

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LEKÁRSKÝCH VIED



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Vplyv dlhodobého pôsobenia solubilného endoglínu
na expresiu adhézných molekúl
cievneho endotelu**

Dominika Tuschlová

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Iveta Najmanová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Pod'akovanie

Rada by som sa pod'akovala hlavne mojej školiteľke PharmDr. Ivete Najmanovej, Ph.D. za odborné vedenie tejto diplomovej práce, za jej profesionálne rady, pripomienky a hlavne za ochotu a poskytnutý čas. Pod'akovanie patrí aj výskumnej skupine patológie a farmakológie kardiovaskulárneho systému a personálu vivárií. V neposlednom rade sa chcem pod'akovať mojej rodine, ktorá mi bola oporou počas celej doby štúdia.

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa:

Podpis:

ABSTRAKT

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

Názov diplomovej práce: Vplyv dlhodobého pôsobenia solubilného endoglínu na expresiu adhézných molekúl cievneho endotelu

Autor diplomovej práce: Dominika Tuschlová

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Iveta Najmanová, Ph.D.

Cieľ práce: Cieľom diplomovej práce bolo zistiť, aký vplyv má dlhodobé pôsobenie solubilného endoglínu (sEng) na expresiu adhézných molekúl cievneho endotelu (ICAM-1, VCAM-1, P-selektín). Pracovali sme s kontrolnou a s experimentálnou skupinou myší chovaných na štandardnej diéte, ktoré sa líšili hladinami sEng.

Metódy práce: Na analýzu boli použité geneticky modifikované samice myší z kmeňa CBAXC57BL/6J s vysokou produkciou ľudského sEng. Tieto myši tvorili experimentálnu skupinu, zatiaľ čo myši s nízkou hladinou sEng tvorili skupinu kontrolnú. Išlo o 12 mesačné samice. Biochemickú analýzu sme využili na zistenie hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolov (TAG). Pomocou ELISA analýzy boli stanovené hladiny markérov sVCAM-1 u všetkých skúmaných myší a expresiu adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín sme sledovali a vyhodnotili pomocou metódy Western blot, kde ako kontrolu sme používali štrukturálny proteín GAPDH.

Výsledky práce: Biochemická analýza nepreukázala výrazný rozdiel medzi transgénnyimi myšami so zvýšeným sEng a kontrolnou skupinou myší, bez zvýšeného sEng. Signifikantný rozdiel medzi pozorovanými skupinami nepreukázala ani ELISA analýza. Podobne aj analýza Western blot nepreukázala signifikantný rozdiel v expresii molekuly ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín.

Záver: Na základe výsledkov nemôžeme potvrdiť našu hypotézu. Zistili sme, že dlhodobé pôsobenie sEng nemá značný dopad na dysfunkciu endotelu a zároveň, že vysoké hodnoty endoglínu v plazme nemajú výrazný vplyv na expresiu adhézných molekúl cievneho endotelu ICAM-1, VCAM-1 a P-selektínu.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Effect of long-term exposure to soluble endoglin on the expression of adhesion molecules on endothelial cells

Author of Diploma Thesis: Dominika Tuschlová

Supervisor of Diploma Thesis: PharmDr. Iveta Najmanová, Ph.D.

Background: The aim of this thesis was to find out the effect of long-term exposure to soluble endoglin (sEng) on the expression of adhesion molecules on endothelial cells (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin). We have worked with a control and experimental group of mice on a standard diet, with different levels of sEng.

Methods: Genetically modified female mice from the CBAxC57BL/6J strain with high production of human sEng were used for analysis. These mice formed an experimental group, while mice with a low level of sEng formed a control group. They were 12 months old females. We used biochemical analysis to determine the level of total cholesterol and triacylglycerols (TAG). Levels of sVCAM-1 markers in all mice studied were determined by ELISA. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin was monitored and evaluated by Western blotting, where the structural protein GAPDH was used as a control.

Results: Biochemical analysis did not show a significant difference between the transgenic mice with increased sEng and the control group of mice, without increased sEng. ELISA analysis did not show any significant difference between the observed groups. Similarly, Western blot analysis did not show a significant difference in expression of the ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin molecules.

Conclusions: Based on the results, we cannot confirm our hypothesis. We have found that the long-term exposure of sEng has no significant impact on endothelial dysfunction and that high plasma endoglin values have no significant effect on the expression of adhesion molecules endothelial cells ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin.

Obsah

1. ÚVOD	- 8 -
2. CIEĽ PRÁCE	- 9 -
3. TEORETICKÁ ČASŤ	- 10 -
3.1. KRVNÉ CIEVY	- 10 -
3.2. OBECNÁ STAVBA CIEV – HISTOLOGICKÁ STAVBA CIEV	- 10 -
3.3. ŠPECIFICKÁ STAVBA CIEV	- 11 -
3.3.1. <i>Artérie</i>	- 12 -
3.3.2. <i>Vény</i>	- 13 -
3.3.3. <i>Kapiláry</i>	- 15 -
3.3.4. <i>Lymfatické cievy</i>	- 17 -
3.4. ENDOTEL	- 18 -
3.4.1. <i>Fyziologická funkcia endotelu</i>	- 19 -
3.4.2. <i>Endotelová dysfunkcia</i>	- 19 -
3.5. ADHÉZNE MOLEKULY	- 20 -
3.5.1. <i>VCAM-1 (CD106)</i>	- 21 -
3.5.2. <i>ICAM-1 (CD54)</i>	- 22 -
3.5.3. <i>P-selektín (CD62P)</i>	- 24 -
3.6. ENDOGLÍN (CD105).....	- 25 -
3.6.1. <i>Regulácia endoglinovej expresie</i>	- 27 -
3.6.2. <i>TGF-β signalizačná dráha</i>	- 27 -
3.7. SOLUBILNÝ ENDOGLÍN.....	- 29 -
3.8. WESTERN BLOT.....	- 30 -
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	- 32 -
4.1. ZVIERATÁ	- 32 -
4.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	- 33 -
4.3. ELISA ANALÝZA	- 33 -
4.4. WESTERN BLOT.....	- 33 -
4.4.1. <i>Homogenizácia vzorkov</i>	- 33 -
4.4.2. <i>Stanovenie koncentrácie proteínov vo vzorku</i>	- 34 -
4.4.3. <i>Príprava gélov</i>	- 35 -

4.4.4. <i>Príprava vzoriek a aplikácia na gél</i>	- 38 -
4.4.5. <i>Blotovanie – prenos proteínov na membránu</i>	- 38 -
4.4.6. <i>Imunodetekcia</i>	- 40 -
4.4.7. <i>Chemiluminiscencia</i>	- 42 -
5. VÝSLEDKY	- 44 -
5.1. VÁHA.....	- 44 -
5.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA HLADÍN CELKOVÉHO CHOLESTEROLU	- 44 -
5.3. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA HLADÍN TRIACYLGLYCEROLOV (TAG).....	- 45 -
5.4. ELISA ANALÝZA HLADÍN sVCAM-1	- 46 -
5.5. WESTERN BLOT ANALÝZA.....	- 47 -
5.5.1. <i>Western blot analýza molekuly ICAM-1</i>	- 47 -
5.5.2. <i>Western blot analýza molekuly VCAM-1</i>	- 48 -
5.5.3. <i>Western blot analýza molekuly P-selektín</i>	- 49 -
6. DISKUSIA	- 51 -
7. ZÁVER	- 53 -
8. POUŽITÉ SKRATKY	- 54 -
9. ZOZNAM OBRÁZKOV	- 56 -
10. ZOZNAM TABULIEK	- 56 -
11. ZOZNAM GRAFOV	- 56 -
12. POUŽITÁ LITERATÚRA	- 58 -

1. ÚVOD

Kardiovaskulárne ochorenia predstavujú hlavnú príčinu úmrtí a chorobnosti na celom svete. Každoročne spôsobujú až 16,7 milióna úmrtí (1). Primárnou príčinou ochorenia je ateroskleróza a jej manifestácie. Ateroskleróza je chronické zápalové ochorenie krvných ciev a predstavuje jeden z najvýznamnejších zdravotných problémov (2). V dnešnej dobe vnímame aterosklerózu ako imunitnú odpoveď na narušenú funkciu endotelu (1).

Endotel hrá dôležitú úlohu pri regulácii vaskulárnej homeostázy. Za fyziologického stavu produkuje látky s antiaterosklerotickými vlastnosťami. Preto je prítomnosť endotelovej dysfunkcie spojená s aterosklerózou a so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych chorôb (3). Endotelové bunky produkujú a reagujú na rôzne biologicky aktívne látky, ktoré majú vplyv na cievnu permeabilitu, cievny tonus, hemostázu, fibrinolýzu či angiogénu. Poškodenie alebo aktivácia endotelových buniek narúša tieto normálne regulačné mechanizmy a vedie k morfológickým a funkčným zmenám, a teda k endotelovej dysfunkcii (4). Endotelová dysfunkcia je charakterizovaná posunom účinkov endotelu smerom k zníženej vazodilatácii, prozápalovému stavu a protrombotickým vlastnostiam.

Cievny endotel hrá rozhodujúcu úlohu pri modulácii zápalovej reakcie. Endotelové bunky sú aktivované cytokínmi, aby exprimovali bunkové adhézne molekuly. Bunkové adhézne molekuly zabezpečujú a uľahčujú prilnutie zápalových buniek z obehu a ich transendotelovú migráciu na miesto zápalu (5). V tejto diplomovej práci sme sa bližšie venovali expresii adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektínu.

V aterosklerotických cievach, prevažne v endotelových bunkách a v bunkách hladkého svalstva v rôznych typoch krvných ciev bola preukázaná expresia endoglínu. Endoglin je homodimérny transmembránový glykoproteín a je ko-receptorom pre transformujúce rastové faktory (6). Do obehu sa uvoľňuje z bunkovej membrány ako rozpustný endoglin (sEng). Jeho hladiny sú zvýšené počas rôznych patologických stavov cievneho endotelu a ukázalo sa, že plazmatické koncentrácie sEng možno považovať za biomarkér poškodenia endotelu (7).

Táto práca je venovaná téme vplyvu dlhodobého pôsobenia solubilného endoglínu na expresiu adhézných molekúl cievneho endotelu.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, aký vplyv má dlhodobé pôsobenie solubilného endoglínu (sEng) na expresiu adhézných molekúl cievneho endotelu (ICAM-1, VCAM-1, P-selektín) v aorte myší. Na analýzu boli použité geneticky modifikované 12 mesačné samice myší z kmeňa CBAxC57BL/6J s vysokou produkciou ľudského sEng. Tieto myši tvorili experimentálnu skupinu, zatiaľ čo myši s nízkou hladinou sEng tvorili skupinu kontrolnú. Obidve skupiny myší boli chované na štandardnej diéte.

Biochemickú analýzu sme využili na zistenie hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolov (TAG). Pomocou ELISA analýzy boli stanovené hladiny markérov sVCAM-1 u všetkých skúmaných myší a expresiu adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín sme sledovali a vyhodnotili pomocou metódy Western blot.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Krvné cievy

Kardiovaskulárny systém je tvorený srdcom, krvnými a lymfatickými cievami (8). Krvné cievy delíme na artérie, ktorých funkcia je privádzať kyslík a výživné látky do systémového a pľúcneho obehu, vény, ktoré prenášajú krv s obsahom oxidu uhličitého a produktov metabolizmu naspäť do srdca a kapiláry, sieť medzi artériami a vénami, ktoré zabezpečujú výmenu látok medzi krvou a tkanivami (8, 9).

Krvné cievy sa v niektorých parametroch odlišujú a sú prispôsobené fyziologickým potrebám. Napríklad pľúcne artérie majú tenšiu stenu ako systémové artérie, kvôli odlišnosti tlakov v cievach (10).

3.2. Obecná stavba ciev – histologická stavba ciev

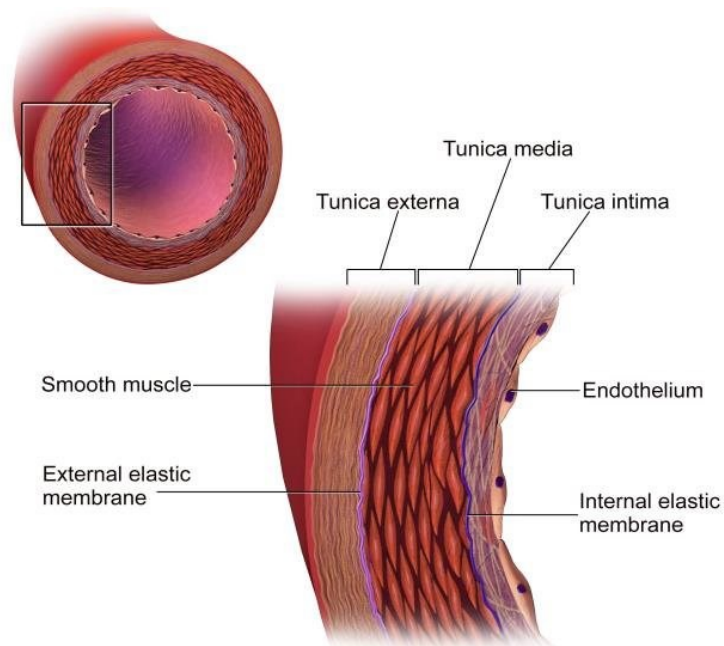
Stena ciev je zložená z tunica intima, tunica media a tunica adventitia. Najvnútornejšia časť cievy tunica intima je v kontakte s krvou a je tvorená endotelom a subendotelovou vrstvou. Endotel je tvorený jednou vrstvou plochých endotelových buniek, ktoré sú pretiahnuté v smere toku krvi a sú uložené na bazálnej lamine. Riedke kolagénové väzivo je súčasťou subendotelu (8, 9).

Stredná vrstva tunica media je tvorená z koncentrických vrstiev hladkých svalových buniek a priestory medzi nimi vyplňajú elastické a kolagénové vlákna a proteoglykany. V kapilárach je táto tunica zastúpená bunkami, ktoré sa nazývajú pericyty (10).

Povrch cievy tvorí tunica adventitia (externa), ktorá je tvorená kolagénovými a elastickými vláknami (8). Súčasťou adventície a vonkajšej vrstvy tunica media u veľkých ciev, prevažne vo vénach, sú cievy ciev (vasa vasorum). Ich funkciou je zásobovať tieto vrstvy metabolitmi, pretože cez ich silné vrstvy potrebné látky neprejdú. Na vazokonstrikcii a vazodilatácii ciev sa podieľajú nervy ciev (nervi vasorum), ktoré inervujú vény a artérie.

