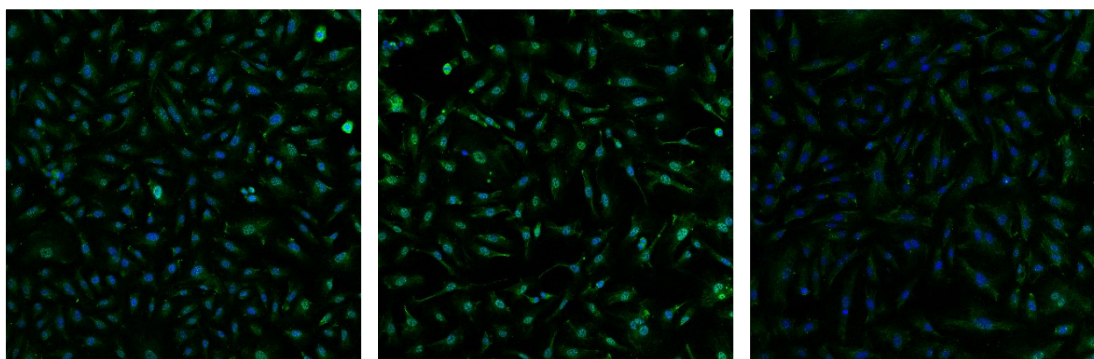
Carotuximab je prvá chimerická monoklonálna protilátka viažuca sa na Eng používaná v klinickej praxi (164). V HUVEC je schopný deaktivovať Smad1/5/8 signalizačnú kaskádu a aktivovať Smad 2/3 signalizačnú kaskádu. Bol schopný signifikantne inhibovať tubulogenézu a v kombinácii s bevacizumabom (liečivo používané proti VEGF) bola inhibícia tubulogenézy signifikantne zvýšená (165). Taktiež v preklinických štúdiách bol carotuximab schopný inhibovať angiogenézu a spomaliť rast tumorov (166, 167). Nežiaduce účinky podania carotuximabu boli príbuzné príznakom hereditárnej hemoragickej teleangiektázie (HHT), ochorenia, ktoré je spôsobené mutáciou génu pre Eng (164). Na molekulárnej úrovni dokáže carotuximab zabezpečiť spojenie Eng a MMP14 na povrchu buniek a zvýšiť mieru odštepovania Eng a produkciu sEng (168).

2.10.3. PHA-408

NF- κ B je v pokojovom stave vo forme dimérov lokalizované v cytoplazme buniek, kde je naviazané na inhibičné κ B (I κ B) proteíny. Po stimulácii prozápalovými signálmi nastáva aktivácia I κ B kinázy, ktorá zabezpečí fosforyláciu, polyubiquitináciu a degradáciu I κ B cez S26 proteazomovú cestu a tým spôsobí uvoľnenie NF- κ B, ktoré je schopné prestúpiť do jadra a zabezpečiť zápalovú odpoveď bunky (155, 169).

PHA-408 je účinný, vysoko špecifický ATP-kompetitívny inhibítor kinázy I κ B s relatívne pomalým odbúraním. [8-(5-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)isonicotinamido)-1-(4-fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-benzo[g]indazole-3-carboxamide] (PHA-408) má mnoho protizápalových účinkov, ktoré vyplývajú z inhibície NF- κ B (Obr. 13). V potkaňom modeli artritídy bolo dokázané, že PHA-408 je

schopné po perorálnom podaní znížiť zápalovú reakciu organizmu. Taktiež bolo schopné v závislosti na podanej dávke znížiť infiltráciu buniek imunitného systému do pľúcneho tkaniva po inhalačnom podaní lipopolysacharidu (169, 170).



Obr. 13. *Expresia a lokalizácia NF- κ B v HAEC bunkách u kontrolnej skupiny, skupiny stimulovanej 7K a u skupiny premedikovanej PHA-408. Po stimulácii 7K nastáva presun NF- κ B do jadra, zatiaľ čo PHA-408 je schopné znížiť expresiu NF- κ B a zabrániť jeho presunu do jadra buniek (vlastné výsledky).*

2.10.4. 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrín

Cyklodextríny sú skupinou cyklických oligosacharidov, ktoré vznikajú pri bakteriálnom rozklade celulózy. Pôvodne sa používali iba ako solubilizátory pre hydrofóbne liečivá, ale následne sa zistilo, že aj samotné cyklodextríny majú účinky relevantné pre farmakoterapiu (171). Jedným z hlavných efektov β -cyklodextrínov je odstraňovanie cholesterolu z buniek (172). V myšom modeli leukémie bol 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrín (CD) schopný znížiť obsah cholesterolu a inhibovať rast leukemických buniek cez zástavu bunkového cyklu v G₂/M fáze bunkového cyklu a navodiť bunkovú apoptózu, čo malo za následok zlepšenie prežívania leukemických myší (173). V bunkovej kultúre HUVECOv bol CD schopný stimulovať proliferáciu a migráciu buniek. Taktiež v myšom modeli ischemie zadnej končatiny mal CD priaznivé účinky. Bol schopný napomôcť obnove krvného obehu a zvýšiť denzitu krvných vlásočníc (174).

V bunkách formulujúcich aterosklerotické pláty bol CD schopný signifikantne znížiť obsah bunkového cholesterolu (175) a spolu so schopnosťou preprogramovať makrofágy bol schopný prispieť k regresu aterosklerózy (176). V súčasnosti je CD registrovaný ako

liečivo prvej voľby pre Niemann-Pickovu chorobu typ C, ktorá sa vyznačuje autozomálne recesívnou stratou funkcie génov pre Niemann-Pickov transportér typ C1 alebo C2. Títo pacienti za bežných podmienok umierali v detskom veku, avšak CD dokázal signifikantne predĺžiť ich prežívanie. V súčasnosti prebiehajú štúdie zamerané na efekt CD v procese aterosklerózy, Alzheimerovej, Parkinsonovej a Huntingtonovej choroby (177).

3. Ciele práce

- Sledovať vplyv rozličných stimulov (sEng, oxysteroly, produkty makrofágového metabolizmu) na expresiu membránového endoglínu a objasniť efekt zmien expresie Eng na funkciu endotelovej vrstvy.
- Objasniť, aké signalizačné kaskády sú do prípadnej indukcie/supresie expresie endoglínu po podaní oxidovaných cholesterolov zapojené.
- Štúdium možností ovplyvnenia expresie membránového endoglínu farmakologicky a prostredníctvom génovej manipulácie.

4. Komentáre k prácam zahrnutým v dizertačnej práci

4.1. MMP12, Secreted by Pro- Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells

Aristorena, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, de Las Casas-Engel, M., Ojeda-Fernandez, L., Nieto, C., J. Blanco, F., C. Valbuena-Diez, A., M. Botella, L., Nachtigal, P., L. Corbi, A., Colmenares, M., Bernabeu, C., (2019), *Int. J. Mol. Sci.* (IF=4.183 (Q2) AIS:0.932 (Q2) doi:10.3390/ijms20123107

Publikácia bola zameraná na objasnenie vplyvov MMP12 z prozápalových makrofágov na funkciu endotelových buniek. Na štúdiu boli použité ľudské monocyty izolované z krvi zdravých donorov. Monocyty boli diferencované prostredníctvom faktoru stimulujúceho kolónie granulocytov a makrofágov (GM-CSF) alebo faktorom stimulujúcim kolónie makrofágov (M-CSF) po dobu 6 dní. Po tejto dobe nadobudli monocyty stimulované GM-CSF fenotyp prevažne pro-zápalových makrofágov, zatiaľ čo monocyty stimulované M-CSF nadobudli fenotyp prevažne proti-zápalových makrofágov.

Diferencované makrofágy sa zásadne líšili v expresii MMP. Spomedzi 12-tich analyzovaných MMP bol rozdiel medzi M-CSF a GM-CSF stimulovanými makrofágmi najzásadnejší pri MMP12. GM-CSF stimulované makrofágy syntetizovali signifikantne viac MMP12 a sekretovali túto MMP do kultivačného média. Keďže je o MMP12 známe, že spomaľuje tvorbu nových ciev, rozhodli sme sa otestovať jej efekt na HUVEC bunky.

Na otestovanie efektov látok sekretovaných z M-CSF a GM-CSF stimulovaných makrofágov bola použitá štúdia tubulogenézy v matrigele. HUVEC bunky boli inkubované v matrigele s pridanými supernatanmi z makrofágov a po 3 a 6-tich hodinách boli vyhotovené fotografie tubulogenézy. Supernatanty z M-CSF stimulovaných makrofágov nedokázali signifikantne ovplyvniť tubulogenézu, avšak inkubácia so supernatantmi z GM-CSF stimulovaných makrofágov (vysoké koncentrácie MMP12) mala za následok signifikantne zníženú schopnosť tubulogenézy HUVEC buniek.