V adventícii sa nachádza kolagén typu I a v medii typu II. V artériach nájdeme medzi tunicou intimou a tunicou mediou dvojrozmernú sieť lamina elastica-interna, ktorá je tvorená elastínom a je fenestrovaná, čo umožňuje difúziu látok (10). Tenšia lamina elastica-externa medzi tunicou mediou a tunicou adventiciou je viditeľne vytvorená iba v mohutných artériach (11). Histologická stavba ciev je zobrazená na obrázku č. 1.

Obrázok č. 1: Priečny rez krvnej cievy



Smooth muscle – hladká svalovina, External elastic membrane – vonkajšia elastická membrána, Internal elastic membrane – Vnútorňa elastická membrána, Endothelium – endotel, Tunica externa, media, intima – Vonkajšia, stredná a vnútorná vrstva.

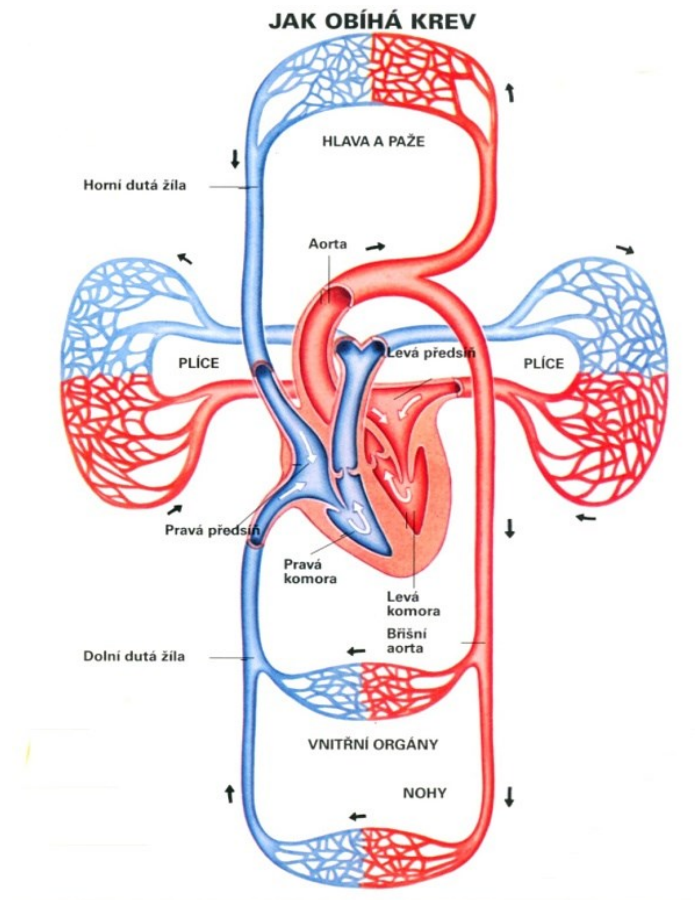
Prevzaté z: (12)

3.3. Špecifická stavba ciev

Na transport živín, plynov, tepla, metabolitov, hormónov a iných potrebných látok po celom tele naše telo využíva krv. Krv zo srdca vychádza z ľavej komory hlavnou artériou aortou, ktorá sa postupne vetví na čoraz užšie cievy, arterioly. Tie prechádzajú do siete kapilár, ktoré zabezpečujú výmenu látok medzi krvou a tkanivami. Následne odkysličená krv sa vracia venulami, ktoré sa spájajú do väčších a mohutnejších vén až vzniká horná a dolná dutá žila, ktoré prichádzajú do srdca, presnejšie do pravej predsene. Do pľúc prichádza krv kvôli okysličeniu a okysličená krv pokračuje naspäť do srdca, do ľavej predsene (11). Túto zložitú sieť ciev a srdca popisuje obrázok č. 2.

V tesnej blízkosti krvných ciev sa nachádzajú cievy lymfatické, ktoré vznikajú v slepo zakončených kanálikoch v tkanive a končia v krvných cievach v blízkosti srdca. Za úlohu majú odvádzať prebytočný tkanivový mok do krvného obehu (10).

Obrázok č. 2: Krvný obeh



Ako obieha krv v našom tele - artérie červené, vény modré.

Prevzaté z: (13)

3.3.1. Artérie

Artérie sú cievy, ktoré odvádzajú krv zo srdca do periférie. Tie cievy, ktoré vychádzajú z ľavej komory patria do systému aortálneho a tie cievy, ktoré vychádzajú z pravej komory do systému pulmonálneho (14). Podľa veľkosti rozlišujeme 4 typy artérií. Arterioly, svalové artérie malého kalibru, svalové artérie stredného kalibru a veľké artérie elastického typu. V porovnaní s vénami sú steny artérií silnejšie (10).

Prvým typom sú arterioly, cievy s priemerom menším ako 0,5 mm a so širokou a pružnou stenou (9). Lumen je vystlaný endotelom a subendotelová vrstva je veľmi tenká (10). Membranu elasticu internu nájdeme iba u väčších arterioli a membrana elastica externa v tomto type artérií nie je ešte vyvinutá. Jedna až päť vrstiev hladných svalových buniek tvorí tunicu mediu (9). Tieto vrstvy sú usporiadané cirkulárne. Najvrchnejšia vrstva tunica adventitia je veľmi tenká.

Ďalšími typmi sú artérie, ktoré tvoria väčšinu artérií v tele človeka. Nazývame ich artérie svalového typu, pretože tunica media môže byť tvorená až 40 vrstvami hladkých svalových buniek. Môžeme tu nájsť elastické membrány, retikulárne vlákna, či proteoglykany (10). Podľa priesvitu ich delíme na artérie malého kalibru s priesvitom 0,5-2 mm a artérie stredného kalibru s priesvitom 2-10 mm (9). Tunica intima je podobná ako u arteriol, s tým rozdielom, že subendotelová vrstva je trošku hrubšia a môže obsahovať hladké svalové bunky. Pri tomto type artérií je už membrana elastica intima úplne vyvinutá, ale membrana elastica externa je viditeľná iba vo väčších svalových artériách (10). Kolagénové a elastické vlákna spolu s fibroblastami a tukovými bunkami adipocytmi vytvárajú tunicu adventiciu. V stenách sú badateľné cievy ciev, lymfatické kapiláry a nervové vlákna, ktoré niekedy zasahujú až do najvrchnejšej časti tunica media (9, 10). Tento typ ciev zabezpečuje prenos krvi až k orgánom (9).

Posledným typom sú veľké artérie elastického typu, ktorých tunica media je tvorená veľkým množstvom elastínu, ktorý spôsobuje načílné sfarbenie na priereze. Počet elastických membrán rastie s vekom (zo 40 až na 70) a nazývajú sa membranae fenestratae, pretože obsahujú otvory (9, 10). Vekom dochádza aj k ďalšiemu ukladaniu elastínu a vzhľadom k tomu sú tieto artérie čoraz silnejšie. Takýmto typom artérií je aorta, jej veľké vetvy a truncus pulmonalis (9). Tunica intima je silnejšia ako v predchádzajúcich typoch artérií (10). Subendotelová vrstva je hrubá a niekedy dosahuje až 100 µm (9). Súčasťou veľkých artérií elastického typu sú aj hladké svalové bunky, retikulárne vlákna a základná hmota, ktorá obsahuje chondroitín sulfát. Membrana elastica externa je ťažko odlišiteľná od elastických vlákien. Tunica adventitia je tenká a je tvorená elastickými a kolagénovými vláknami. Je veľmi málo vyvinutá a dá sa povedať, že miestami táto vrstva úplne chýba. Majú významnú úlohu pružníka, čo vyplýva z vysokého obsahu elastických vlákien. Zabezpečujú tok krvi v priebehu diastoly a vyrovnávajú veľké tlakové rozdiely (9, 10).

3.3.2. *Vény*

Vény sú na rozdiel od artérií cievy tenkostenné a majú slabšiu stenu (9). Ich úlohou je navracat' krv z periférie do srdca pomocou hladkého svalstva a chlopní (10). Delíme ich na venuly, malé, stredné a veľké vény. U artérií je najhrubšou vrstvou tunica media, zatiaľ čo u vén tunica adventitia. Membrana elastica interna a externa u vén nie sú pozorované.

Prvým typom vén sú venuly s priemerom 0,2-1 mm. Tunica intima sa skladá z endotelu a z veľmi malej časti subendotelu (9). Tunica media je zložená z tenkej vrstvy

hladkej svaloviny alebo v niektorých prípadoch hladká svalovina úplne chýba. Najsilnejšou vrstvou je tunica adventia, ktorá je tvorená kolagénovými vláknami (10).

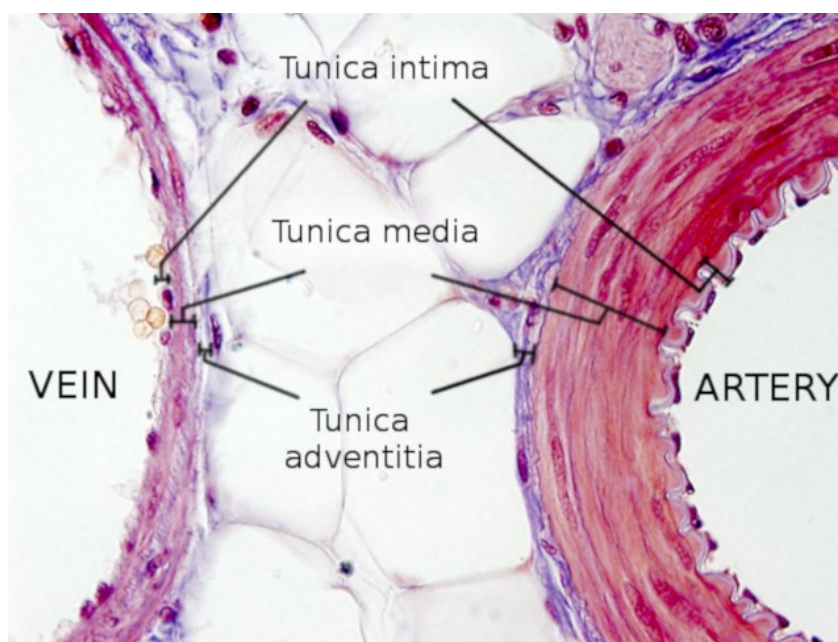
Prechod kapilár na postkapilárne vény je postupný. Postkapilárne vény (do 50 μm) majú stavebné a ostatné biologické vlastnosti totožné s kapilármi, prechádzajú na zberacie venuly (50-100 μm) a tie pokračujú na muskulárne venuly (do 200 μm) (9, 10). Až potom nasledujú už vyššie popísané skutočné venuly (0,2-1 μm) (9).

Väčšina vén je malého alebo stredného typu s priemerom 1-9 mm (10). Tunica intima je tvorená endotelom a subendotelovou vrstvou, ktorá ale môže aj úplne chýbať. Tunica media je tvorená z buniek hladkého svalstva, z retikulárnych a elastických vlákien. Tunica adventitia obsahuje kolagénové vlákna a môže obsahovať aj bunky hladkého svalstva (9, 10). V tomto type vén sú typické výchličky vrstvy tunica intima, ktoré nazývame chlopne (9). Dve polmesiačikové chlopne ležiace oproti sebe, ktoré umožňujú voľný tok krvi k srdcu a bránia spätnému toku (11). Vo vyššom zastúpení sa vyskytujú prevažne vo vénach dolných končatín.

Posledným typom vén sú veľké vény, ktoré majú priemer 10 mm a viac. Pre nich je charakteristická dobre vyvinutá tunica intima (10). Tá je tvorená endotelom a subendotelová vrstva je hrubšia ako pri predchádzajúcom type. Môžu byť prítomné aj bunky hladkého svalstva. Hladké svalové bunky sú súčasťou aj vrstvy tunica media, ktorá je ešte tenšia ako u malých vén (9, 10). Obsahuje aj vysoké množstvo väziva. Najsilnejšia a najlepšie vyvinutá vrstva je tunica adventitia (10). Vény sú bohatšie na cievy ciev v porovnaní s artériami, ale naopak inervácia vén je chudobnejšia (11).

Vo veľkých vénach pod srdcom je adventitia tvorená zväzkami buniek hladkého svalstva, ktoré robia stenu pevnejšou a zabraňujú tak rozťahnutiu cievy. Typické usporiadanie buniek hladkého svalstva spolu s chlopňami zabezpečujú tok krvi proti gravitácii, zdola nahor smerom do srdca (9, 10). K ľahšiemu toku krvi prispieva aj kontrakcia okolitých kostrových svalov (9). Porovnanie stavby tepien a žíl zobrazuje obrázok č. 3.

Obrázok č. 3: Zobrazenie vrstiev tunica intima, media a adventitia vo véne (vľavo) a v artérii (vpravo)



Vein – žila, Artery – tepna, Tunica intima, media, adventitia- vnútorná, stredná a vonkajšia vrstva. Prezaté z: (15)

3.3.3. Kapiláry

Kapiláry (vlásočnice) obsahujú iba jednu vrstvu endotelových buniek, bazálnu laminu a pericyty (Rougetove bunky) (11). Pericyty sú mezenchýmové bunky, ktoré v týchto malých cievach nahrádzajú vrstvu tunica media (10). Nachádzajú sa na rôznych miestach pozdĺž kapilár a malých venúl. Majú dlhé výbežky a niekedy môžu splývať s bazálnou laminou endotelových buniek. Súčasťou týchto buniek je aj aktín, myosín a tropomyosín, čo naznačuje schopnosť kontrakcie (9). Namiesto vrstvy tunica adventitia je na povrchu kapilár tenká vrstva kolagénových vlákien. Ich priemer sa pohybuje od 7 do 9 μm (14). Vďaka ich tenkej stene, zabezpečujú výmenu látok a plynov (11).

Podľa štruktúry endotelových buniek a podľa prítomnosti, či naopak neprítomnosti bazálnej laminy rozdeľujeme kapiláry na štyri skupiny (10). Zobrazené sú na obrázku č. 4.

Somatické (súvislé) kapiláry sú charakteristické tým, že nie sú fenestrované a priepustnosť sa líši podľa lokalizácie. Tento typ kapilár je typický pre svaly, exokrinné žľazy, nervové tkanivo, či väzivo (10, 11).