Aby sme potvrdili, že za pozorovaný efekt supernatantov z GM-CSF stimulovaných makrofágov je zodpovedná MMP12, použili sme inhibítor MMP12 (MMP-408). Pridanie MMP-408 k HUVEC bunkám inkubovaným so supernatanmi z GM-CSF stimulovaných

makrofágov malo za následok signifikantné zvýšenie schopnosti tubulogenézy HUVEC buniek. Aby sme si overili, že tento efekt je spojený so schopnosťou MMP12 odštepovať sEng z povrchu buniek, odmerali sme koncentráciu sEng v médiu HUVEC buniek inkubovaných so supernatami z M-CSF stimulovaných makrofágov, GM-CSF stimulovaných makrofágov a GM-CSF stimulovaných makrofágov s pridanou MMP-408. Koncentrácia sEng bola signifikantne zvýšená iba v médiu HUVEC buniek inkubovaných so samotným supernatantom z GM-CSF stimulovaných makrofágov.

Táto štúdia poukazuje na zásadnú úlohu makrofágov v zápalovej imunitnej odpovedi. Makrofágy sú zodpovedné za reguláciu cievnej homeostázy a prostredníctvom sekretovanej MMP12 sú schopné regulovať množstvo Eng na povrchu endotelových buniek, a teda riadiť fungovanie endotelovej vrstvy. Nielenže dokážu ovplyvňovať tubulogenézu, ale zároveň sú schopné zabezpečiť produkciu sEng, ktorý taktiež môže ovplyvňovať fungovanie cievneho endotelu. Pri posudzovaní rozvoja endotelovej dysfunkcie je teda nevyhnutné prihliadať na polarizáciu makrofágov nachádzajúcich sa v cievnej stene. Zároveň táto práca poukazuje na možný mechanizmus, ktorý by objasnil, prečo sa hladiny solubilného endoglínu zvyšujú počas aterogenézy.

4.2. Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction *in vivo* and *in vitro*

Vicen, M., Vitverova, B., Havelek, R., Blazickova, K., Machacek, M., Rathouska, J., Najmanová, I., Dolezelova, E., Prasnicka, A., Sternak, M., Bernabeu, C., Nachtigal, P., (2019), *The FASEB Journal* vol. 33: 6099-6114 (IF=5.391 (Q1) AIS:1.676 (Q1) DOI: [10.1096/fj.201802245R](https://doi.org/10.1096/fj.201802245R)

Práca bola zameraná na efekt 7K na HAEC bunky v podmienkach *in vitro*. Predpokladali sme, že oxidovaný cholesterol bude schopný meniť expresiu Eng a navodiť stav endotelovej dysfunkcie. HAEC bunky boli premedikované prostredníctvom 7K a následne boli použité na polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), prietokovú cytometriu, imunocytochemické experimenty či funkčné experimenty adhézie a transmigrácie THP-1 monocytov.

Zistili sme, že 7K bol schopný navodiť stav endotelovej dysfunkcie charakterizovaný zvýšenou expresiou adhézných molekúl ICAM-1 a selektínov, translokáciou NF- κ B do jadra buniek a zvýšenou adhéziou a transmigráciou THP-1 monocytov cez HAEC monovrstvu. Rozvoj endotelovej dysfunkcie sprevádzala zvýšená expresia Eng a aktivácia celej Eng/Smad2/3/eNOS signalizačnej kaskády.

Prostredníctvom PCR sme odhalili zvýšenú expresiu všetkých troch hlavných transkripčných faktorov (KLF6, NR1H3 a RELA) regulujúcich expresiu Eng. Postupne sme každý z týchto transkripčných faktorov inhibovali (prostredníctvom génového silencingu, 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrínu alebo PHA-408) a zistili sme, že inhibícia ktoréhokolvek z transkripčných faktorov mala za následok zabránenie 7K navodenému zvýšeniu expresie Eng.

Na záver štúdie sme sa zmerali na funkčné dôsledky zvýšenia alebo zníženia expresie Eng na adhéziu a transmigráciu THP-1 monocytov. Zvýšenie expresie Eng po treatmente 7K malo za následok zvýšenie adhézie a transmigrácie monocytov, zatiaľ čo zníženie expresie Eng prostredníctvom génového silencingu spôsobilo zníženie adhézie a transmigrácie monocytov.

Preukázali sme, že 7K je schopný navodiť stav endotelovej dysfunkcie a prostredníctvom KLF6, NR1H3 a RELA zvýšiť expresiu Eng. Zvýšená expresia Eng

v konečnom dôsledku spôsobila zvýšenie adhézie a transmigrácie monocytov cez endotelovú vrstvu, čo podporuje rozvoj endotelovej dysfunkcie. Naopak, inhibícia endoglínu utlmila adhéziu a transmigráciu monocytov, čo potvrdzuje potenciálne zásadnú úlohu Eng v akútnej fáze rozvoja endotelovej dysfunkcie *in vitro*.

4.3. Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- κ B and IL-6 in cultured human endothelial cells

Varejckova, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, Vitverová, B., Fikrová, P., Dolezelova, E., Rathouska, J., Prasnicka, A., Blazickova, K., Micuda, S., Bernabeu, C., Nemeckova, I., Nachtigal, P., (2017). Life Sciences, 2017, vol. 175, s. 52-60. ISSN 0024-3205. (IF=3,234 (Q2) AIS:0.664 (Q2) DOI: 10.1016/j.lfs.2017.03.014

V štúdií sme sa zamerali na schopnosť sEng navodiť stav endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro*. HUVEC bunky boli premedikované prostredníctvom sEng v dávke 40 alebo 500ng/mL. Efekty sEng boli analyzované prostredníctvom PCR, prietokovej cytometrie, Elisa analýzy a luciferázového experimentu.

sEng ako samotný agens nebol schopný navodiť stav endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro*, avšak dokázal zvýšiť expresiu Eng, aktivovať NF- κ B a zvýšiť množstvo IL-6 sekretovaného z buniek.

Výsledky potvrdzujú priamy efekt sEng na endotelové bunky. Zistili sme, že sEng ako samotný agens nebol schopný navodiť stav endotelovej dysfunkcie na HUVEC bunkách, bol však schopný navodiť čiastočný prozápalový fenotyp. Tieto výsledky poukazujú na potenciálny spôsob akým by mohol sEng prispievať k rozvoju endotelovej dysfunkcie.

5. Súhrnná diskusia

Táto dizertačná práca bola zameraná na popísanie expresie membránového endoglínu a objasnenie jeho úlohy v procese rozvoja endotelovej dysfunkcie ako prvého kroku v rozvoji aterosklerózy. Pre endotelovú dysfunkciu je v podmienkach *in vitro* typický prozápalový fenotyp sprevádzaný zvýšenou expresiou adhezívnych molekúl, poruchou funkcie endotelu ako bariéry pre bunky z krvného riečiska a zvýšenou adhéziou a transmigráciou buniek imunitného systému cez endotel (6). V našich prácach sme sa primárne zamerali na úlohu zvýšeného alebo zníženého množstva Eng na povrchu endotelových buniek v procese rozvoja endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro* (35, 50, 60).

Ako prvý stimul, ktorým sme sa pokúsili navodiť stav endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro* bol solubilný endoglín (sEng). sEng vzniká odštiepením extracelulárnej domény membránového endoglínu prostredníctvom matrixových metaloproteáz (34, 35). Po dlhú dobu bol považovaný iba za marker kardiovaskulárnych ochorení ako napr. hypercholesterolémia, ateroskleróza či diabetes mellitus (51, 54, 178). Avšak Venkatesha a kol., ako aj Walshe a kol. dokázali priame účinky sEng na rozvoj endotelovej dysfunkcie *in vivo* (59, 61). V podmienkach *in vivo* bolo na myších modeloch problematické navodiť stav endotelovej dysfunkcie za použitia sEng ako jediného stimulu (179). Bolo potrebné pridať vysokotukovú diétu ako sekundárny stimul, pričom podávanie vysokotukovej diéty po dobu 3 mesiacov ešte nemalo za následok ovplyvnenie funkcie ciev (180). Až pridávanie vysokotukovej diéty po dobu 6 mesiacov malo za následok poškodenie endotelovej funkcie (181). Na základe týchto výsledkov sme chceli zistiť, či bude sEng schopný ovplyvniť endotelovú funkciu v podmienkach *in vitro* samostatne, alebo bude tiež potrebný sekundárny stimul ako to bolo v *in vivo* experimentoch. Premedikácia buniek prostredníctvom sEng v dávke 40 ng/mL (dávka relevantná v klinickej praxi pre preeklampsiu (182)) a v dávke 500 ng/mL (dávka odvodená od predchádzajúcich *in vivo* experimentov (179, 180)) nemalo za následok rozvoj kompletného fenotypu endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro*. sEng nebol schopný zvýšiť expresiu adhézných molekúl, avšak zvýšil aktivitu NF- κ B, IL-6 a prekvapivo zvýšil expresiu membránového endoglínu ako na úrovni mRNA, tak aj na proteínovej úrovni (60).