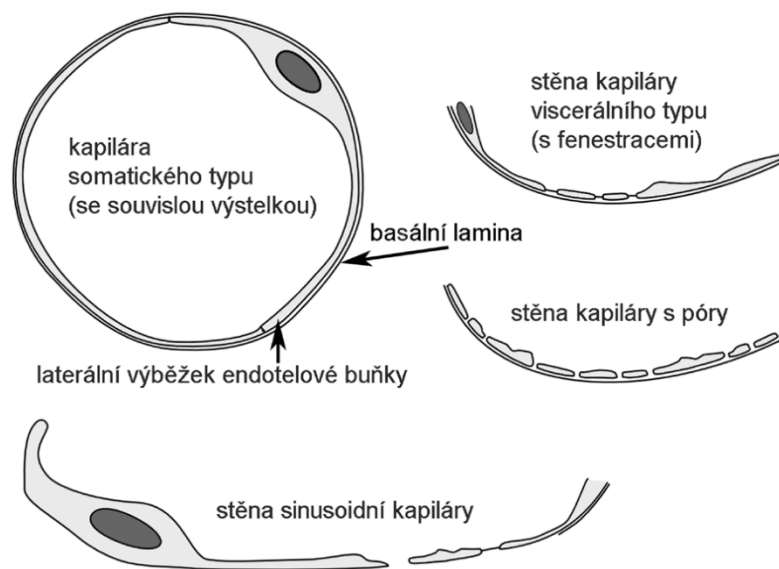
Ďalším typom sú fenestrované (viscerálne) kapiláry, ktoré sú tvorené rozsiahlymi

fenestráciami v endotelových bunkách. Sú uzavreté diafragmou, membránou tenšou ako je biologická membrána (10). Nájde ich napríklad v čreve, v žľazách s vnútornou sekréciou, v obličkách, a teda v orgánoch s rýchlou výmenou látok medzi tkanivami a krvou. Tretím typom sú kapiláry s pórami, s pravými otvormi, ktoré na rozdiel od predchádzajúceho typu, nie sú uzavreté diafragmou. Tento typ nájdeme iba v glomeruloch obličiek.

Štvrtým typom kapilár sú sinusoidné kapiláry (sinusoidy), nepravidelné kapiláry, ktoré sú v niektorých miestach rozšírené až na 30-40 μm (9). Pre nich je charakteristický výrazne spomalený prietok krvi a vysoký počet fenestrácií bez diafragmy a pórov (10). Všetky tieto vlastnosti naznačujú tomu, že výmena látok medzi krvou a tkanivami je tu veľmi uľahčená a výhodná. Takýto typ kapilár nájdeme v pečeni, kostnej dreni, slezine a v pars distalis adenohipofýzy (9, 10).

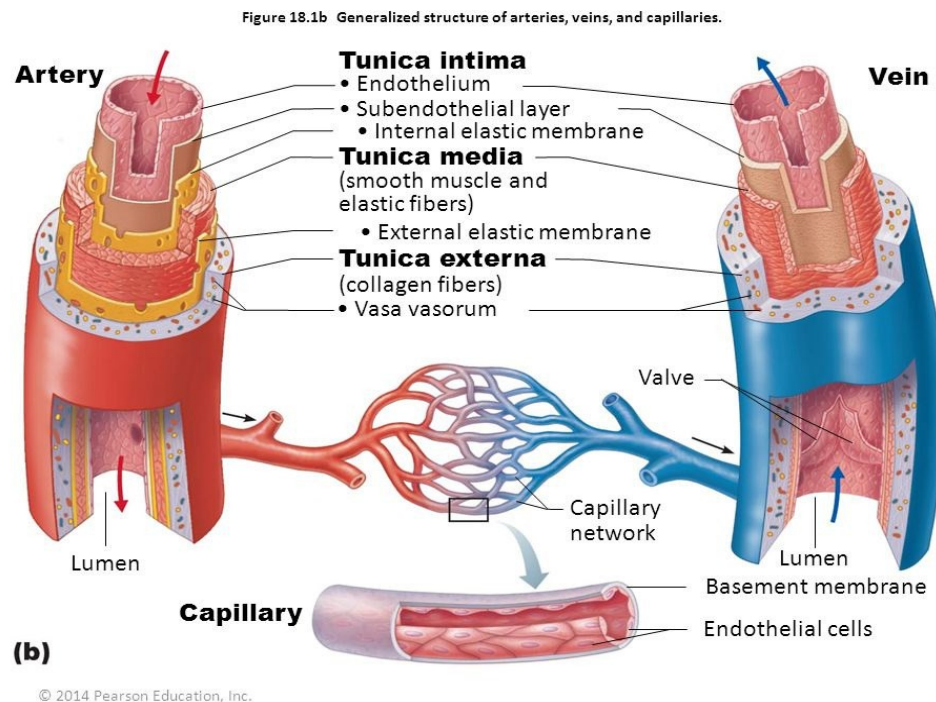
Podľa toho, akú metabolickú aktivitu má dané tkanivo, sa odvíja aj bohatosť kapilár. Napríklad myokard, obličky a celkovo orgány s vysokou metabolickou aktivitou sa vyznačujú bohatou sieťou kapilár, zatiaľ čo u svalového tkaniva je to úplne naopak (9). Schematické znázornenie steny ciev a ich vzájomné porovnanie je zobrazené na obrázku č. 5.

Obrázok č. 4: Typy kapilár



*Rozdelenie kapilár podľa štruktúry endotelových buniek a podľa prítomnosti/neprítomnosti bazálnej laminy.
Prevzaté z: (16)*

Obrázok č. 5: Schematické znázornenie steny krvných ciev. Porovnanie tepny, žily a kapiláry



Artery – tepna, Vein – žila, Capillary – kapilára, Tunica intima, media, adventitia- vnútorná, stredná a vonkajšia vrstva, Endothelium – endotel, Subendothelial layer – subendotelová vrstva, Internal and external elastic membrane – vnútorná a vonkajšia elastická membrána, smooth muscle and elastic fibers – hladká svalovina a elastické vlákna, collagen fibers – kolagénové vlákna, Vasa vasorum – cievy ciev, Capillary network – sieť kapilár, Basement membrane – bazálna membrána, Endothelial cells – endotelové bunky, Valve – chlopňa

Prevzaté z: (17)

3.3.4. Lymfatické cievy

Sú to kanály s tenkými stenami tvorené endotelom. Tkanivový mok sa v nich zhromažďuje a putuje naspäť do krvného obehu (9). Obsahujú lymfu, tekutinu, ktorá pozostáva prevažne z plazmatických bielkovín a z buniek imunitného systému (11). Lymfa na rozdiel od krvi smeruje len do srdca. Lymfatické cievy delíme na lymfatické kapiláry a na lymfatické cievy, ktoré sú väčšie (9).

Lymfatický systém začína na periférii v tkanivách slepo zakončenými lymfatickými kapilármi. Sú to jemné cievy vystlané jednou vrstvou endotelu s prievitom väčším ako u krvných kapilár (14). Nájde ich skoro vo všetkých orgánoch okrem cievnej nervovej sústavy a kostnej drene (9). Tieto kapiláry sa spájajú a vytvárajú sieť lymfatických kapilár.

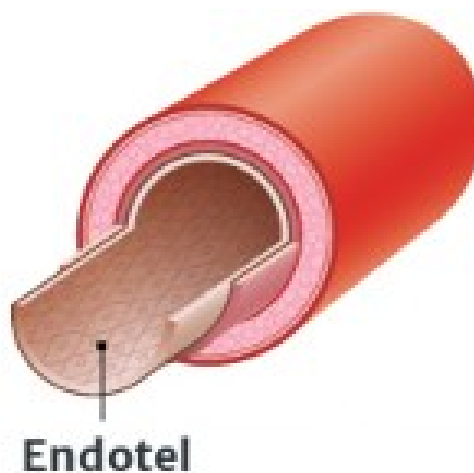
Väčšie lymfatické cievy vznikajú zoskupením kapilár lymfy a majú podobný charakter ako krvné vény vrátane chlopní, ktoré sú početnejšie v lymfatickom systéme (9, 14). Lymfatické kmene sa vytvárajú spájaním lymfatických ciev (14). Tok lymfy zabezpečujú kontrakcie hladkých svalov, okolitých kostrových svalov a chlopne (9).

3.4. Endotel

Endotel bol kedysi považovaný za takzvaný celofánový obal, ktorý nemá iné špecifické funkcie ako poskytovanie selektívnej priepustnosti pre vodu a elektrolyty. Obrovský pokrok však viedol od 80. rokov k pochopeniu komplexných funkcií (18, 19).

Endotel je vrstva plochých, polygonálnych buniek vystielajúcich cievy, ktorý sa nachádza na rozhraní medzi krvou a tkanivami (10, 20). Je zobrazený na obrázku č. 6. Endotelové bunky sú väčšinou pretiahnuté v smere toku krvi (9). Ich štruktúra a funkčná integrita sú dôležité pre udržanie steny cievy, zachovanie toku krvi a prevenciu trombózy. Endotelové bunky sú dynamické a majú metabolické aj syntetické funkcie (21). Tento „orgán“ s veľkým povrchom (350 m²) sa aktívne podieľa na životne dôležitých funkciách kardiovaskulárneho systému, vrátane regulácie perfúzie, výmeny tekutín a rozpustených látok, hemostázy a koagulácie, zápalových reakcií, vaskulogenézy a angiogenézy (20).

Obrázok č. 6: Endotel vystielajúci cievy



Prevzaté z: (22)

3.4.1. Fyziologická funkcia endotelu

Endotel sa vyznačuje autokrinným, parakrinným a endokrinným pôsobením a ovplyvňuje bunky hladkého svalstva, krvné doštičky a periférne leukocyty (21). Ako hlavný regulátor vaskulárnej homeostázy udržiava endotel rovnováhu medzi vazodilatáciou a vazokonstrikciou, inhibíciou a stimuláciou proliferácie a migrácie buniek hladkého svalstva, trombogenezou a fibrinolýzou (23, 24).

Ako bariéra je endotel permeabilný a reguluje prenos malých a veľkých molekúl (21). Produkuje množstvo vazodilatačných a vazokonstrikčných látok, ktoré regulujú vazomotorický tonus (25). Endotelové bunky produkujú a reagujú na rôzne cytokíny a adhézne molekuly. Môžu vyvolať protizápalové, prozápalové a ochranné reakcie (21).

Hlavná vazodilatačná látka uvoľňovaná endotelom je oxid dusnatý (NO), pôvodne identifikovaný ako relaxačný faktor odvodený od endotelu (26). Oxid dusnatý sa tvorí v endotelových bunkách z jeho prekursora L-arginínu prostredníctvom enzymatického pôsobenia endotelovej NO syntázy (eNOS) (27). Medzi ďalšie vazodilatátory odvodené od endotelu patria prostacyklín a bradykinín (26).

Endotel tiež produkuje vazokonstrikčné látky, ako je endotelín (doteraz najsilnejší endogénny vazokonstriktor) a angiotenzín II. Angiotenzín II pôsobí nielen ako vazokonstriktor, ale je tiež prooxidant a stimuluje produkciu endotelínu (28).

3.4.2. Endotelová dysfunkcia

Nekontrolovaná reakcia endotelových buniek sa podieľa na mnohých chorobných procesoch vrátane aterosklerózy, hypertenzie, pľúcnej hypertenzie, sepsy, zápalových syndrómov, rakoviny a metastáz, vaskulogenézy a angiogenézy (20, 21). Tieto choroby súvisia s poškodením endotelu, dysfunkciou a aktiváciou (21). Dokonca niektoré štúdie hovoria o tom, že endotelová dysfunkcia je skorým markérom aterosklerózy a že je možné ju diagnostikovať skôr, ako sa prejavia štrukturálne zmeny steny ciev (29).

Endotelová dysfunkcia môže byť spôsobená niekoľkými stavmi. Rizikovými faktormi sú napríklad cukrovka, metabolický syndróm, hypertenzia, fajčenie či fyzická nečinnosť (30).

V predchádzajúcej kapitole sme sa venovali fyziologickej funkcii endotelu. Pre správnu funkciu endotelu je dôležitá práve rovnováha medzi spomenutými dejmi. Naopak pri endotelovej dysfunkcii dochádza k narušeniu tejto rovnováhy smerom k prozápalovým,

proliferatívnym a prokoagulačným činnostiam. Výsledkom týchto nežiadúcich dejov môže byť zvýšená cievna permeabilita, nefyziologická cievna konstriktia spôsobená zvýšenou produkciou vazokonstriktčných látok, nedostatočná inhibícia subendotelovej proliferácie a tendencia k trombóze (30-32).

Významnú úlohu zohráva aj nerovnováha medzi antioxidantmi a radikálmi. Voľné radikály môžu narušiť rovnováhu NO, poškodiť endotel a nechať ho príliš priepustný, čo umožňuje toxínom prenikať do telesných tkanív (33). Vo väčšine prípadov má ľudské telo primeraný prísun antioxidantov získaných z rôznych potravín na neutralizáciu týchto voľných radikálov, ale ak množstvo voľných radikálov prekročí antioxidačnú kapacitu, tak môže dôjsť k poškodeniu endotelu a zmene rovnováhy NO (34). Oxid dusnatý pôsobí proti účinkom vazokonstriktorov odvodených od endotelu a inhibuje oxidáciu lipoproteínov s nízkou hustotou (29). Ak dôjde k poškodeniu endotelu a nerovnováhe hladiny NO, tak bunky, ktoré by mali zostať v krvi, môžu prechádzať krvnými cievami do susedného tkaniva tela (34). Znížená biologická dostupnosť NO súvisí so začiatkom, progresiou a komplikáciami aterosklerózy.

Začiatok aterosklerózy súvisí s náborom zápalových buniek z obehu a ich transendotelovou migráciou. Tento proces je sprostredkovaný predovšetkým bunkovými adhéznymi molekulami. V reakcii na zápal dochádza na vaskulárnom endoteli a na cirkulujúcich leukocytoch k zvýšenej expresii týchto adhézných molekúl (29, 31). Bližšie si ich popíšeme v ďalšej kapitole.

3.5. Adhézne molekuly

Adhézne molekuly sú molekuly, ktoré sú exprimované na povrchu bunky, zabezpečujú adhéziu bunky a teda majú kľúčovú funkciu na rozhraní bunky a jej prostredia. Prostredím môžeme rozumieť inú bunku, z podobného alebo odlišného typu bunky, extracelulárnu matrix alebo niekedy aj z rozpustné prvky (32). Indukcia adhézných molekúl na endotelových bunkách počas zápalu je sprostredkovaná vaskulárnym endotelovým rastovým faktorom (VEGF) (31).

Adhézne molekuly a adhézne receptory sa podieľajú na organizácii životne dôležitých biologických fenoménov ako je embryogenéza, rast a diferenciácia buniek a hojenie rán. (35). Sprostredkujú rôzne fyziologické a patologické funkcie. Dôležitú úlohu zohrávajú v imunitnej odpovedi organizmu. Zabezpečujú prichytenie leukocytov k endotelu a následne ich prienik k miestu zápalu. Strata adhézných interakcií, ako aj stimulácia adhézie

môžu viesť k chorobným stavom. Podľa štúdií veľkú úlohu zohrávajú adhézne molekuly aj pri vývoji a progresii aterosklerózy.

Schopnosť charakterizovať molekuly bunkovej adhézie (CAMs) na molekulárnej úrovni nám umožnila klasifikovať molekuly do niekoľkých skupín, ktoré zahŕňajú integríny, kadheríny, členy imunoglobulínovej superrodiny a selektíny (36). Členovia každej rodiny boli počas angiogenézy a zápalu detegovaní v krvných cievach (37).

V tejto práci sa bližšie budeme venovať adhéznym molekulám, s ktorými sme pracovali a to s adhéznymi molekulami zo skupiny selektínov s P-selektínom, ktorý zabezpečuje rolovanie a priľnutie leukocytov a s molekulami imunoglobulínového typu VCAM-1 (vaskulárna bunková adhézna molekula-1) a ICAM-1 (intercelulárna adhézna molekula-1), ktoré zabezpečujú pevnú adhéziu leukocytov k povrchu cievy (31).

3.5.1. VCAM-1 (CD106)

VCAM-1 je transmembránový proteín typu 1 patriaci do imunoglobulínovej superrodiny s veľkosťou 100-110 kDa. Štruktúra extracelulárnej amino-koncovej časti molekuly pozostáva zo siedmich domén podobných imunoglobulínu (Ig) a je stabilizovaná disulfidovými väzbami. Nasleduje typická hydrofóbna transmembránová doména a krátka cytoplazmatická doména (38).

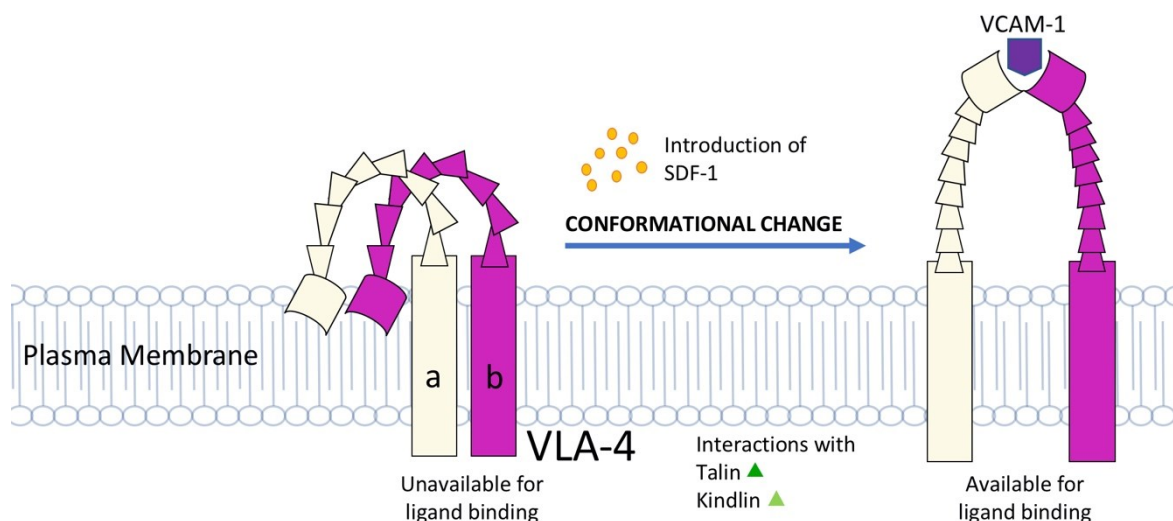
Funkcia VCAM-1 je spojená predovšetkým s interakciami endotelových buniek a leukocytov v reakcii na zápal a so skorým dozrievaním T- a B-buniek. Intenzívne sa podieľa na zápalových procesoch, ako sú procesy spojené s artritídou, odmietnutím transplantátu, aterosklerózou či astmou (39, 40).

V plazme je prítomná solubilná forma molekuly VCAM-1 (sVCAM-1), ktorá vzniká odštiepením extracelulárnej časti VCAM-1 z povrchu endotelu.

Molekuly VCAM-1 sú exprimované v pokojných endotelových bunkách iba minimálne, ale ich expresia sa môže zvýšiť ich aktiváciou. Táto adhézna molekula môže byť tiež exprimovaná inými typmi buniek, ako sú napríklad makrofágy, myoblasty, oocyty či dendritické bunky (21). Expresia VCAM-1 je aktivovaná prozápalovými cytokínmi vrátane TNF- α , reaktívnymi formami kyslíka, oxidovaným lipoproteínom s nízkou hustotou (oxLDL) či vysokou koncentráciou glukózy (40).

VCAM-1 sa viaže na ligand - veľmi neskorý antigén (VLA-4) prítomný na povrchu lymfocytov, eozinofilov a monocytov (viď obrázok č. 7). Po naviazaní indukuje signály v endotelových bunkách, ktoré spúšťajú zmeny tvaru a umožňujú migráciu leukocytov (41).

Obrázok č. 7: Konformačná zmena ligandu VLA-4



Podjednotky alfa a beta menia svoju konformáciu v reakcii na chemokíny, ako je SDF-1 (Faktor-1 odvodený zo stromálnych buniek), aby mohli interagovať s ligandami, ako je VCAM-1 (vaskulárna bunková adhézna molekula-1).

Plasma Membrane – plazmatická membrána, Unavailable/available for ligand binding – nedostupný/dostupný pre naviazanie ligandu, Interaction with – interakcie s, Conformational change – zmena konformácie, Introduction of – predloženie, VLA-4 - veľmi neskorý antigén-4

Prevzaté z: (42)

3.5.2. ICAM-1 (CD54)

Intercelulárna adhézna molekula ICAM-1 rovnako ako VCAM-1 patrí do imunoglobulínovej superrodiny a je exprimovaná niekoľkými typmi buniek vrátane leukocytov a endotelových buniek (43).

Veľkosť molekuly ICAM-1 sa pohybuje od 80 do 114 kDa v závislosti stupňa glykozylácie (44). Extracelulárna časť ICAM-1 pozostáva zo 453 hlavne hydrofóbných aminokyselín, ktoré tvoria päť domén podobných imunoglobulínom (Ig). Extracelulárna oblasť je naviazaná na jednu hydrofóbnu transmembránovú oblasť s 24 zvyškami a krátky cytoplazmatický chvost s 28 zvyškami. Každá doména je stabilizovaná disulfidovými väzbami. Celkom je identifikovaných 5 ICAM molekúl (44, 45).

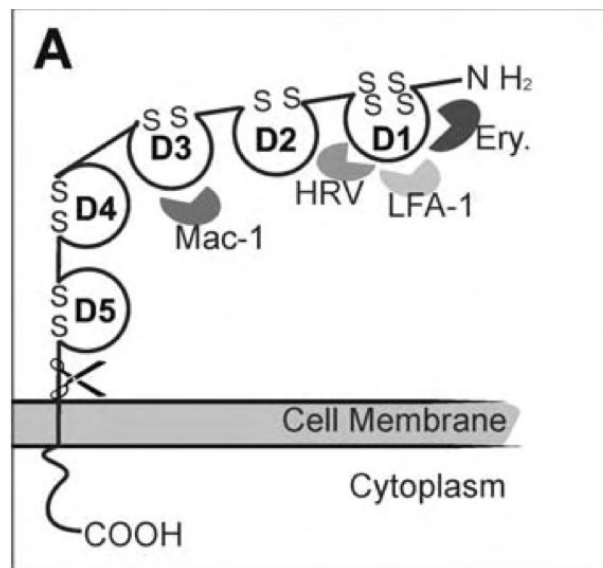
V plazme sa nachádza rozpustná forma ICAM-1 (sICAM-1), ktorá vzniká odštiepením z ICAM-1 a je tvorená iba jej extracelulárnou časťou, konkrétne piatimi

doménami. Hladiny sICAM-1 sú zvýšené v sére pacientov s kardiovaskulárnym ochorením, autoimunitnými poruchami a rakovinou (46).

ICAM-1 je prítomný v aterosklerotických léziách a podieľa sa na ich progresii. Intercelulárna adhézna molekula-1 (ICAM-1) sa viaže na β -2 integríny, ako sú leukocytovej funkčný antigén-1 (LFA-1) a antigén makrofágu-1 (Mac-1) prítomné na všetkých bielych krvinkách. Prvá doména je zodpovedná za väzbu na LFA-1 a tretia doména za väzbu k Mac-1 (47). Zobrazenie domén a ligandov molekuly ICAM-1 je na obrázku č. 8.

Hlavnou úlohou ICAM-1 je zabezpečiť transmigráciu leukocytov z krvných ciev do tkanív (43). ICAM-1 je za fyziologických podmienok exprimovaná iba v nízkych hladinách. K stimulácii endotelových buniek a niektorých lymfocytov a monocytov dochádza pôsobením zápalových cytokínov, ako je napríklad interleukín (IL-1), tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF- α), interferon γ či lipopolysacharidový komplex (endotoxín). Pôsobením týchto stimulačných dejov môže dôjsť k zvýšenej expresii ICAM-1 (48).

Obrázok č. 8: Zobrazenie domén a ligandov molekuly ICAM-1



Nožnice predstavujú tvorbu sICAM-1 štiepením extracelulárnej domény ICAM-1 z bunkového povrchu.

Cell membrane – bunková membrána, Cytoplasm – cytoplazma, LFA-1 - leukocytovej funkčný antigén-1, HRV – ľudský rinovírus, Mac-1 – makrofágový antigén, Ery – erythrocyty

Prevzaté z: (43)

3.5.3. P-selektín (CD62P)

P-selektín (CD62P), skratka P pochádza z anglického názvu platelets (trombocyty), z ktorých bol po prvýkrát izolovaný. Obsahuje N-koncovú doménu, ktorá sa v prítomnosti Ca^{2+} zúčastňuje na adhézných interakciách s oligosacharidmi, ktoré sa nachádzajú v receptoroch partnerských buniek (49). Ďalej obsahuje motív epidermálneho rastového faktora, sériu zhodných opakujúcich sa domén, transmembránovú doménu a cytoplazmatický chvost. Má veľkosť približne 90 kDa a jeho štruktúra je zobrazená na obrázku č. 9.

Okrem P-selektínu do tejto skupiny patria aj L- a E-selektín. L-selektín je exprimovaný na leukocytoch a E-selektín na endotelových bunkách. Ide o jednu z najnovších rodín adhézných molekúl (50).

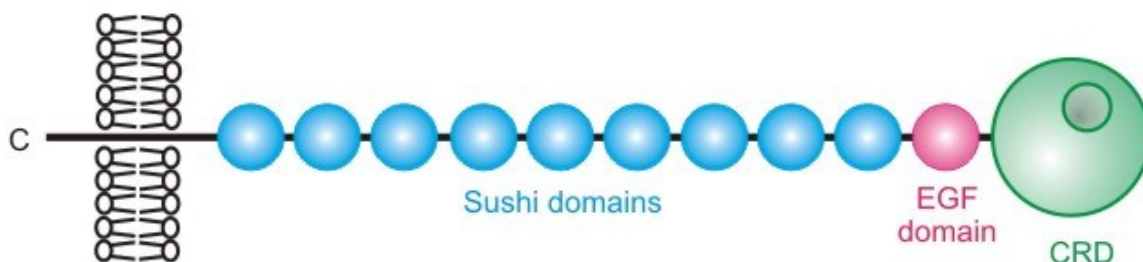
Lewisov antigén X (CD15) je protireceptor na povrchu neutrofilov, monocytov, eozinofilov a lymfocytov, na ktorý sa špecificky viaže molekula P-selektínu. (51)

P-selektín je adhézna molekula prevažne exprimovaná na aktivovaných krvných doštičkách, ale v určitej miere aj na endoteli. Je známe, že hrá dôležitú úlohu pri ateroskleróze (52). Rovnako ako vyššie popísaní členovia imunoglobulínovej rodiny aj selektíny sú exprimované v nízkych hladinách na povrchu bunky. Po aktivácii buniek so zápalovými stimulmi sa P-selektín, uložený v α -granulách krvných doštičiek a vo Weibel-Paladeho telieskach endotelových buniek, začne v priebehu niekoľkých minút vo väčšom množstve exprimovať (31). Na rozdiel od P-selektínu, u molekúl VCAM-1 a ICAM-1 dochádza k zvýšenej expresii až o 4 až 6 hodín po stimulácii.

P-selektíny majú za úlohu sprostredkovať počiatočné pripojenie leukocytov k endotelovým bunkám pred ich pevnou adhéziou v miestach poškodenia tkaniva a zápalu.

P-selektín uvoľňovaný z bunkového povrchu cirkuluje v plazme ako rozpustná molekula (53). Nedávno sa ukázalo, že rozpustný P-selektín (sP-selektín) môže vykazovať prokoagulačnú aktivitu, a preto môže hrať dôležitú úlohu pri trombóze a akútnej koronárnej udalosti. Tiež sa často používa ako markér aktivácie krvných doštičiek (54).

Obrázok č. 9: Štruktúra adhézneho molekuly P-selektínu



Extracelulárnu časť tvorí: N-koncový C-tyt lektínovej domény (zelená farba), EGF-domain (epidermal growth factor-domain) doména epidermálneho rastového faktora (ružová farba) a deväť zhodných opakujúcich sa domén (modrá farba). Cytoplazmatickou membránou prechádza transmembránová doména a znázornená je aj krátka cytoplazmatická časť molekuly.

Prevzaté z: (55)

3.6. Endoglin (CD105)

Momentálne sú študované dve formy CD105. Membránový typ, ktorý je exprimovaný v rôznych tkanivách a rozpustná forma (sEng), ktorá je pozorovaná v plazme u zdravých ľudí, tak ako aj u ľudí s rôznymi chorobami (56).