Keďže sEng samotný nebol schopný navodiť fenotyp endotelovej dysfunkcie na bunkovej úrovni, rozhodli sme sa v ďalšej štúdií zamerať na úlohu hypercholesterolémie pri rozvoji endotelovej dysfunkcie. Je dobre známe, že oxidované cholesteroly majú v organizme niekoľkonásobne vyššiu reaktivitu ako samotný cholesterol (83). Zamerali sme sa na účinky 22-hydroxycholesterolu a 7-ketocholesterolu, avšak iba 7K bol schopný navodiť endotelovú dysfunkciu (zvýšená expresia adhézných molekúl, zvýšená adhézia a transmigrácia monocytov cez membránu) a zvýšiť expresiu Eng (50). Schopnosť 7K indukovať endotelovú dysfunkciu je dobre známa, avšak autori varujú pred toxickými efektami 7K, keď je tento oxysterol schopný navodiť bunkovú smrť (85, 93, 94). Z dôvodu zabránenia toxickým účinkom 7K na bunky bola doba vystavenia HAECov účinkom 7K skrátená na 12 hodín, pričom po tejto dobe bunky nevykazovali zníženú životaschopnosť oproti kontrolnej skupine.

Produkcija Eng je riadená prostredníctvom troch hlavných transkripčných faktorov - KLF6 (31, 151), NF- κ B (9, 32) a LXR (183). Všetky tieto transkripčné faktory boli signifikantne aktivované po vystavení HAECov pôsobeniu 7K a inhibícia ktoréhokoľvek z nich mala za následok zabránenie 7K indukovanému zvýšeniu expresie Eng. Date a Zhang poukázali na spojitosť medzi transkripčným faktorom KLF6 a prozápalovou polarizáciou makrofágov (152), respektíve úlohu KLF6 ako ko-aktivátora NF- κ B (153). Zvýšenie expresie KLF6 teda pravdepodobne súvisí s celkovým pro-zápalovým fenotypom, ktorý je 7K schopný v podmienkach *in vitro* vyvolať na endotelových bunkách. Úloha NF- κ B v regulácii zápalovej reakcie je dobre známa už dlhú dobu, avšak informácie o spôsobe, akým sa musí disociovať z I κ B proteínov prostredníctvom I κ B kinázy a translokovať do jadra, aby mohol produkovať HIF-1 α , sú relatívne nové (32, 184). Z tohto dôvodu ešte neboli inhibítory I κ B kináz uvedené do klinickej praxe, a to aj napriek svojej vysokej účinnosti (170). Spojitosť medzi hypoxiou, HIF-1 α , zápalom a produkciou Eng je známa (8, 32), avšak sme prví, kto použil inhibítora I κ B kinázy PHA-408, aby sme zabránili 7K navodenej translokácii NF- κ B do jadra. Tým sme po osi NF- κ B, HIF-1 α , Eng utlmili 7K zvýšenú expresiu Eng v podmienkach *in vitro* (50).

Spojitosť medzi pečeneňým X receptorom (LXR) a reguláciou zápalu je taktiež známa (185, 186). LXR vykazujú protizápalovú aktivitu (187) a dokážu limitovať zvýšenú aktivitu NF- κ B (187-190). Z tohto dôvodu by sa dala zvýšená expresia LXR po vystavení buniek účinkom 7K považovať iba za reakciu na zvýšenie aktivity NF- κ B a snahu buniek obmedziť zápalovú reakciu sprostredkovanú prostredníctvom NF- κ B. Avšak po inhibícií

translokácie NF- κ B z cytoplazmy do jadra buniek prostredníctvom PHA-408 nenastalo zníženie expresie LXR. Z toho dôvodu môžeme za hlavnú príčinu zvýšenia expresie LXR považovať agonistické pôsobenie 7K ako endogénneho LXR agonistu, ktorý je schopný priamej väzby na ligand viažucu doménu v štruktúre LXR. 7K je síce slabší agonista LXR ako oxysteroly s enzymatickým pôvodom (22OH, 25OH, 27OH), avšak taktiež je schopný indukovať LXR (89, 191, 192). Zníženie dispozície 7K pre LXR prostredníctvom CD viedlo k zníženiu jeho aktivácie a zabráneniu 7K indukovanému nárastu expresie Eng (50).

Eng je schopný prostredníctvom stabilizácie eNOS napomáhať správnej funkcii endotelu (27, 28), avšak štúdie *in vitro* preukazujú jeho úlohu v procese zápalovej infiltrácie leukocytov a adhézie trombocytov na cievnu stenu (29, 30). Po vystavení HAEC zvýšenej koncentracii 7K sme zaznamenali zvýšenú expresiu eNOS, ako aj jeho fosforylovanej formy. Preto nás zaujímalo, či sa v prípade 7K navodenej endotelovej dysfunkcie bude jednať o protektívny efekt Eng, alebo bude podobne ako v experimentoch Rossi a kol. napomáhať adhézii a transmigrácii buniek imunitného systému cez endotelovú bariéru. 7K indukované zvýšenie expresie Eng malo za následok zvýšenie miery adhézie a transmigrácie monocytov cez endotelovú vrstvu a inhibícia jeho expresie mala za následok zníženie miery adhézie a transmigrácie monocytov. Toto zistenie je v súlade so štúdiami Rossi a kol. zameranými na adhéziu a transmigráciu leukocytov (30). Celkovo môžeme konštatovať, že membránový endoglin zohráva relevantnú úlohu v rozvoji 7-ketocholesterolom indukovanej endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro*. Vzhľadom na to, že sme v *in vivo* experimentoch pozorovali skôr antiaterogénne správanie membránového endoglinu (pokles expresie endoglinu spoločne s eNOS a rozvojom endotelovej dysfunkcie) zatiaľ nemôžeme spoľahlivo povedať, či sa membránový endoglin podieľa na rozvoji endotelovej dysfunkcie alebo či má prevažne protektívne efekty na cievny endotel a bráni rozvoju endotelovej dysfunkcie.

V záverečnej štúdií sme sa rozhodli venovať následkom odštiepenia membránového endoglinu prostredníctvom MMP12 na funkciu endotelu. Je známe, že Eng zohráva nezastupiteľnú úlohu vo vývoji krvného riečiska (25, 193). Ako sme dokázali v predchádzajúcej štúdií, 7K dokázal zvýšiť adhéziu a transmigráciu monocytov cez endotel. 7K taktiež dokáže indukovať diferenciáciu monocytov na makrofágy s pro-zápalovou polarizáciou (194, 195). Otázkou však bolo, či odstránenie Eng z povrchu HUVEC buniek prostredníctvom MMP12 sekretovanej z pro-zápalových makrofágov

bude mať za následok ovplyvnenie funkcie endotelových buniek. Zistili sme, že počas inkubácie endotelových buniek so supernatami z pro-zápalových makrofágov obsahujúcimi vysoké koncentrácie MMP12 dochádzalo k odštepovaniu membránového endoglínu a zvyšovaniu hladín sEng, čo malo za následok inhibíciu tubulogenézy a spomalenie zacelenia endotelu po poškodení v podmienkach *in vitro*. Toto zistenie je v súlade s publikovanými protiangiogénnymi efektami sEng a MMP12 (59, 196). Môžeme teda konštatovať, že prozápalové makrofágy pravdepodobne prispievajú odštepovaním Eng za pomoci MMP12 k rozvoju endotelovej dysfunkcie. Tento koncept by zapadal do našich publikovaných výsledkov z *in vitro* a *in vivo* štúdií, ktoré preukázali, že rozvoj endotelovej dysfunkcie a aterosklerózy (stavy kde možno očakávať aktiváciu prozápalových makrofágov) je sprevádzaný zvyšovaním hladín solubilného endoglínu.

Štúdie publikované v tejto dizertačnej práci poukazujú na dôležitú úlohu fyziologickej expresie membránového endoglínu na povrchu endotelových buniek. *In vitro* experimenty na endotelových bunkách preukázali, že zvýšenie hladín Eng postupne prispieva k rozvoju endotelovej dysfunkcie a zvýšeniu adhézie a transmigrácie monocytov na endotel. Naopak, zníženie expresie Eng na povrchu buniek má za následok poruchy tubulogenézy a spomalenie zacelenia endotelu po poškodení. Regulácia expresie Eng je teda esenciálna pre fyziologické fungovanie endotelu a akákoľvek dysbalancia vedie k poruchám jeho funkcie.

6. Závery

- Solubilný endoglin dokázal indukovať zápalovú reakciu charakterizovanú zvýšenou aktivitou NF- κ B a IL6, ktorá bola doprevádzaná zvýšenou expresiou membránového endoglinu. Tieto výsledky naznačujú úlohu membránového a solubilného Eng v procese rozvoja endotelovej dysfunkcie *in vitro*.
- Po podaní 7K dochádzalo k rozvoju fenotypu endotelovej dysfunkcie. Tento fenotyp bol charakterizovaný zvýšenou expresiou P/E-selektínov a ICAM-1 doprevádzanou zvýšenou adhéziou a transmigráciou monocytov cez endotelovú vrstvu. Tieto výsledky potvrdzujú, že oxidovaný cholesterol neenzymatického pôvodu je schopný vyvolať stav akútnej endotelovej dysfunkcie v podmienkach *in vitro*. Súčasne s rozvojom endotelovej dysfunkcie bol pozorovaný nárast expresie membránového endoglinu.
- Zvýšená expresia Eng bola sprevádzaná zvýšenou expresiou všetkých členov Eng/SMAD 2/3/eNOS signalizačnej kaskády. Taktiež dochádzalo k zvýšeniu expresie transkripčných faktorov KLF6, LXR a translokácií NF- κ B p65 z cytoplazmy do jadra buniek. Inhibícia ktoréhokoľvek transkripčného faktora viedla k zabráneniu 7K navodenej indukcií expresie Eng. Po utlmení expresie membránového endoglinu sme pozorovali zníženie adhézie a transmigrácie monocytov na endotelovú vrstvu. Toto zistenie potvrdzuje potenciálne zásadnú úlohu Eng v akútnej fáze rozvoja endotelovej dysfunkcie *in vitro*.
- Inkubácia endotelových buniek so supernatantmi z prozápalových makrofágov obsahujúcich vysoké hladiny MMP12 viedla k odštepovaniu sEng a zníženiu schopnosti endotelových buniek tvoriť cievy a zaceliť endotel po poranení. Tento koncept by mohol prispieť k objasneniu faktu, prečo sa hladiny solubilného endoglinu zvyšujú počas aterogenézy.

- Výsledky tejto dizertačnej práce potvrdzujú význam fyziologickej expresie membránového endoglínu a poukazujú na to, že akákoľvek dysbalancia v expresii Eng môže viesť k rozvoju patologických zmien v cievnom endoteli.

7. Prehľad publikačnej činnosti

Aristorena, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, de Las Casas-Engel, M., Ojeda-Fernandez, L., Nieto, C., J. Blanco, F., C. Valbuena-Diez, A., M. Botella, L., Nachtigal, P., L. Corbi, A., Colmenares, M., Bernabeu, C., (2019) MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells, *Int. J. Mol. Sci.* (IF=4.183 (Q2) AIS:0.932 (Q2)) DOI:10.3390/ijms20123107

Vicen, M., Vitverova, B., Havelek, R., Blazickova, K., Machacek, M., Rathouska, J., Najmanová, I., Dolezelova, E., Prasnicka, A., Sternak, M., Bernabeu, C., Nachtigal, P., (2019) Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro, *The FASEB Journal* vol. 33: 6099-6114. (IF=5.391 (Q1) AIS:1.676 (Q1)) DOI: [10.1096/fj.201802245R](https://doi.org/10.1096/fj.201802245R)

Vitverova, B., Blazickova, K., Najmanová, I., **Vicen, M.**, Hyšpler, R., Dolezelova, E., Nemeckova, I., Tebbens, J.D., Bernabeu, C., Pericacho, M., Nachtigal, P., (2018) Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta, *Atherosclerosis*, 271:15-25. (IF=4.255 (Q1) AIS:1.192 (Q1)) DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.008

Varejckova, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, Vitverová, B., Fikrová, P., Dolezelova, E., Rathouska, J., Prasnicka, A., Blazickova, K., Micuda, S., Bernabeu, C., Nemeckova, I., Nachtigal, P., (2017), Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF-Kb and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sciences*, 2017, vol. 175, s. 52-60. (IF=3.234 (Q2) AIS:0.664 (Q2)) DOI: [10.1016/j.lfs.2017.03.014](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.03.014)

Vitverova, B., Najmanova, I., **Vicen, M.**, Tripska, K., Sa, I.C.I., Hyspler, R., Pericacho, M., Nachtigal, P. (2020) Long term effects of soluble endoglin and mild hypercholesterolemia in mice hearts, *PLoS ONE* (IF=2.776 (Q2) AIS:0.978 (Q1)) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233725>

8. Prezentácie na konferenciách

Endoglin modulates adhesion and transmigration of monocytes in oxysterol induced endothelial dysfunction. Prezentácia na 10. Postgraduálnej a 8. postdoktorantskej konferencii, Hradec Králové, Česká republika, 22.-23.1.2020

Endoglin plays role in cholesterol-induced endothelial dysfunction and monocyte trafficking in Human aortic endothelial cells. Elektronický poster prezentovaný počas sekcie Science at a Glance na 87th EAS congress, Maastricht, Holandsko, 26.-29.5.2019

Endoglin is involved in cholesterol-induced endothelial dysfunction and monocyte adhesion in Human aortic endothelial cells. Prezentácia na 9. Postgraduálnej a 7. postdoktorantskej konferencii, Hradec Králové, Česká republika, 23.-24.1.2019

Endoglin role in oxysterol induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. Posterová prezentácia na 22. Kongrese o ateroskleróze, Olomouc, Česká republika, 6.-8.12.2018

Endoglin plays important role in 7-ketocholesterol induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. Posterová prezentácia na 68. Farmakologických dňoch, Hradec Králové, Česká republika, 5.-7.9.2018

Oxysterols of various origins affect membrane endoglin expression differently in human aortic endothelial cells. Posterová prezentácia na 86th EAS congress, Lisbon, Portugalsko, 5.-8.5.2018

Oxysterols affect Endoglin expression, inflammation and development of endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. Prezentácia na 8. Postgraduálnej a 6. Postdoktorantskej konferencii, Hradec Králové, Česká republika, 25.1.2018

7-ketocholesterol but not 22-hydroxycholesterol induce endoglin expression and endothelial dysfunction – like phenotype in human aortic endothelial cells. Posterová prezentácia na 21. Kongrese o ateroskleróze, Olomouc, Česká republika, 7.-9.12.2017

7-ketocholesterol effects on the expression of membrane endoglin, inflammation and its signalling in endothelial cells. Posterová prezentácia na 25th Kraków conference on Endothelium, Krakow, Polsko, 19-21.10.2017

Enzymatic and nonenzymatic oxysterols have different effects on inflammation and endoglin expression in human aortic endothelial cells. Posterová prezentácia na 67. Česko-Slovenských Farmakologických dňoch, Stará Lesná, Slovenská republika, 2.-4.10.2017

Dose dependent effect of 7-ketocholesterol treatment on the expression of the membrane endoglin and cell adhesion molecules in human aortic endothelial cells – pilot study. Posterová prezentácia na 12th International HHT Scientific Conference, Dubrovnik, Chorvátsko, 8.-11.7.2017

7-ketocholesterol treatment modulates expression of the cell adhesion molecules and endoglin in Human aortic endothelial cells –pilot study. Posterová prezentácia na 85th EAS congress, Praha, Česká republika, 23.-26.4.2017

9. Použitá literatúra

1. Roumenina, L. T., Rayes, J., Frimat, M., and Fremeaux-Bacchi, V. (2016) Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunol Rev* **274**, 307-329
2. Durand, M. J., and Gutterman, D. D. (2013) Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* **20**, 239-247
3. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., and Stern, D. M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-3561
4. Vane, J. R., Anggard, E. E., and Botting, R. M. (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* **323**, 27-36
5. Garland, C. J., Hiley, C. R., and Dora, K. A. (2011) EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol* **164**, 839-852
6. Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013) The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* **9**, 1057-1069
7. Barton, M., Baretella, O., and Meyer, M. R. (2012) Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *Br J Pharmacol* **165**, 591-602
8. Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Langa, C., and Bernabeu, C. (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* **277**, 43799-43808
9. Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L., and Bernabeu, C. (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* **276**, 38527-38535
10. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126

11. Sitia, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., Tramontana, S., Perticone, F., Naccarato, P., Camici, P., Picano, E., Cortigiani, L., Bevilacqua, M., Milazzo, L., Cusi, D., Barlassina, C., Sarzi-Puttini, P., and Turiel, M. (2010) From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* **9**, 830-834
12. Harrison, D. G. (1997) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* **100**, 2153-2157
13. Brady, A. J., and Poole-Wilson, P. A. (1993) Circulatory failure in septic shock. Nitric oxide: too much of a good thing? *Br Heart J* **70**, 103-105
14. Behrendt, D., and Ganz, P. (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* **90**, 40L-48L
15. Ogonowski, A. A., Kaesemeyer, W. H., Jin, L., Ganapathy, V., Leibach, F. H., and Caldwell, R. W. (2000) Effects of NO donors and synthase agonists on endothelial cell uptake of L-Arg and superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C136-143
16. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-689
17. Mestas, J., and Ley, K. (2008) Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* **18**, 228-232
18. Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., and Muller, W. A. (2004) Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol* **5**, 393-400
19. Gimbrone, M. A., Jr., and Garcia-Cardena, G. (2016) Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 620-636
20. Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**, 19027-19030
21. Santibanez, J. F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. (2011) TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* **121**, 233-251
22. Gougos, A., and Letarte, M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* **265**, 8361-8364

23. Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J., and Bernabeu, C. (2007) Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* **365**, 694-705
24. Garcia-Pozo, L., Miquilena-Colina, M. E., Lozano-Rodriguez, T., and Garcia-Monzon, C. (2008) [Endoglin: structure, biological functions, and role in fibrogenesis]. *Rev Esp Enferm Dig* **100**, 355-360
25. Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H959-974
26. Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, C., and Vary, C. P. (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **153**, 323-335
27. Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., Husain, M., and Letarte, M. (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* **96**, 684-692
28. Nachtigal, P., Zemankova Vecerova, L., Rathouska, J., and Strasky, Z. (2012) The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **224**, 4-11
29. Rossi, E., Pericacho, M., Bachelot-Loza, C., Pidard, D., Gaussem, P., Poirault-Chassac, S., Blanco, F. J., Langa, C., Gonzalez-Manchon, C., Novoa, J. M. L., Smadja, D. M., and Bernabeu, C. (2017) Human endoglin as a potential new partner involved in platelet-endothelium interactions. *Cell Mol Life Sci*
30. Rossi, E., Sanz-Rodriguez, F., Eleno, N., Duwell, A., Blanco, F. J., Langa, C., Botella, L. M., Cabanas, C., Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2013) Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* **121**, 403-415
31. Gallardo-Vara, E., Blanco, F. J., Roque, M., Friedman, S. L., Suzuki, T., Botella, L. M., and Bernabeu, C. (2016) Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis* **19**, 155-171
32. van Uden, P., Kenneth, N. S., and Rocha, S. (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* **412**, 477-484
33. Henry-Berger, J., Mouzat, K., Baron, S., Bernabeu, C., Marceau, G., Saru, J. P., Sapin, V., Lobaccaro, J. M., and Caira, F. (2008) Endoglin (CD105) expression is

- regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod* **78**, 968-975
34. Hawinkels, L. J., Kuiper, P., Wiercinska, E. et al. (2010) Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. In *Cancer research* pp. 4140-4150
 35. Aristorena, M., Gallardo-Vara, E., Vicen, M., de Las Casas-Engel, M., Ojeda-Fernandez, L., Nieto, C., Blanco, F. J., Valbuena-Diez, A. C., Botella, L. M., Nachtigal, P., Corbi, A. L., Colmenares, M., and Bernabeu, C. (2019) MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* **20**
 36. Velasco, S., Alvarez-Munoz, P., Pericacho, M., Dijke, P. T., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M., and Rodriguez-Barbero, A. (2008) L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* **121**, 913-919
 37. Blanco, F. J., Grande, M. T., Langa, C., Oujo, B., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Gomez, E., Quintanilla, M., Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2008) S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* **103**, 1383-1392
 38. Schoonderwoerd, M. J. A., Goumans, M. T. H., and Hawinkels, L. (2020) Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules* **10**
 39. Vandenbroucke, R. E., and Libert, C. (2014) Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov* **13**, 904-927
 40. Hawinkels, L. J., Kuiper, P., Wiercinska, E., Verspaget, H. W., Liu, Z., Pardali, E., Sier, C. F., and ten Dijke, P. (2010) Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* **70**, 4141-4150
 41. Newby, A. C. (2005) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* **85**, 1-31
 42. Johnson, J. L., Sala-Newby, G. B., Ismail, Y., Aguilera, C. M., and Newby, A. C. (2008) Low tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and high matrix metalloproteinase 14 levels defines a subpopulation of highly invasive foam-cell macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1647-1653

43. Thomas, A. C., Sala-Newby, G. B., Ismail, Y., Johnson, J. L., Pasterkamp, G., and Newby, A. C. (2007) Genomics of foam cells and nonfoamy macrophages from rabbits identifies arginase-I as a differential regulator of nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 571-577
44. Rajavashisth, T. B., Xu, X. P., Jovinge, S., Meisel, S., Xu, X. O., Chai, N. N., Fishbein, M. C., Kaul, S., Cercek, B., Sharifi, B., and Shah, P. K. (1999) Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* **99**, 3103-3109
45. Feinberg, M. W., Jain, M. K., Werner, F., Sibinga, N. E., Wiesel, P., Wang, H., Topper, J. N., Perrella, M. A., and Lee, M. E. (2000) Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem* **275**, 25766-25773
46. Blann, A. D., Wang, J. M., Wilson, P. B., and Kumar, S. (1996) Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **120**, 221-226
47. Blaha, M., Cermanova, M., Blaha, V., Jarolim, P., Andrys, C., Blazek, M., Maly, J., Smolej, L., Zajic, J., Masin, V., Zimova, R., and Rehacek, V. (2008) Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **197**, 264-270
48. Rathouska, J., Vecerova, L., Strasky, Z., Slanarova, M., Brackova, E., Mullerova, Z., Andrys, C., Micuda, S., and Nachtigal, P. (2011) Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* **64**, 53-59
49. Stransky, Z., Vecerova, L., Rathouska, J., et al. (2011) Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. In *Circ J* pp. 1747-1755
50. Vicen, M., Vitverova, B., Havelek, R., Blazickova, K., Machacek, M., Rathouska, J., Najmanova, I., Dolezelova, E., Prasnicka, A., Sternak, M., Bernabeu, C., and Nachtigal, P. (2019) Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro. *FASEB J* **33**, 6099-6114
51. Rathouska, J., Jezkova, K., Nemeckova, I., and Nachtigal, P. (2015) Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* **243**, 383-388

52. Li, Q., Lin, F., Ke, D., Cheng, Q., Gui, Y., Zhou, Y., Wu, Y., Wang, Y., and Zhu, P. (2019) Combination of Endoglin and ASCVD Risk Assessment Improves Carotid Subclinical Atherosclerosis Recognition. *J Atheroscler Thromb*
53. Charytan, D. M., Cinelli, A., and Zeisberg, E. M. (2015) Association of circulating angiogenesis inhibitors and asymmetric dimethyl arginine with coronary plaque burden. *Fibrogenesis Tissue Repair* **8**, 13
54. Blazquez-Medela, A. M., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M. A., Recio-Rodriguez, J. I., Sanchez-Rodriguez, A., Lopez-Novoa, J. M., and Martinez-Salgado, C. (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* **8**, 86
55. Bilir, B., Ekiz Bilir, B., Yilmaz, I., Soysal Atila, N., Yildirim, T., Kara, S. P., Gumustas, S. A., Orhan, A. E., and Aydin, M. (2016) Association of apelin, endoglin and endocan with diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **20**, 892-898
56. Doghish, A. S., Bassyouni, A. A., Mahfouz, M. H., Abd El-Aziz, H. G., and Zakaria, R. Y. (2019) Plasma endoglin in Type2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Metab Syndr* **13**, 764-768
57. Ekiz-Bilir, B., Bilir, B., Aydin, M., and Soysal-Atila, N. (2019) Evaluation of endocan and endoglin levels in chronic kidney disease due to diabetes mellitus. *Arch Med Sci* **15**, 86-91
58. Emeksiz, H. C., Bideci, A., Damar, C., Derinkuyu, B., Celik, N., Doger, E., Yuce, O., Ozmen, M. C., Camurdan, M. O., and Cinaz, P. (2016) Soluble Endoglin Level Increase Occurs Prior to Development of Subclinical Structural Vascular Alterations in Diabetic Adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* **8**, 313-320
59. Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K. H., Yuan, H. T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., and Karumanchi, S. A. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* **12**, 642-649
60. Varejckova, M., Gallardo-Vara, E., Vicen, M., Vitverova, B., Fikrova, P., Dolezelova, E., Rathouska, J., Prasnicka, A., Blazickova, K., Micuda, S., Bernabeu, C., Nemeckova, I., and Nachtigal, P. (2017) Soluble endoglin

- modulates the pro-inflammatory mediators NF-kappaB and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sci* **175**, 52-60
61. Walshe, T. E., Dole, V. S., Maharaj, A. S., Patten, I. S., Wagner, D. D., and D'Amore, P. A. (2009) Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1185-1192
 62. Kapur, N. K., Wilson, S., Yunis, A. A., Qiao, X., Mackey, E., Paruchuri, V., Baker, C., Aronovitz, M. J., Karumanchi, S. A., Letarte, M., Kass, D. A., Mendelsohn, M. E., and Karas, R. H. (2012) Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation* **125**, 2728-2738
 63. Lawera, A., Tong, Z., Thorikay, M., Redgrave, R. E., Cai, J., van Dinther, M., Morrell, N. W., Afink, G. B., Charnock-Jones, D. S., Arthur, H. M., Ten Dijke, P., and Li, W. (2019) Role of soluble endoglin in BMP9 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 17800-17808
 64. Morine, K. J., Qiao, X., York, S., Natov, P. S., Paruchuri, V., Zhang, Y., Aronovitz, M. J., Karas, R. H., and Kapur, N. K. (2018) Bone Morphogenetic Protein 9 Reduces Cardiac Fibrosis and Improves Cardiac Function in Heart Failure. *Circulation* **138**, 513-526
 65. Samanta, D., and Almo, S. C. (2015) Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity. *Cell Mol Life Sci* **72**, 645-658
 66. Dosquet, C., Weill, D., and Wautier, J. L. (1992) Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Fr Hematol* **34 Suppl**, S55-59
 67. Holthenrich, A., Drexler, H. C. A., Chehab, T., Nass, J., and Gerke, V. (2019) Proximity proteomics of endothelial Weibel-Palade bodies identifies novel regulator of von Willebrand factor secretion. *Blood* **134**, 979-982
 68. Leeuwenberg, J. F., Smeets, E. F., Neefjes, J. J., Shaffer, M. A., Cinek, T., Jeunhomme, T. M., Ahern, T. J., and Buurman, W. A. (1992) E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* **77**, 543-549
 69. Borsig, L. (2018) Selectins in cancer immunity. *Glycobiology* **28**, 648-655