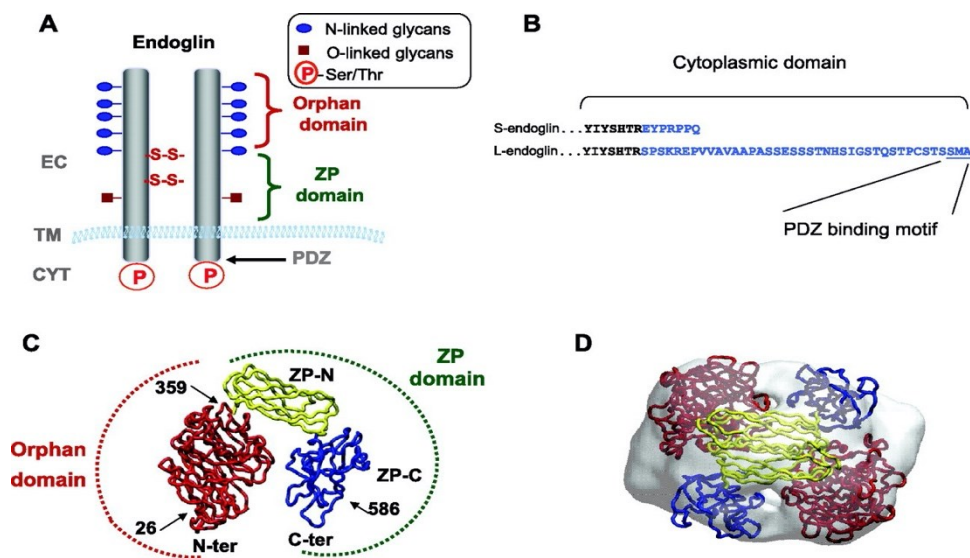
Endoglin (CD105, TGF- β R III) je homodimérny transmembránový glykoproteín s molekulovou hmotnosťou 180 kDa, ktorý patrí do rodiny receptorov pre transformáciu faktoru beta (TGF- β) a je schopný asociovať so signálnymi receptormi typu I (TGF- β RI) a II (TGF- β RII) v prítomnosti ligandu a moduluje bunkové reakcie na TGF- β 1 (57, 58). Je to proteín s veľkou extracelulárnou doménou (561 aminokyselín), jednou hydrofóbnou transmembránovou doménou a krátkou cytosolickou doménou. Primárna štruktúra endoglinu naznačuje, že v NH₂-terminálnej doméne existuje päť N-viazaných glykozylačných miest a pravdepodobná O-glykozylovaná doména, ktoré sú bohaté na serínové a treonínové zvyšky v blízkosti membránovej domény. Ľudský endoglin tiež obsahuje peptidovú sekvenciu Arg-Gly-Asp, ktorá je známa ako miesto na rozpoznávanie buniek mnohých adhézných molekúl prítomných v extracelulárnej matrix (59). Endoglin tvorí diméry a zodpovedajúce monoméry sú spojené disulfidovými mostíkmi (60).

Štruktúrne endoglin patrí do rodiny proteínov ZP (zona pellucida) (61). Každá podjednotka obsahuje jednu doménu ZP v juxtamembránovej oblasti. NH₂-terminálna doména nevykazuje žiadnu významnú homológiu s inou proteínovou rodinou/doménou, a preto bola označená ako „orphan“ doména. Cytosolická doména endoglinu je konštitutívne

fosforylovaná a môže byť zacielená serín a treonínkinázami vrátane receptorov TGF- β typu I a II (62, 63).

Boli identifikované dve izoformy endoglínu, ktoré sa líšia v sekvencii svojich cytosolických domén (56). V L-izoforme (dlhá) má cytosolická doména 47 aminokyselín, zatiaľ čo cytosolická doména S-izoformy (krátka) pozostáva zo 14 aminokyselín (62, 64). Obidve izoformy Eng interagujú s ALK-5 a ALK-1 (aktívni receptori podobné kinázy), avšak s rozdielnou afinitou. S-endogлін vykazuje vyššiu afinitu k ALK-5 a naopak L-endogлін k ALK-1 (65). Štrukturálne zobrazenie endoglínu je zobrazené na obrázku č. 10.

Obrázok č. 10: Štruktúra endoglínu



A: Štrukturálne znázornenie endoglínu. B: Aminokyselínové sekvencie z krátkych (S)-endoglínových a dlhých (L)-endoglínových cytoplazmatických chvostov. Sekvencie, ktoré sa líšia medzi izoformami L a S sú modré. C a D: Trojrozmerný model endoglínu.

N-,O-linked glycans – N-,O-naviazané glykány, Orphan domain - siročia doména, Cytoplasmic domain – cytoplazmatická doména, PDZ binding motif – PDZ väzbový motív.

Prevzaté z: (60)

3.6.1. Regulácia endoglinovej expresie

Expresia endoglinu bola preukázaná v aterosklerotických cievach, prevažne v endotelových bunkách a v bunkách hladkého svalstva v rôznych typoch krvných ciev a má kľúčovú úlohu vo fungovaní a homeostáze endotelu (66). Hrá dôležitú úlohu v angiogenéze, remodelovaní ciev a vaskulárnej patológii (67). CD105 sa môže uvoľňovať z bunkovej membrány do obehu ako rozpustný endoglin (sEng) (57).

Endoglin je exprimovaný v nízkych hladinách v pokojových endotelových bunkách, jeho expresia sa zvyšuje v miestach aktívnej angiogenézy, počas embryogenézy, v tkanivách so zápalom a ranách, v psoriatickej koži, pri synoviálnej artritíde, pri poranení ciev a v nádorových cievach. Endoglin je tiež nadmerne exprimovaný po ischemii a reperfúzii v obličkách, zadných končatinách a srdci (12). Endoglin sa exprimuje v srdcových fibroblastoch (68) a v iných tkanivách podstupujúcich fibrózu, ako sú obličky (69) a pečeň (70). Endoglin je prítomný v monocytoch a počas prechodu monocytov na makrofágy je upregulovaný (71). Signalizácia TGF- β prostredníctvom Smad transkripčných faktorov tiež silne stimuluje expresiu endoglinu (72). Naproti tomu tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF- α) znižuje hladinu endoglinových proteínov v endotelových bunkách (73).

3.6.2. TGF- β signalizačná dráha

Transformujúci rastový faktor (TGF) je multifunkčný cytokín, ktorý sa podieľa na regulácii proliferácie, diferenciácie, migrácie a prežitia mnohých rôznych typov buniek (74). Superrodina secernovaných rastových faktorov TGF beta je zložená z viac ako 30 členov vrátane aktivínov, uzlov, kostných morfogenetických proteínov (BMP) a rastových diferenciačných faktorov (GDF) (75).

TGF signalizuje prostredníctvom heteroméneho komplexu transmembránových receptorov serín/treonínkinázy typu I a typu II (76). Komplex receptorov TGF- β tiež obsahuje dva pomocné ko-receptory s názvom endoglin a betaglykán (64, 77). Sú to transmembránové proteíny s veľkými extracelulárnymi doménami a cytoplazmatické oblasti bohaté na serín/treonín. Endoglin viaže TGF-1, TGF-3, aktivín-A, BMP-2 a BMP-7 v prítomnosti signálnych receptorov typu I a II (77, 78).

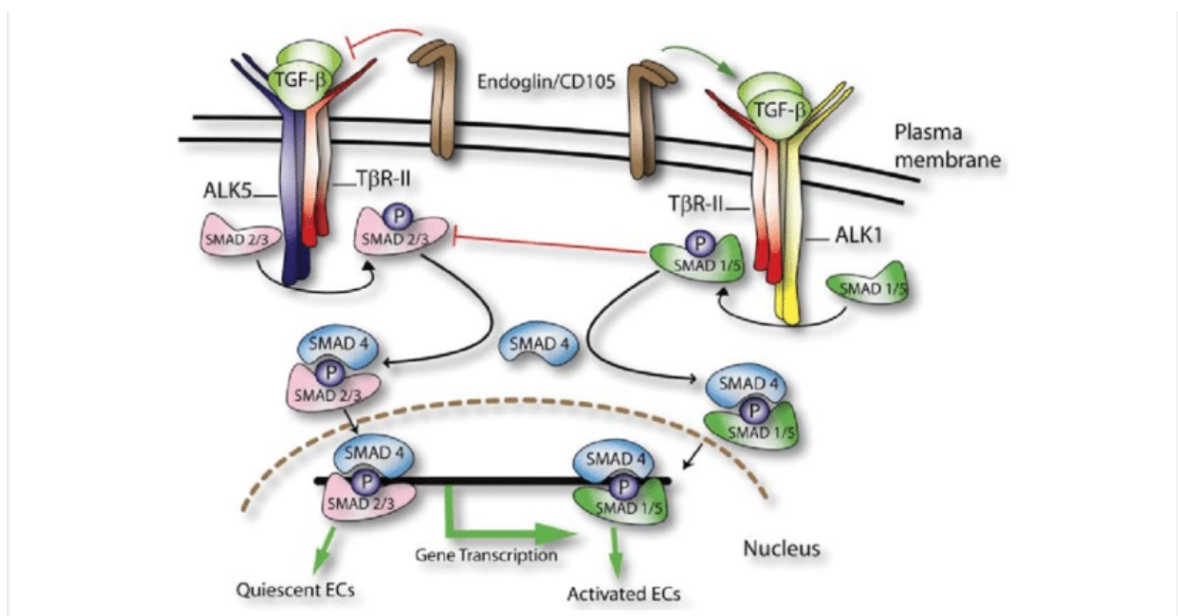
Po naviazaní ligandu na receptor typu II sa indukuje spojenie medzi receptormi typu I a typu II, čo vedie k fosforylácii a aktivácii receptora typu I pomocou konštitutívne aktívneho receptora typu II. Potom aktivovaný receptor typu I propaguje intracelulárny signál do jadra fosforyláciou členov proteínov rodiny Smad (79).

V endotelových bunkách sa TGF môže viazať a prenášať signály prostredníctvom dvoch rôznych receptorov typu I, konkrétne ALK-1 a ALK-5, ktoré majú opačné účinky na proliferáciu a migráciu endotelových buniek (80). Aktivovaný ALK-5 indukuje fosforyláciu Smad 2 a Smad 3 a aktivovaný ALK-1 indukuje fosforyláciu Smad 1 a Smad 5.

Po aktivácii tvoria fosforylované Smads heteromérické komplexy so spoločným mediátorom Smad 4, ktoré v jadre pôsobia ako komplexy transkripčných faktorov regulujúce transkripčnú aktivitu cieľových génov. Zatiaľ čo dráha TGF- β / ALK-5 vedie k inhibícii bunkovej migrácie a proliferácie, dráha TGF- β / ALK-1 indukuje migráciu a proliferáciu endotelových buniek (81).

Prerušenie dráhy TGF- β je spojená s niektorými ľudskými patológiami vrátane autoimunitných, kardiovaskulárnych a fibrotických chorôb, ako aj rakoviny (75). TGF- β signalizačnú dráhu popisuje obrázok č. 11.

Obrázok č. 11: Schematická hypotetická úloha endoglinu (CD105) v signálnych dráhach TGF- β /ALK-1 a TGF- β /ALK-5 v endotelových bunkách



Plasma membrane – plazmatická membrána, *Nucleus* – jadro, *Quiescent* – pokojný, *Activated* – aktivovaný, *Gene Transcription* – génová transkripcia.

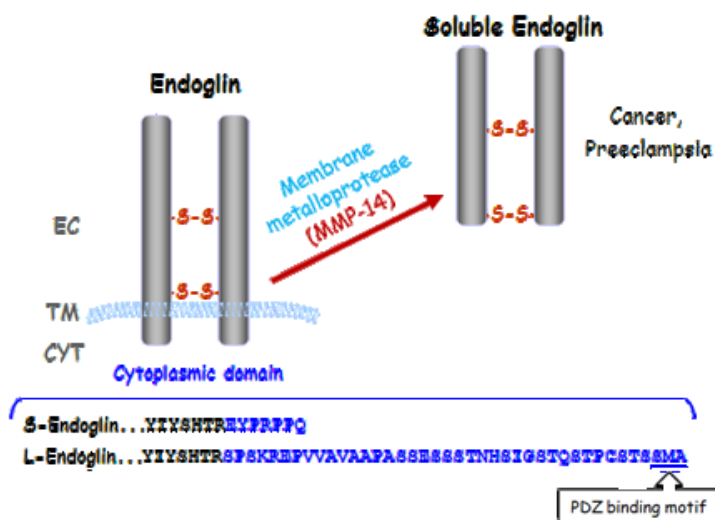
Prevzaté z: (82)

3.7. Solubilný endoglin

Rozpustná forma endoglinu (sEng) je extracelulárna doména kompletného membránového endoglinu vstupujúceho do systémovej cirkulácie. Rozpustný endoglin je N-terminálny endoglinový produkt štiepený v polohe 586 prevažne metaloproteinázou typu 14 membránového typu (MMP-14). Preukázalo sa, že táto proteináza je najviac exprimovaná proteinázou v endotelových bunkách. Membránovo viazaná a rozpustná forma endoglinu je zobrazená na obrázku č. 12.

Jeho hladiny sú zvýšené počas rôznych patologických stavov týkajúcich sa vaskulárneho endotelu. Ukázalo sa, že plazmatické koncentrácie sEng možno považovať za biomarkér poškodenia endotelu (7). Rozpustná forma endoglinu tiež zohráva ústrednú úlohu v preeklampsii, chorobe charakterizovanej hypertenziou a pri závažných zmenách placentárnej cirkulácie. Štúdie *in vitro* ukazujú, že sEng zhoršuje množenie endotelových buniek a tvorbu kapilár (83). SEng hrá svoje antiangiogénne a prohypertenzívne účinky prostredníctvom interakcie s cirkulujúcimi molekulami, ktoré viažu endoglin, ako je superrodina proteínov TGF- β , čím bráni väzbe týchto molekúl na bunkový membránový TGF- β receptorový komplex (84). Štúdie *in vitro* v skutočnosti ukázali, že sEng inhibuje signalizáciu TGF- β a súťaží o naviazanie TGF- β na svoje receptory, čím sa odstraňujú reakcie závislé od signalizácie ALK5 v endotelových bunkách a následne proangiogénne účinky TGF- β v normálnom endoteli (83). Taktiež boli hlásené zmenené hladiny sEng pri niekoľkých patológiách, ako sú rakovina, ateroskleróza a koronárna choroba, hepatitída, diabetes, systémové skleróza, malária, biliárna atrezia alebo kosáčikovitá choroba (12).

Obrázok č. 12: Membránovo viazaná a rozpustná forma endoglinu



Tvorba rozpustného endoglinu proteolytickým spracovaním endoglinu viazaného na membránu.

Cytoplasmic domain – cytoplazmatická doména, Membrane metalloprotease – membránová metaloproteáza, Soluble endoglin – rozpustný endoglin, Cancer – rakovina, Preeclampsia – preeklampsia, PDZ binding motif – PDZ väzbový motív.