70. Goliias, C., Tsoutsi, E., Matziridis, A., Makridis, P., Batistatou, A., and Charalabopoulos, K. (2007) Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo* **21**, 757-769
71. Henninger, D. D., Panes, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D. C., and Granger, D. N. (1997) Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* **158**, 1825-1832
72. Gahmberg, C. G., Fagerholm, S. C., Nurmi, S. M., Chavakis, T., Marchesan, S., and Gronholm, M. (2009) Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 431-444
73. Harjunpaa, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., and Fagerholm, S. C. (2019) Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol* **10**, 1078
74. Liu, G., Place, A. T., Chen, Z., Brovkovych, V. M., Vogel, S. M., Muller, W. A., Skidgel, R. A., Malik, A. B., and Minshall, R. D. (2012) ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration. *Blood* **120**, 1942-1952
75. Martin, S., Lampeter, E. F., and Kolb, H. (1994) A physiological role for circulating adhesion molecules? *Immunol Today* **15**, 141
76. de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Schwarting, R., and Springer, T. A. (1991) Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* **174**, 253-267
77. Nortamo, P., Li, R., Renkonen, R., Timonen, T., Prieto, J., Patarroyo, M., and Gahmberg, C. G. (1991) The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* **21**, 2629-2632
78. Holness, C. L., Bates, P. A., Little, A. J., Buckley, C. D., McDowall, A., Bossy, D., Hogg, N., and Simmons, D. L. (1995) Analysis of the binding site on intercellular adhesion molecule 3 for the leukocyte integrin lymphocyte function-associated antigen 1. *J Biol Chem* **270**, 877-884
79. Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H., and Lee, S. (2018) Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* **19**

80. Schlesinger, M., and Bendas, G. (2015) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int J Cancer* **136**, 2504-2514
81. Albelda, S. M., Muller, W. A., Buck, C. A., and Newman, P. J. (1991) Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **114**, 1059-1068
82. Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X., and Phillips, D. M. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* **178**, 449-460
83. Poli, G., Biasi, F., and Leonarduzzi, G. (2013) Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol* **1**, 125-130
84. Olkkonen, V. M., Beaslas, O., and Nissila, E. (2012) Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* **2**, 76-103
85. Gargiulo, S., Gamba, P., Testa, G., Leonarduzzi, G., and Poli, G. (2016) The role of oxysterols in vascular ageing. *J Physiol* **594**, 2095-2113
86. Staprans, I., Pan, X. M., Rapp, J. H., and Feingold, K. R. (2005) The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* **49**, 1075-1082
87. Staprans, I., Pan, X. M., Rapp, J. H., Grunfeld, C., and Feingold, K. R. (2000) Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor- and apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 708-714
88. Zmyslowski, A., and Szterk, A. (2017) Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. *Lipids Health Dis* **16**, 188
89. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., and Mangelsdorf, D. J. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728-731
90. Lehmann, J. M., Kliewer, S. A., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Oliver, B. B., Su, J. L., Sundseth, S. S., Winegar, D. A., Blanchard, D. E., Spencer, T. A., and Willson, T. M. (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* **272**, 3137-3140
91. Valbuena-Diez, A. C., Blanco, F. J., Oujó, B., Langa, C., Gonzalez-Nunez, M., Llano, E., Pendas, A. M., Diaz, M., Castrillo, A., Lopez-Novoa, J. M., and

- Bernabeu, C. (2012) Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* **126**, 2612-2624
92. Zhou, Q., Wasowicz, E., Handler, B., Fleischer, L., and Kummerow, F. A. (2000) An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* **149**, 191-197
93. Chalubinski, M., Zemanek, K., Skowron, W., Wojdan, K., Gorzelak, P., and Broncel, M. (2013) The effect of 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol on the integrity of the human aortic endothelial and intestinal epithelial barriers. *Inflamm Res* **62**, 1015-1023
94. Luchetti, F., Canonico, B., Cesarini, E., Betti, M., Galluzzi, L., Galli, L., Tippins, J., Zerbinati, C., Papa, S., and Iuliano, L. (2015) 7-Ketocholesterol and 5,6-secoesterol induce human endothelial cell dysfunction by differential mechanisms. *Steroids* **99**, 204-211
95. Brown, A. J., Mander, E. L., Gelissen, I. C., Kritharides, L., Dean, R. T., and Jessup, W. (2000) Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells. Accumulation of oxidized esters in lysosomes. *J Lipid Res* **41**, 226-237
96. Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., and Xu, X. (2017) Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett* **14**, 6999-7010
97. Butterfield, D. A., Yatin, S. M., Varadarajan, S., and Koppal, T. (1999) Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol* **309**, 746-768
98. Brown, D. R., Schmidt, B., and Kretschmar, H. A. (1996) A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* **18**, 59-67
99. Aksenova, M. V., Aksenov, M. Y., Mactutus, C. F., and Booze, R. M. (2005) Cell culture models of oxidative stress and injury in the central nervous system. *Curr Neurovasc Res* **2**, 73-89
100. Stern, D. M., Esposito, C., Gerlach, H., Gerlach, M., Ryan, J., Handley, D., and Nawroth, P. (1991) Endothelium and regulation of coagulation. *Diabetes Care* **14**, 160-166
101. Maruyama, Y. (1963) The human endothelial cell in tissue culture. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **60**, 69-79

102. Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Angelova Volponi, A., Dyszkiewicz-Konwinska, M., Piotrowska-Kempisty, H., Antosik, P., Bukowska, D., Bruska, M., Izycki, D., Zabel, M., Nowicki, M., and Kempisty, B. (2019) Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J Clin Med* **8**
103. Caniuguir, A., Krause, B. J., Hernandez, C., Uauy, R., and Casanello, P. (2016) Markers of early endothelial dysfunction in intrauterine growth restriction-derived human umbilical vein endothelial cells revealed by 2D-DIGE and mass spectrometry analyses. *Placenta* **41**, 14-26
104. Jaffe, E. A., Hoyer, L. W., and Nachman, R. L. (1973) Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **52**, 2757-2764
105. Jang, J., Jung, Y., Kim, Y., Jho, E. H., and Yoon, Y. (2017) LPS-induced inflammatory response is suppressed by Wnt inhibitors, Dickkopf-1 and LGK974. *Sci Rep* **7**, 41612
106. Patel, H., Chen, J., Das, K. C., and Kavdia, M. (2013) Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovasc Diabetol* **12**, 142
107. Walshe, T. E., dela Paz, N. G., and D'Amore, P. A. (2013) The role of shear-induced transforming growth factor-beta signaling in the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 2608-2617
108. Mannino, R. G., Qiu, Y., and Lam, W. A. (2018) Endothelial cell culture in microfluidic devices for investigating microvascular processes. *Biomicrofluidics* **12**, 042203
109. Baldwin, J. G., Wagner, F., Martine, L. C., Holzapfel, B. M., Theodoropoulos, C., Bas, O., Savi, F. M., Werner, C., De-Juan-Pardo, E. M., and Hutmacher, D. W. (2017) Periosteum tissue engineering in an orthotopic in vivo platform. *Biomaterials* **121**, 193-204
110. Bersini, S., Gilardi, M., Arrigoni, C., Talo, G., Zamai, M., Zagra, L., Caiolfa, V., and Moretti, M. (2016) Human in vitro 3D co-culture model to engineer vascularized bone-mimicking tissues combining computational tools and statistical experimental approach. *Biomaterials* **76**, 157-172

111. Rahman, N. A., Rasil, A., Meyding-Lamade, U., Craemer, E. M., Diah, S., Tuah, A. A., and Muharram, S. H. (2016) Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review. *Brain Res* **1642**, 532-545
112. Tentori, L., Vergati, M., Muzi, A., Levati, L., Ruffini, F., Forini, O., Vernole, P., Lacal, P. M., and Graziani, G. (2005) Generation of an immortalized human endothelial cell line as a model of neovascular proliferating endothelial cells to assess chemosensitivity to anticancer drugs. *Int J Oncol* **27**, 525-535
113. Edgell, C. J., McDonald, C. C., and Graham, J. B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3734-3737
114. Baranska, P., Jerczynska, H., Pawlowska, Z., Koziolkiewicz, W., and Cierniewski, C. S. (2005) Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926. *Cancer Genomics Proteomics* **2**, 265-269
115. Claise, C., Edeas, M., Chaouchi, N., Chalas, J., Capel, L., Kalimouttou, S., Vazquez, A., and Lindenbaum, A. (1999) Oxidized-LDL induce apoptosis in HUVEC but not in the endothelial cell line EA.hy 926. *Atherosclerosis* **147**, 95-104
116. Ando, J., and Kamiya, A. (1996) Flow-dependent regulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Jpn Heart J* **37**, 19-32
117. Kim, M., Choi, S. H., Jin, Y. B., Lee, H. J., Ji, Y. H., Kim, J., Lee, Y. S., and Lee, Y. J. (2013) The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Int J Radiat Biol* **89**, 356-363
118. Sasaguri, Y., Yanagi, H., Nagase, H., Nakano, R., Fukuda, S., and Morimatsu, M. (1991) Collagenase production by immortalized human aortic endothelial cells infected with simian virus 40. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **60**, 91-97
119. Jackson, C. J., and Nguyen, M. (1997) Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 1167-1177
120. Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., and Lawley, T. J. (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* **99**, 683-690

121. Krump-Konvalinkova, V., Bittinger, F., Unger, R. E., Peters, K., Lehr, H. A., and Kirkpatrick, C. J. (2001) Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest* **81**, 1717-1727
122. Thomas-Ecker, S., Lindecke, A., Hatzmann, W., Kaltschmidt, C., Zanker, K. S., and Dittmar, T. (2007) Alteration in the gene expression pattern of primary monocytes after adhesion to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5539-5544
123. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F., and Wang, H. (2014) Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* **2**, 1
124. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666-670
125. Auffray, C., Sieweke, M. H., and Geissmann, F. (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 669-692
126. Woollard, K. J., and Geissmann, F. (2010) Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* **7**, 77-86
127. Wong, K. L., Tai, J. J., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., Kourilsky, P., and Wong, S. C. (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16-31
128. Gerhardt, T., and Ley, K. (2015) Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res* **107**, 321-330
129. Imhof, B. A., and Aurrand-Lions, M. (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* **4**, 432-444
130. An, G., Wang, H., Tang, R., Yago, T., McDaniel, J. M., McGee, S., Huo, Y., and Xia, L. (2008) P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation* **117**, 3227-3237
131. Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., Luscinskas, F. W., and Rosenzweig, A.