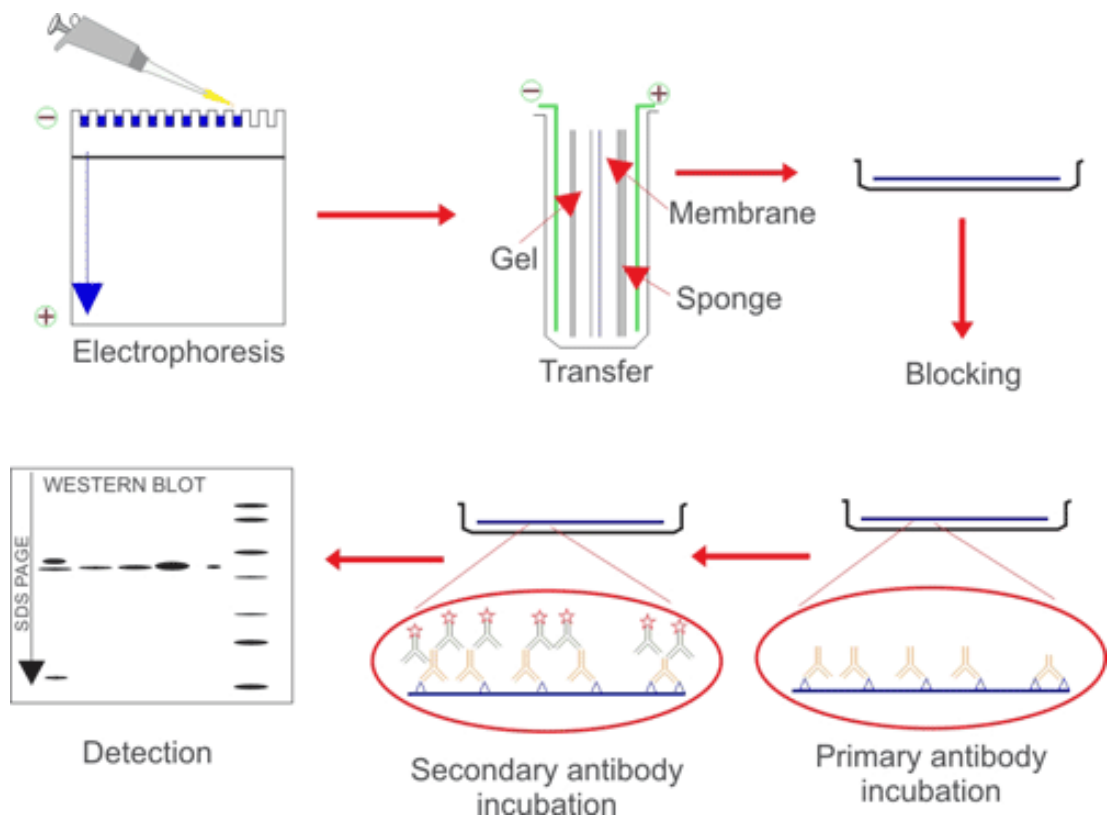
Prevzaté z: (60)

3.8. Western blot

Western blotting alebo imunoblotting bol zavedený Towbinom a kol., v roku 1979 a odvtedy sa stala bežnou technikou používanou vo výskumných laboratóriách na celom svete. V posledných troch desaťročiach sa citlivosť, robustnosť a flexibilita príslušných systémov výrazne zvýšila (85). Western blot je metóda, ktorá sa používa na kvalitatívnu alebo semikvantitatívnu detekciu špecifického proteínu z komplexnej biologickej vzorky a na poskytnutie informácie o jeho molekulovej hmotnosti (86).

Zmes proteínov sa separuje na základe molekulovej hmotnosti gélovou elektroforézou. Tieto výsledky sa potom preniesú na membránu produkujúcu pás pre každý proteín. Membrána sa potom inkubuje s primárnymi a následne sekundárnymi protilátkami, ktoré sú špecifické pre daný proteín. Nenaviazané protilátky sa vymyjú a zanechajú sa iba naviazané protilátky na proteíne, o ktorý máme záujem. Naviazané protilátky sa potom detegujú vývojom filmu. Pretože sa protilátky viažu iba na požadovaný proteín, mal by byť viditeľný iba jeden pás. Hrúbka pruhu zodpovedá množstvu prítomného proteínu a pre porovnanie používame štandard. Schéma tejto metódy je zobrazená na obrázku č. 13. Podrobnejšie popísanie postupu práce je v experimentálnej časti diplomovej práce.

Obrázok č. 13: Schéma metódy Western blot



Electrophoresis – elektroforéza, Transfer – prenos, Gel – gél, Membrane – membrána, Sponge – špongia, Blocking – blokovanie, Primary antibody incubation – inkubácia s primárnymi protilátkami, Secondary antibody incubation – inkubácia so sekundárnymi protilátkami, Detection – detekcia.

Prevzaté z: (87)

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Zvieratá

Na analýzu boli použité geneticky modifikované myši z kmeňa CBAXC57BL/6J s vysokou hladinou ľudského solubilného endoglínu (Sol-Eng⁺). Tento kmeň bol vytvorený na Univerzite Salamanca v Španielsku na oddelení pre vývoj geneticky modifikovaných organizmov (Genetically Modified Organisms Generation Unit). Metódami genetického inžinierstva bol do ich organizmu vpravený gén pre expresiu ľudského sEng. Bol vytvorený vložení endoglinového konštrukt (obsahujúceho aminokyseliny 26-437) riadeného aktívnym promótorom do oplodnených vajíčok myši z kmeňa CBAXC57BL/6J (88).

Chov myši bol premiestnený na Lekársku fakultu Univerzity Karlovej v Hradci Králové, kde prebiehala aj ich genotypizácia. Po genotypizácii boli dovezené a udržiavané vo viváriu Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové v kontrolovaných okolitých podmienkach v miestnosti s regulovanou teplotou, s konštantnou vlhkosťou, s dvanásťhodinovým svetelným režimom a mali prístup k vode a strave podľa potreby.

Išlo o 12 mesačné samice, ktoré boli chované štandardnou laboratórnou diétou pre hlodavce. Kontrolná skupina myši bola génotypovo rovnaká, ale na rozdiel od experimentálnej skupiny mala nízku hladinu sEng. Použili sme 12 samičiek. Z toho 6 samičiek tvorilo experimentálnu skupinu a 6 kontrolnú skupinu. Medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou myši neboli zaznamenané významné váhové rozdiely (vid'. kapitola Výsledky graf č.1).

S použitými zvieratami sa manipulovalo v súlade so Smernicou 2010/63/EU o ochrane zvierat proti týraniu a pod odborným dohľadom Etickej komisie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové. Všetky operačné zákroky boli vykonané pod ketamínovou a xylazínovou (100/10 mg/kg) anestéziou.

Po navodení celkovej anestézie boli otvorené v oblasti brušnej dutiny a bola im odobratá krv z dolnej dutej žily. Krv bola scentrifugovaná pri 10 tisíc otáčkach po dobu 10 minút, pri teplote 4 °C. Potom bola odobraná plazma a následne bola vybratá aorta. Všetky vzorky boli uchovávané pri -80°C.

4.2. Biochemická analýza

Biochemickú analýzu sme využili na zistenie hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolov (TAG) u všetkých skúmaných myší. K tejto analýze sa využívala odobraná plazma hlodavcov s cieľom enzymatického stanovenia obsahu cholesterolu a TGA.

Pomocou diagnostických súprav (Lachema a.s., Česká republika) a nasledovnej spektrofotometrickej analýzy (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Švédsko) boli stanovené ich hladiny. Absorbancia cholesterolu bola meraná pri vlnovej dĺžke 510 nm a TAG pri 540 nm. Výsledné koncentrácie boli vyjadrené v mmol/l. Následne boli hladiny tohto markéru porovnané medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou použitých transgénnych myší.

4.3. ELISA analýza

Pomocou ELISA analýzy, enzýmovej imunoanalytickej metódy, boli stanovené hladiny markérov sVCAM-1 u všetkých skúmaných myší. K stanoveniu plazmatických hladín molekuly sVCAM-1 bol použitý Mouse sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kit (Bio-Techne R&D Systems Inc., MN, USA). Výsledné koncentrácie boli vyjadrené v ng/ml. Následne boli hladiny tohto markéru porovnané medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou použitých transgénnych myší.

4.4. Western blot

4.4.1. Homogenizácia vzorkov

Na analytických váhach sme si zväžili naše vzorky myšacích aort a vložili do novej sady eppendorfiiek s objemom 2 ml. Ku zväženým vzorkám sme pridali lyzačný RIPA pufor (Radio Immuno Precipitation Assay Buffer; Sigma-Aldrich Inc., MO, USA), ktorý umožňuje efektívnu lýzu buniek a rozpustenie proteínov. Na 1 gram tkaniva sme použili 20 ml tohto puforu. Aby sme zabránili štiepeniu vzorku vlastnými enzýmami, pridali sme inhibítory proteáz a fosfatáz. Na 1 ml RIPA pripadá 10 µl inhibítorov proteáz (Leupeptin; SERVA Electrophoresis GmbH, Nemecko) a 10 µl inhibítorov fosfatáz (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail; Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA). RIPA sa pipetovala rovno na vytiahnuté vzorky.

V ďalšom kroku bolo treba narušiť celistvosť cievy a to za pomoci nožníc a následne

aj za pomoci rotor-stator homogenizátoru. V tomto kroku sme vždy dodržiavali postup 1 minúta strihanie a 1 minúta homogenizátor. Nasledovala centrifugácia (10 000 otáčok, 10 minút, 4°C) a odsanie supernatantu bez vrchnej tukovej vrstvy a dolnej tmavej usadeniny. Získali sme vzorku s proteínmi, ktoré sme umiestnili do predom ochladených eppendorfiiek o objeme 1,5ml.

Manipulácie ako váženie, strihanie, homogenizácia a podobne prebiehali vždy na ľade. Vzorky, ktoré sme získali boli uchovávané pri teplote -20°C, aby nedošlo k denaturácii a degradácii bielkovín.

4.4.2. Stanovenie koncentrácie proteínov vo vzorku

Koncentrácia proteínov vo vzorku bola stanovená spektrofotometricky pomocou prístroja TECAN. Najprv sme stanovili kalibračnú krivku štandardu o známej koncentrácii, v našom prípade albumínu. Na základe toho sme naše vzorky aorty riedili na mikrotitračnej doštičke 10x (10 µl vzorku + 90 µl mili-Q-destilovanej vody). Do jamiek sme pridávali 25 µl vzorku a nariedeného roztoku albumínu. Všetko sme pipetovali v duplikáte. Následne sme napipetovali 200 µl reakčných činidiel (reagent A+B) v pomere 50:1 a došlo k zahájeniu farebnej enzymatickej reakcie. Po aplikácii vzorkov na mikrotitračnú doštičku sa doštička zabalila do alobalu, aby sa predišlo vysvieteniu a nechala sa 30 minút inkubovať pri 37°C. Po uplynutí času bola doštička z alobalu vybratá a vložená do spektrofotometra TECAN na zmeranie absorbancie vzorkov. Vypočítané koncentrácie vzoriek sme nariedili podľa potreby. Rozpis riedenia je v tabuľke č. 1.

Tabuľka č. 1: Rozpis riedenia vzoriek na 1 gél

	Koncentrácia proteínu	Aplikovaný proteín	Aplikovaný objem	Pripravený objem	Riedenie vzoriek	
					vzorka	voda
	[mg/ml]	[µg]	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]
Experimentálna skupina						
F 10	5,46	18	10	6	3,95	2,05
F 14	4,45	18	10	6	4,85	1,15
F 16	3,88	18	10	6	5,56	0,44
F 17	4,73	18	10	6	4,56	1,44
F 66	5,01	18	10	6	4,31	1,69
F 71	4,76	18	10	6	4,54	1,46
Kontrolná skupina						
F 65	4,84	18	10	6	4,46	1,54
F 68	4,38	18	10	6	4,93	1,07
F 69	5,36	18	10	6	4,03	1,97
F 72	5,16	18	10	6	4,18	1,82
F 73	4,882	18	10	6	4,42	1,58
F 101	4,402	18	10	6	4,91	1,09

4.4.3. Príprava gélov

Na separáciu proteínov sa najčastejšie využíva gélová elektroforéza. Gél je tvorený často z kombinácie dvoch gélov. Z horného zaostrovacieho gélu s nízkou koncentráciou akrylamidu s pH 6,8 a z dolného rozdeľovacieho gélu s vyššou koncentráciou akrylamidu a s vyšším pH 8,8. Nízka koncentrácia horného gélu zabraňuje upchatiu pórov gélu veľkými molekulami a tým pádom uľahčuje vstup a rozjazd malých molekúl.

Pripravili sme si elektroforetickú aparatúru (Mini-PROTEAN Tetra Cell; Bio-Rad Laboratories Inc.), ktorá je zobrazená na obrázku č. 14. Pre každý gél sme si pripravili jedno dlhšie s milimetrovým zárezom a jedno kratšie sklo. Spojili sme ich a vložili do zeleného stojana, kratšie sklo smerovalo k nám dopredu. Upevnili sme to tak, aby sa predišlo nežiadúcemu vytekaniu gélu pred zatuhnutím.

Nasledovala príprava separačného a zaostrovacieho gélu. Na prípravu sme

potrebovali Mili-Q-destilovanú vodu (redestilovanú vodu), separačný a zaostrovací (Separating gel buffer, Stacking gel buffer; Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), akrylamid (Acrylamide-Bis Solution; SERVA Electrophoresis GmbH, Nemecko), 10% dodecylsírany sodný (SDS; SERVA Electrophoresis GmbH, Nemecko), 10% peroxidisírany amónny (APS; SERVA Electrophoresis GmbH, Nemecko) a N, N, N', N' – tetrametyletylendiamín (TEMED; SERVA Electrophoresis GmbH, Nemecko). Presné objemy sú uvedené v tabuľke č.2.

Tabuľka č. 2: Zloženie separačného a zaostrovacieho gélu

Komponenty	Finálna koncentrácia gélu	
	Separáčny gél (10 %)	Zaostrovací gél (5 %)
	[ml]	[ml]
Milli-Q H₂O	9,800	6,150
Pufor pre separáčny gél	5,000	---
Pufor pre zaostrovací gél	---	2,500
Akrylamid	5,000	1,250
10 % SDS	0,200	0,100
10 % APS	0,060	0,030
TEMED	0,030	0,015

Milli-Q H₂O - redestilovaná, ultračistá voda; *SDS* - dodecylsírany sodný; *APS* - peroxidisírany amónny; *TEMED* - N, N, N', N' – tetrametyletylendiamín

Zmiešali sme vodu, pufor a akrylamid a následne sme pridali aj ostatné zložky separačného gélu, a to najprv SDS, ktorého vplyvom dochádza k denaturácii proteínov a proteíny získavajú záporný náboj. Proteíny sa viažu na anióny SDS a vďaka tomu sú delené na základe ich hmotnosti, ktorá je udávaná v kilodaltonoch (kDa) a nie na základe náboja. Malé proteíny migrujú gélom rýchlejšie ako tie väčšie. Z toho nám vyplýva, že koncentrácia gélu sa vyberá na základe molekulovej veľkosti protilátky (89).