- (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398**, 718-723
132. Lusinskas, F. W., Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., and Rosenzweig, A. (2000) C-C and C-X-C chemokines trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Ann N Y Acad Sci* **902**, 288-293
133. Carman, C. V., and Springer, T. A. (2004) A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* **167**, 377-388
134. Bogen, S., Pak, J., Garifallou, M., Deng, X., and Muller, W. A. (1994) Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med* **179**, 1059-1064
135. Bobryshev, Y. V., Ivanova, E. A., Chistiakov, D. A., Nikiforov, N. G., and Orekhov, A. N. (2016) Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int* **2016**, 9582430
136. Kalucka, J., Bierhansl, L., Wielockx, B., Carmeliet, P., and Eelen, G. (2017) Interaction of endothelial cells with macrophages-linking molecular and metabolic signaling. *Pflugers Arch* **469**, 473-483
137. Back, M., Weber, C., and Lutgens, E. (2015) Regulation of atherosclerotic plaque inflammation. *J Intern Med* **278**, 462-482
138. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**, 171-176
139. Qin, Z. (2012) The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* **221**, 2-11
140. Rogers, P. D., Thornton, J., Barker, K. S., McDaniel, D. O., Sacks, G. S., Swiatlo, E., and McDaniel, L. S. (2003) Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**, 2087-2094

141. Burke, B., Sumner, S., Maitland, N., and Lewis, C. E. (2002) Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. *J Leukoc Biol* **72**, 417-428
142. Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C. P., Lopez-Novoa, J. M., Attisano, L., and Bernabeu, C. (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* **210**, 456-468
143. Davignon, J., and Ganz, P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III27-32
144. Jerkic, M., and Letarte, M. (2015) Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells. *FASEB J* **29**, 3678-3688
145. Rossi, E., Smadja, D. M., Boscolo, E., Langa, C., Arevalo, M. A., Pericacho, M., Gamella-Pozuelo, L., Kauskot, A., Botella, L. M., Gaussem, P., Bischoff, J., Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2016) Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci* **73**, 1715-1739
146. Ojeda-Fernandez, L., Recio-Poveda, L., Aristorena, M., Lastres, P., Blanco, F. J., Sanz-Rodriguez, F., Gallardo-Vara, E., de las Casas-Engel, M., Corbi, A., Arthur, H. M., Bernabeu, C., and Botella, L. M. (2016) Mice Lacking Endoglin in Macrophages Show an Impaired Immune Response. *PLoS Genet* **12**, e1005935
147. Ratziu, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., Jensen, S., and Friedman, S. L. (1998) Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9500-9505
148. Suzuki, T., Yamamoto, T., Kurabayashi, M., Nagai, R., Yazaki, Y., and Horikoshi, M. (1998) Isolation and initial characterization of GBF, a novel DNA-binding zinc finger protein that binds to the GC-rich binding sites of the HIV-1 promoter. *J Biochem* **124**, 389-395
149. Kim, Y., Ratziu, V., Choi, S. G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S. J., and Friedman, S. L. (1998) Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* **273**, 33750-33758
150. Kojima, S., Hayashi, S., Shimokado, K., Suzuki, Y., Shimada, J., Crippa, M. P., and Friedman, S. L. (2000) Transcriptional activation of urokinase by the

- Kruppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood* **95**, 1309-1316
151. Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M. P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C. P., Ramirez, J. R., Friedman, S., and Bernabeu, C. (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* **100**, 4001-4010
 152. Date, D., Das, R., Narla, G., Simon, D. I., Jain, M. K., and Mahabeleshwar, G. H. (2014) Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. *J Biol Chem* **289**, 10318-10329
 153. Zhang, Y., Lei, C. Q., Hu, Y. H., Xia, T., Li, M., Zhong, B., and Shu, H. B. (2014) Kruppel-like factor 6 is a co-activator of NF-kappaB that mediates p65-dependent transcription of selected downstream genes. *J Biol Chem* **289**, 12876-12885
 154. Kim, G. D., Das, R., Goduni, L., McClellan, S., Hazlett, L. D., and Mahabeleshwar, G. H. (2016) Kruppel-like Factor 6 Promotes Macrophage-mediated Inflammation by Suppressing B Cell Leukemia/Lymphoma 6 Expression. *J Biol Chem* **291**, 21271-21282
 155. D'Ignazio, L., and Rocha, S. (2016) Hypoxia Induced NF-kappaB. *Cells* **5**
 156. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845
 157. Semenza, G. L., and Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-5454
 158. Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W., and Varesio, L. (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* **182**, 1683-1693
 159. Lee, S. D., and Tontonoz, P. (2015) Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis. *Atherosclerosis* **242**, 29-36
 160. Aravindhan, K., Webb, C. L., Jaye, M., Ghosh, A., Willette, R. N., DiNardo, N. J., and Jucker, B. M. (2006) Assessing the effects of LXR agonists on cellular cholesterol handling: a stable isotope tracer study. *J Lipid Res* **47**, 1250-1260

161. Liao, J. K., and Laufs, U. (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 89-118
162. Nachtigal, P., Pospisilova, N., Vecerova, L., Micuda, S., Brcakova, E., Pospechova, K., and Semecky, V. (2009) Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* **16**, 265-274
163. Zemankova, L., Varejckova, M., Dolezalova, E., Fikrova, P., Jezkova, K., Rathouska, J., Cerveny, L., Botella, L. M., Bernabeu, C., Nemeckova, I., and Nachtigal, P. (2015) Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin. *J Physiol Pharmacol* **66**, 403-413
164. Rosen, L. S., Hurwitz, H. I., Wong, M. K., Goldman, J., Mendelson, D. S., Figg, W. D., Spencer, S., Adams, B. J., Alvarez, D., Seon, B. K., Theuer, C. P., Leigh, B. R., and Gordon, M. S. (2012) A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 4820-4829
165. Liu, Y., Tian, H., Blobe, G. C., Theuer, C. P., Hurwitz, H. I., and Nixon, A. B. (2014) Effects of the combination of TRC105 and bevacizumab on endothelial cell biology. *Invest New Drugs* **32**, 851-859
166. Takahashi, N., Haba, A., Matsuno, F., and Seon, B. K. (2001) Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res* **61**, 7846-7854
167. Uneda, S., Toi, H., Tsujie, T., Tsujie, M., Harada, N., Tsai, H., and Seon, B. K. (2009) Anti-endoglin monoclonal antibodies are effective for suppressing metastasis and the primary tumors by targeting tumor vasculature. *Int J Cancer* **125**, 1446-1453
168. Kumar, S., Pan, C. C., Bloodworth, J. C., Nixon, A. B., Theuer, C., Hoyt, D. G., and Lee, N. Y. (2014) Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF-beta signaling. *Oncogene* **33**, 3970-3979

169. Sommers, C. D., Thompson, J. M., Guzova, J. A., Bonar, S. L., Rader, R. K., Mathialagan, S., Venkatraman, N., Holway, V. W., Kahn, L. E., Hu, G., Garner, D. S., Huang, H. C., Chiang, P. C., Schindler, J. F., Hu, Y., Meyer, D. M., and Kishore, N. N. (2009) Novel tight-binding inhibitory factor-kappaB kinase (IKK-2) inhibitors demonstrate target-specific anti-inflammatory activities in cellular assays and following oral and local delivery in an in vivo model of airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 377-388
170. Mbalaviele, G., Sommers, C. D., Bonar, S. L., Mathialagan, S., Schindler, J. F., Guzova, J. A., Shaffer, A. F., Melton, M. A., Christine, L. J., Tripp, C. S., Chiang, P. C., Thompson, D. C., Hu, Y., and Kishore, N. (2009) A novel, highly selective, tight binding IkappaB kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor-kappaB pathway in arthritis-relevant cells and animal models. *J Pharmacol Exp Ther* **329**, 14-25
171. Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M., and Jarvinen, T. (2005) Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2**, 335-351
172. Zidovetzki, R., and Levitan, I. (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1311-1324
173. Yokoo, M., Kubota, Y., Motoyama, K., Higashi, T., Taniyoshi, M., Tokumaru, H., Nishiyama, R., Tabe, Y., Mochinaga, S., Sato, A., Sueoka-Aragane, N., Sueoka, E., Arima, H., Irie, T., and Kimura, S. (2015) 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PLoS One* **10**, e0141946
174. Qi, X., Yuan, Y., Xu, K., Zhong, H., Zhang, Z., Zhai, H., Guan, G., and Yu, G. (2015) (2-Hydroxypropyl)-beta-Cyclodextrin Is a New Angiogenic Molecule for Therapeutic Angiogenesis. *PLoS One* **10**, e0125323
175. Coisne, C., Hallier-Vanuxeem, D., Boucau, M. C., Hachani, J., Tilloy, S., Bricout, H., Monflier, E., Wils, D., Serpelloni, M., Parissaux, X., Fenart, L., and Gosselet, F. (2016) beta-Cyclodextrins Decrease Cholesterol Release and ABC-Associated Transporter Expression in Smooth Muscle Cells and Aortic Endothelial Cells. *Front Physiol* **7**, 185
176. Zimmer, S., Grebe, A., Bakke, S. S., Bode, N., Halvorsen, B., Ulas, T., Skjelland, M., De Nardo, D., Labzin, L. I., Kerksiek, A., Hempel, C., Heneka, M. T.,

- Hawxhurst, V., Fitzgerald, M. L., Trebicka, J., Bjorkhem, I., Gustafsson, J. A., Westerterp, M., Tall, A. R., Wright, S. D., Espevik, T., Schultze, J. L., Nickenig, G., Lutjohann, D., and Latz, E. (2016) Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming. *Sci Transl Med* **8**, 333ra350
177. Coisne, C., Tilloy, S., Monflier, E., Wils, D., Fenart, L., and Gosselet, F. (2016) Cyclodextrins as Emerging Therapeutic Tools in the Treatment of Cholesterol-Associated Vascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **21**
178. Jang, Y. S., and Choi, I. H. (2014) Contrasting roles of different endoglin forms in atherosclerosis. *Immune network* **14**, 237-240
179. Nemeckova, I., Serwaczak, A., Oujó, B., Jezkova, K., Rathouska, J., Fikrova, P., Varejkova, M., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M., Chlopicki, S., and Nachtigal, P. (2015) High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PloS one* **10**, e0119665
180. Jezkova, K., Rathouska, J., Nemeckova, I., Fikrova, P., Dolezelova, E., Varejkova, M., Vitverova, B., Tysonova, K., Serwaczak, A., Buczek, E., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M., Chlopicki, S., and Nachtigal, P. (2016) High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas from Mice Fed a High-Fat Diet. *J Vasc Res* **53**, 149-162
181. Vitverova, B., Blazickova, K., Najmanova, I., Vicen, M., Hyspler, R., Dolezelova, E., Nemeckova, I., Tebbens, J. D., Bernabeu, C., Pericacho, M., and Nachtigal, P. (2018) Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis* **271**, 15-25
182. Hirashima, C., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Suzuki, H., Takahashi, K., Usui, R., and Suzuki, M. (2008) Alteration of serum soluble endoglin levels after the onset of preeclampsia is more pronounced in women with early-onset. *Hypertens Res* **31**, 1541-1548
183. Valbuena-Diez, A. C., Blanco, F.J., Oujó, B. et al. (2012) Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. In *Circulation* pp. 2612-2624
184. Lawrence, T. (2009) The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001651

185. Schmuth, M., Moosbrugger-Martinez, V., Blunder, S., and Dubrac, S. (2014) Role of PPAR, LXR, and PXR in epidermal homeostasis and inflammation. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 463-473
186. Schulman, I. G. (2017) Liver X receptors link lipid metabolism and inflammation. *FEBS Lett* **591**, 2978-2991
187. Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006) Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* **116**, 607-614
188. Castrillo, A., Joseph, S. B., Marathe, C., Mangelsdorf, D. J., and Tontonoz, P. (2003) Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* **278**, 10443-10449
189. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., and Tontonoz, P. (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* **9**, 213-219
190. Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E. G., Landreth, G. E., Vinters, H. V., and Tontonoz, P. (2007) Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10601-10606
191. Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., and Mangelsdorf, D. J. (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 266-271
192. Yang, C., McDonald, J. G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E. J., Covey, D. F., Mangelsdorf, D. J., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* **281**, 27816-27826
193. Ruiz-Llorente, L., Gallardo-Vara, E., Rossi, E., Smadja, D. M., Botella, L. M., and Bernabeu, C. (2017) Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Expert Opin Ther Targets* **21**, 933-947
194. Amaral, J., Lee, J. W., Chou, J., Campos, M. M., and Rodriguez, I. R. (2013) 7-Ketocholesterol induces inflammation and angiogenesis in vivo: a novel rat model. *PLoS One* **8**, e56099

195. Huang, J. D., Amaral, J., Lee, J. W., and Rodriguez, I. R. (2014) 7-Ketocholesterol-induced inflammation signals mostly through the TLR4 receptor both in vitro and in vivo. *PLoS One* **9**, e100985
196. D'Alessio, S., Fibbi, G., Cinelli, M., Guiducci, S., Del Rosso, A., Margheri, F., Serrati, S., Pucci, M., Kahaleh, B., Fan, P., Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Matucci-Cerinic, M., and Del Rosso, M. (2004) Matrix metalloproteinase 12-dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis Rheum* **50**, 3275-3285

10. Podiel predkladateľa na publikovaných prácach

zahrnutých v dizertačnej práci

Aristorena, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, de Las Casas-Engel, M., Ojeda-Fernandez, L., Nieto, C., J. Blanco, F., C. Valbuena-Diez, A., M. Botella, L., Nachtigal, P., L. Corbi, A., Colmenares, M., Bernabeu, C., (2019) MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells, *Int. J. Mol. Sci.* (IF=4.183 (Q2) AIS:0.932 (Q2)) doi:10.3390/ijms20123107

- Príprava buniek ku štúdiu
- Vykonanie experimentov tubulogenézy a hojenia poškodeného endotelu spoločne s fotodokumentáciou
- Podiel na analýze dát
- Podiel na spísaní publikácie

Vicen, M., Vitverova, B., Havelek, R., Blazickova, K., Machacek, M., Rathouska, J., Najmanová, I., Dolezelova, E., Prasnicka, A., Sternak, M., Bernabeu, C., Nachtigal, P., (2019) Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro, *The FASEB Journal vol. 33: 6099-6114* (IF=5.391 (Q1) AIS:1.676 (Q1)) DOI: [10.1096/fj.201802245R](https://doi.org/10.1096/fj.201802245R)

- Príprava buniek na experimenty vrátane transfekcie
- Flow cytometria
- PCR pre *in vitro* časť štúdie
- ELISA analýza pre *in vitro* časť štúdie
- Vytvorenie postupov a uskutočnenie experimentov adhézie a transmigrácie
- Vytvorenie protokolov a uskutočnenie imunocytochemických experimentov
- Hlavný podiel na analýze dát pre *in vitro* časť štúdie
- Hlavný podiel na spísaní textu publikácie pre *in vitro* časť štúdie

Varejkova, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, Vitverová, B., Fikrová, P., Dolezelova, E., Rathouska, J., Prasnicka, A., Blazickova, K., Micuda, S., Bernabeu, C., Nemeckova, I., Nachtigal, P., (2017), Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF-Kb and IL-6 in cultured human endothelial cells. Life Sciences, 2017, vol. 175, s. 52-60. ISSN 0024-3205. (IF=3,234Q2 AIS:0.664Q2) DOI: 10.1016/j.lfs.2017.03.014

- Príprava buniek ku štúdiu
- Flow cytometria
- Podiel na analýze dát
- Podiel na texte publikácie

11. Súbtor publikovaných prác

- I. Aristorena, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, de Las Casas-Engel, M., Ojeda-Fernandez, L., Nieto, C., J. Blanco, F., C. Valbuena-Diez, A., M. Botella, L., Nachtigal, P., L. Corbi, A., Colmenares, M., Bernabeu, C., (2019) MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells, *Int. J. Mol. Sci.* (IF=4.183 (Q2) AIS:0.932 (Q2)) doi:10.3390/ijms20123107
- II. **Vicen, M.**, Vitverova, B., Havelek, R., Blazickova, K., Machacek, M., Rathouska, J., Najmanová, I., Dolezelova, E., Prasnicka, A., Sternak, M., Bernabeu, C., Nachtigal, P., (2019) Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro, *The FASEB Journal vol. 33: 6099-6114* (IF=5.391 (Q1) AIS:1.676 (Q1)) DOI: [10.1096/fj.201802245R](https://doi.org/10.1096/fj.201802245R)
- III. Varejckova, M., Gallardo-Vara, E., **Vicen, M.**, Vitverová, B., Fikrová, P., Dolezelova, E., Rathouska, J., Prasnicka, A., Blazickova, K., Micuda, S., Bernabeu, C., Nemeckova, I., Nachtigal, P., (2017), Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF-Kb and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sciences*, 2017, vol. 175, s. 52-60. ISSN 0024-3205. (IF=3,234 (Q2) AIS:0.664 (Q2)) DOI: 10.1016/j.lfs.2017.03.014