Polymerizácia akrylamidu neprebíha spontánne, preto musíme pridať látky TEMED a APS, katalyzátory polymerizácie, ktoré iniciujú reťazovú polymerizáciu. APS napadá molekuly TEMED, ktorý tvorí ióny narušujúce reaktívne skupiny akrylamidu, ten potom reaguje s ďalšou molekulou akrylamidu, pričom už sám z nej vytvára ďalšiu reaktívnu látku až vzniká dlhý polymér (90).

Pripravený separačný gél sme napipetovali medzi pripravené sklá, asi 1,5 cm pod hornú hranu kratšieho skla. Pomalým pohybom sme gél prekryli izobutanolom, za účelom zamedzenia prístupu vzduchu ku gélu pri jeho polymerizácii, k vyrovnaniu hladiny po celej dĺžke gélu a k odstráneniu vzduchových bublín z jeho povrchu. Pridali sme ho vo vrstve cca 1 cm a nechali sme polymerizovať 30-60 minút. Malý objem gélu sme si nechali stranou, aby sme mohli skontrolovať, kedy to spolymeryzuje. Keď nám gél stuhol, tak sme izobutanol vyliali a vypláchli aparáturu destilovanou vodou. Po vypláchnutí sme napipetovali asi 2 ml zaostrovacieho gélu, ktorý bol pripravený rovnako ako gél separačný, ale za použitia separačného pufru a vložili sme teflónový hrebeň, ktorý nám vytvoril jamky na nanášanie vzoriek. Opäť sme nechali 30-60 minút polymerizovať.

Obrázok č. 14: Elektroforetická aparatúra



Prevzaté z: (91)

4.4.4. *Príprava vzoriek a aplikácia na gél*

Predpripravené nariadené vzorky sme si nechali rozmraziť. Ku každému vzorku sme pridali 5 μ l nanášacieho Laemmliho pufru, ktorý je zložený zo štyroch zložiek. Z SDS, β -merkaptobetanolu, glycerolu a bromfenolovej modrej. SDS spôsobuje denaturáciu a dáva proteínom záporný náboj. β -merkaptobetanol slúži na odstránenie intra a intermolekulárnych disulfidických mostíkov. Glycerol uľahčuje nanášanie vzorku do jamiek zvýšením denzity a bromfenolová modrá zabezpečuje vizualizáciu vzorku.

Takto pripravené vzorky sme najprv zvortexovali a až potom scentrifugovali a vložili na 5 minút do termobloku s teplotou 95°C. Následne sme vzorky ochladili pri pokojovej teplote a znovu sme ich zvortexovali a scentrifugovali pred aplikáciou vzoriek do jamiek. Keď sme mali všetko pripravené na nanášanie, opatrne sme vytiahli hrebeň z gélu a vypláchli jamky s elektroforetickým pufrom, ktorý sme pripravili zo 100 ml komerčného elektroforetického pufru (Tris/Glycine/SDS Buffer 10x Concentrated; Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) a 900 ml Milli-Q H₂O. Sklá a gély sme vložili do tanku tak, že kratšie sklá smerovali dovnútra. Tank a priestor medzi sklami sme naplnili elektroforetickým pufrom.

Mikropipetou sme naniesli do prvej jamky 5 μ l hmotnostného markéru (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Marker); Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), čo je zmes proteínov o známej veľkosti k vyhodnoteniu veľkosti signálov v testovaných vzoriek. Potom sme postupne zľava doprava pridávali 10 μ l nariadených vzoriek do jamiek. Prázdne jamky sme naplnili čistým nanášacím pufrom. Pred nanášaním každého vzorku sme mikroskúmvky zvortexovali a doplnili pufor do tanku po rysku.

Tank sme uzavreli a obložili ľadom. Pripojili k zdroju a nastavili na 200 V a 120 mA. Cca po 45 minútach až hodine bromfenolové čelo dorazilo k spodnej hrane skla a tank sme odpojili od zdroja.

4.4.5. *Blotovanie – prenos proteínov na membránu*

Po elektroforetickej separácii proteínov nasledoval ďalší krok, ktorý spočíval v prenose proteínov z gélu na membránu. Použili sme aparatúru Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), ktorá je zobrazená na obrázku č. 15.

V medzičase, kým prebiehala elektroforéza sme si pripravili transferový pufor, ktorým sme navlhčili čierne špongie a filtračný papier. Pozostáva z komerčného transferového pufru (Tris/Glycine Buffer 10x Concentrated; Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), 20% v/v metanolu a Milli-Q H₂O. Najprv sme si pripravili 100 ml pufru a doplnili

vodou do 500 ml. Až následne sme pridali 200 ml metanolu, aby sme zabránili vyzrážaniu metanolu v pufri. Nakoniec sme ešte doplnili vodu do 1000 ml. Ďalej sme si pripravili 2 čierne špongie, filtračný papier Whatman 3MM, PVDF (polyvinylidenfluoridovú) membránu (Immobilon®-P PVDF Membrane; Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) a čakali, kým skončí elektroforéza.

Po ukončení elektroforézy sme vytiahli aparáturu z tanku a rozobrali ju. Odrezali sme zaostrovací gél a gél sepačný sme premiestnili do vaničky s transferovým pufrom. Nitrocelulóзовé membrány sme si nastrihali podľa šablóny, ktorá predstavovala veľkosť gélu. Potom sme ich na transfer proteínov zaktivovali ponorením na 15 sekúnd do metanolu a na 2 minúty do Milli-Q vody.

Následne sme pristúpili k zloženiu takzvaného sandwicha. Pripravili sme si kazetu čiernou stranou nadol a položili sme na ňu predom zvlhčenú špongiu transferovým pufrom, rovnako zvlhčený filtračný papier a skúmavkou sme opatrne vytlačili bubliny. Na filtračný papier sme preniesli zvlhčený gél, na ktorý sme opatrne a čo najpresnejšie položili aktivovanú nitrocelulóзовú membránu. Následne sme s ňou už nemohli hýbať ani upravovať polohu, pretože by mohlo dôjsť k rozmazaniu bandov. Opäť sme pridali zvlhčený filtračný papier, zvlhčenú špongiu, priklopili kazetu vekom a zaistili.

Takto pripravený sandwich sme vložili do elektroforetického tanku a naplnili transferovým pufrom po rysku. Rovnako ako pri elektroforéze sme tank zavreli, obklopili ľadom a zapojili do zdroja. Nastavili sme napätie na 140 V, prúd na 300 mA a čas na 90 minút.

Po uplynutí času sme tank odpojili od zdroja a vybrali aparáturu. Membrány sme preložili do vaničiek s Milli-Q vodou. Podľa hmotnostného markéru, ktorý sme pridávali do prvej jamky, sme si zorientovali membrány a nastrihali sme si prúžky sledovaných proteínov podľa molekulových veľkostí sledovaných proteínov. V okolí 110 kDa sme očakávali VCAM, v rozmedzí 85-100 kDa ICAM a 84-91 kDa P-selektín. GAPDH (30-40 kDa) sme používali ako kontrolu.

Obrázok č. 15: Aparatúra pre prenos proteínov na membránu



Prevzaté z: (92)

4.4.6. Imunodetekcia

Prvým krokom imunodetekcie je blokáda nešpecifických väzbových miest ponorením membrány do vaničky s roztokom TBS-T-5%. Existuje široká škála blokovacích roztokov, my sme použili roztok 5% sušeného nízkoúčného mlieka v TBS-T roztoku (TBS-T-5% mlieko) (Blocking solution/buffer), ktorý je nutné pripraviť krátko pred použitím, pretože má minimálnu trvanlivosť. Je zložený z 5,0 g nízkoúčného sušeného mlieka (Blotting-Grade Blocker (mlieko na blokáciu nešpecifických väzieb); Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) a 100 ml roztoku TBS-T. TBS-T roztok sme pripravili zo 100 ml 10% TBS (Tris-Buffered Saline) pufru, 900 ml Milli-Q-destilovanej vody a 1 ml TWEEN® 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate; SERVA Electrophoresis GmbH, Nemecko).

Necháme pôsobiť jednu hodinu pri pokojovej teplote na kývačke. Membrány majú vysokú afinitu k proteínom a rovnako tak aj k protilátkam. Týmto krokom sa zaplnia voľné miesta na membráne a protilátka sa tak viaže len na svoj špecifický antigén.

Medzitým sme si nariesili naše primárne protilátky v TBS-T-5% roztoku, následne sme ich pretrepali a pripravili sme si vaničky z parafilmu. Membrány sme vložili do pripravených vaničiek proteínmi nahor a do každej vaničky sme pridali cca 1-2 ml primárnej protilátky. Nechali sme inkubovať celú noc v chladničke na kývačke.

Pomocou primárnych protilátok sú naše proteíny na membráne detegované. Výber

primárnej protilátky závisí na príslušnom antigéne. Primárne protilátky ale obvykle nie je možné vizualizovať a je potrebné využiť aj sekundárne protilátky, ktoré rozpoznávajú primárne protilátky. Sekundárna protilátka je konjugovaná s enzýmom, v našom prípade s chrenovou peroxidázou, ktorý umožňuje vizualizáciu. Výber primárnych protilátok a ich riedenie je zhrnuté v tabuľke č. 3.

Tabuľka č. 3: Výber primárnej protilátky podľa príslušného antigénu

Proteín	Typ primárnej protilátky	Firma	Riedenie
GAPDH	Mouse Monoclonal Anti-GAPDH	Sigma-Aldrich Inc., MO, USA	1:10 000
ICAM-1	Goat Polyclonal IgG	Bio-Techne R&D Systems, MN, USA	1:500
VCAM-1	Goat Polyclonal IgG	Bio-Techne R&D Systems, MN, USA	1:500
P-selektín	Rabbit Polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, Veľká Británia	1:200

IgG - imunoglobulín G, GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, ICAM-1 - intercelulárna adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1

Na druhý deň ráno sme začali premývaním TBS-T roztokom. Premývali sme hodinu na kývačke pri pokojovej teplote v nádobkách. Roztoky sme menili každých desať minút. Počas premývania sme si opäť pripravili vaničku z parafilmu a nariedili sekundárne protilátky. Riedili sme opäť s roztokom TBS-T-5% len v inom pomere ako pri primárnych protilátkach. Výber sekundárnych protilátok a ich riedenie je zhrnuté v tabuľke č. 4. Nechali sme inkubovať 1 hodinu pri pokojovej teplote na kývačke a následne premývali jednu hodinu TBS-T roztokom. Rovnako ako pri primárnych protilátkach sme každých desať minút menili roztok.

Tabuľka č. 4: Výber sekundárnej protilátky podľa príslušného antigénu

Proteín	Typ sekundárnej protilátky	Firma	Riedenie
GAPDH	HRP-conj. Goat Anti-Mouse Polyclonal IgG	Sigma-Aldrich Inc., MO, USA	1:20 000
ICAM-1	HRP-conj. Rabbit Anti-Goat Polyclonal IgG	Sigma-Aldrich Inc., MO, USA	1:5 000
VCAM-1	HRP-conj. Rabbit Anti-Goat Polyclonal IgG	Sigma-Aldrich Inc., MO, USA	1:5 000
P-selektín	HRP-conj. Goat Anti-Rabbit Polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, Veľká Británia	1:2 000

IgG - imunoglobulín G, GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, ICAM-1 - intercelulárna adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, HRP-conj. (horseradish peroxidase - conjugated) - sekundárna protilátka konjugovaná s chrenovou peroxidázou

4.4.7. Chemiluminiscencia

Všetky procedúry v tomto bode je nutné previesť rýchlo a neskôr aj v temnej komore. Zmiešame si zložky detekčného kitu (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA) 1 a 2 v pomere 1:1. Membrány si preložíme na tvrdú podložku proteínmi nahor a pridáme pipetou cca 1-1,5 ml (v závislosti na veľkosti) detekčného roztoku na membránu, tak aby bola pokrytá celá. Necháme inkubovať bez miešania. Dĺžka inkubácie závisí na sile detekčných roztokov. Odsajeme prebytočný detekčný roztok zdvihnutím membrány do vertikály a priložením savého papiera. Následne položíme membránu do uzatvárateľnej kazety expozičnou stranou nahor a prekryjeme fóliou. Vzniknuté bubliny vytlačíme, zafixujeme lepiacou páskou a rýchlo zavrieme. Ďalšie kroky musia prebiehať za tmy.

Premiestnili sme sa do tmavej miestnosti s vyvolávacím prístrojom OPTIMAX 2010 X-Ray Film Processor (Protec GmbH and Co. KG, Oberstenfeld, Nemecko). Rýchlo a opatrne sme prikladali na dané membrány fotografické filmy (AGFA CP-BU; Foma Bohemia s.r.o., Hradec Králové, Česká republika). Dĺžku expozície sme upravovali podľa viditeľnosti bandov. Keď sme mali výrazné pozadie, membránu sme opäť premyli v premývacom roztoku 2x po 10 minút a redetekovali ako pred tým s trochu nižšou

citlivosťou. Ak bol naopak signál veľmi výrazný v dôsledku vysokej koncentrácie proteínu, tak sme počkali 5-10 minút a až potom sme začali exponovať ďalší film.

Intenzita zafarbenia bandov vedie k identifikácii proteínov a odpovedá ich množstvu. Kvantifikovali sme ich pomocou programu pre analýzu obrazu Imaging Software NIS-Elements Advanced Research (verzia 4.00.11; Laboratory Imagine s.r.o., Česká republika). Štatistická analýza bola vykonaná v programe GraphPad Prism 8 (verzia 8.2.1; GraphPad Software Inc., CA, USA).

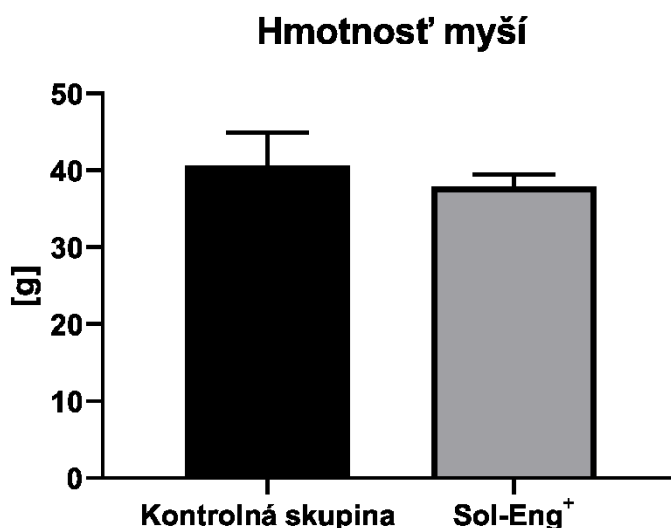
5. VÝSLEDKY

Výsledky sú uvedené ako priemer \pm štandardná chyba priemeru. Hladina štatistickej významnosti (p) bola stanovená neparametrickým t-testom (Mann-Whitney). Rozdiely medzi skupinami sú štatisticky signifikantné ak $p \leq 0,05$.

5.1. Váha

Medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší nebol zaznamenaný signifikantný váhový rozdiel ($40,71 \pm 4,27$ g vs. $37,88 \pm 1,61$ g; $p = 0,6991$). Porovnanie hmotností myší kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č.1 . Hodnoty sú uvedené v gramoch [g].

Graf č. 1: Hmotnosť myší v [g]



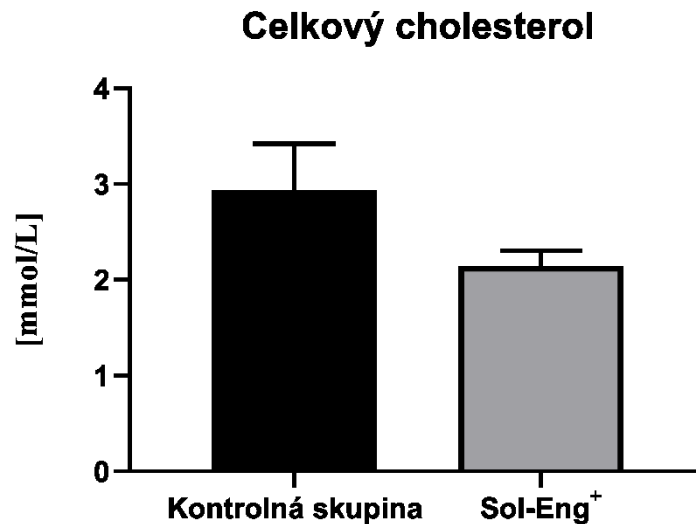
Ľavý stĺpec - hmotnosť jedincov u kontrolnej skupiny myší, pravý stĺpec - hmotnosť jedincov u experimentálnej skupiny Sol-Eng⁺. Namerané hodnoty v gramoch [g].

5.2. Biochemická analýza hladín celkového cholesterolu

Pomocou biochemickej analýzy boli stanovené hladiny celkového cholesterolu u všetkých skúmaných myší. Analýza nepreukázala signifikantný rozdiel medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší ($2,94 \pm 0,48$ mmol/L vs. $2,14 \pm 0,16$

mmol/L; $p = 0,2906$). Porovnanie hladín celkového cholesterolu kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č. 2. Hodnoty sú uvedené v [mmol/L].

Graf č. 2: Hladiny celkového cholesterolu v [mmol/L]

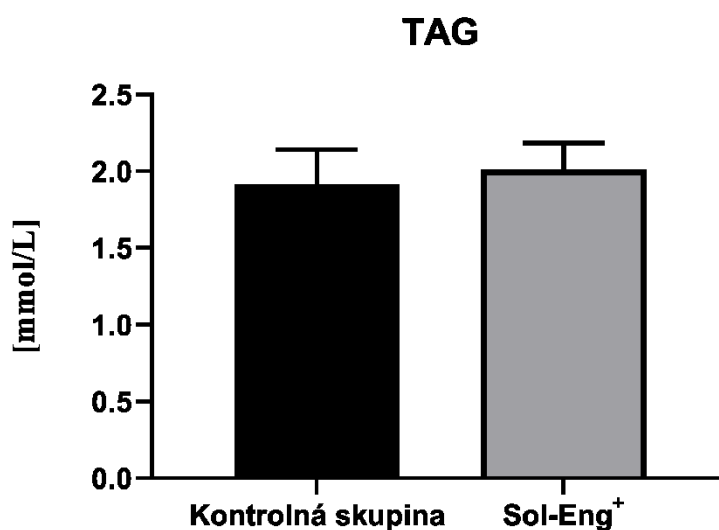


Ľavý stĺpec – hladina celkového cholesterolu u kontrolnej skupiny myší, pravý stĺpec – hladina celkového cholesterolu u experimentálnej skupiny Sol-Eng⁺. Namerané hodnoty v [mmol/L].

5.3. Biochemická analýza hladín triacylglycerolov (TAG)

Pomocou biochemickej analýzy boli stanovené hladiny triacylglycerolov u všetkých skúmaných myší. Analýza nepreukázala signifikantný rozdiel medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší ($1,91 \pm 0,23$ mmol/L vs. $2,01 \pm 0,17$ mmol/L; $p = 0,9497$). Porovnanie hladín TAG kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č. 3. Hodnoty sú uvedené v [mmol/L].

Graf č. 3: Hladiny triacylglycerolov (TAG) v [mmol/L]

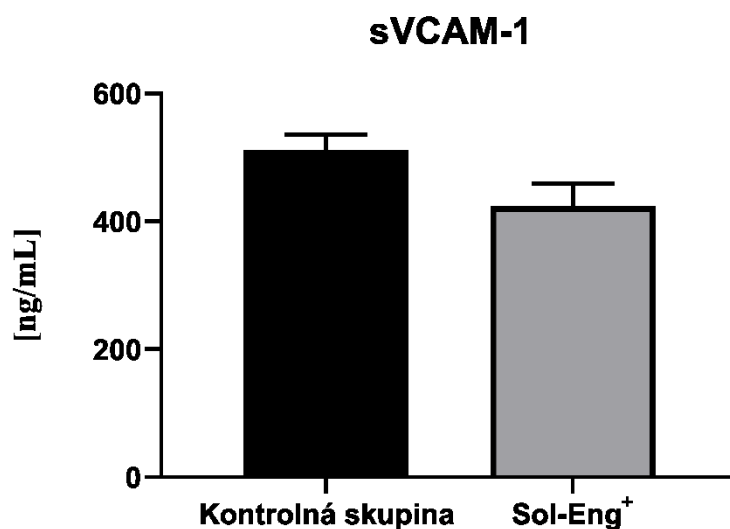


Ľavý stĺpec – hladina triacylglycerolov u kontrolnej skupiny myší, pravý stĺpec – hladina triacylglycerolov u experimentálnej skupiny Sol-Eng⁺. Namerané hodnoty v [mmol/L].

5.4. ELISA analýza hladín sVCAM-1

Pomocou ELISA analýzy boli stanovené hladiny markérov sVCAM-1 u všetkých skúmaných myší. Analýza nepreukázala signifikantný rozdiel medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší ($511,05 \pm 24,74$ ng/mL vs. $423,22 \pm 35,47$ ng/mL; $p = 0,0513$). Porovnanie hladín sVCAM-1 kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č. 4. Hodnoty sú uvedené v [ng/mL].

Graf č. 4: Plazmatické hladiny sVCAM-1 v [ng/mL]



Ľavý stĺpec – hladina sVCAM-1 u kontrolnej skupiny myší, pravý stĺpec – hladina sVCAM-1 u experimentálnej skupiny Sol-Eng⁺. Namerané hodnoty v [ng /L].

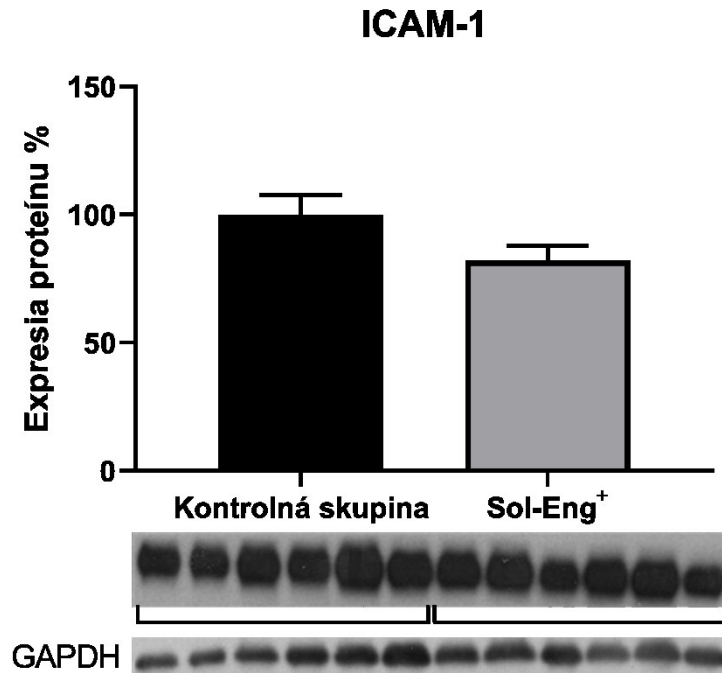
5.5. Western blot analýza

Našou úlohou bolo sledovať expresiu adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín pomocou Western blotu a vyhodnotiť zmeny v expresii medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou myší. Ako vnútorný štandard sme použili štrukturálny proteín GAPDH.

5.5.1. Western blot analýza molekuly ICAM-1

Western blot analýza nepreukázala signifikantný rozdiel v expresii molekuly ICAM-1 medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší ($100,00 \pm 7,82$ vs. $82,24 \pm 5,52$; $p = 0,0931$). Porovnanie expresie molekuly ICAM-1 kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č. 5. Hodnoty sú uvedené v [%].

Graf č. 5: Expresia adhéznej molekuly ICAM-1 v [%]

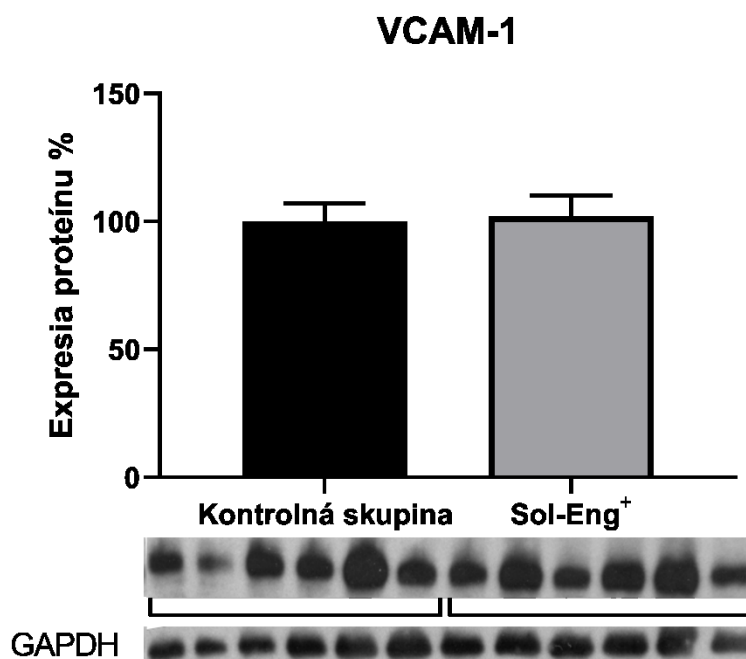


Ľavý stĺpec znázorňuje expresiu adhéznej molekuly ICAM-1 u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec znázorňuje expresiu adhéznej molekuly ICAM-1 u experimentálnej skupiny Sol-Eng⁺. Namerané hodnoty v [%]. Pod grafom sú špecifické signály molekuly ICAM-1 a pod ním signály GAPDH. Prvých 5 bandov odpovedá kontrolnej skupine a druhých 5 bandov odpovedá experimentálnej skupine myší so zvýšením sEng.

5.5.2. Western blot analýza molekuly VCAM-1

Western blot analýza nepreukázala signifikantný rozdiel v expresii molekuly VCAM-1 medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší ($100,00 \pm 7,23$ vs. $101,91 \pm 8,30$; $p = 0,9307$). Porovnanie expresie molekuly VCAM-1 kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č. 6. Hodnoty sú uvedené v [%].

Graf č. 6: Expresia adhéznej molekuly VCAM-1 v [%]

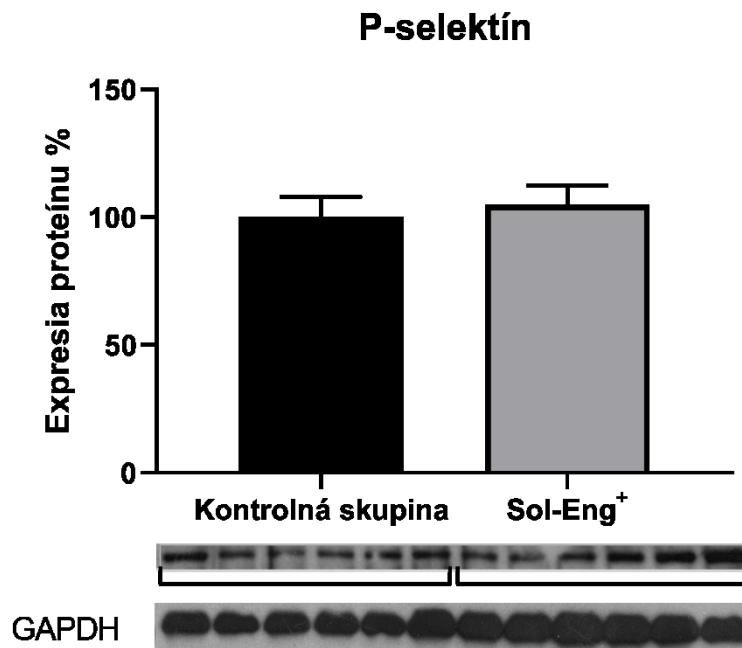


Ľavý stĺpec znázorňuje expresiu adhéznej molekuly VCAM-1 u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec znázorňuje expresiu adhéznej molekuly VCAM-1 u experimentálnej skupiny Sol-Eng⁺. Namerané hodnoty v [%]. Pod grafom sú špecifické signály molekuly VCAM-1 a pod ním signály GAPDH. Prvých 5 bandov odpovedá kontrolnej skupine a druhých 5 bandov odpovedá experimentálnej skupine myší so zvýšením sEng.

5.5.3. Western blot analýza molekuly P-selektín

Western blot analýza nepreukázala signifikantný rozdiel v expresii molekuly P-selektín medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší (100,00 ± 7,99 vs. 104,88 ± 7,58; $p = 0,9372$). Porovnanie expresie molekuly P-selektín kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č. 7. Hodnoty sú uvedené v [%].

Graf č. 7: Expresia adhéznej molekuly P-selektín v [%]



Ľavý stĺpec znázorňuje expresiu adhéznej molekuly P-selektín u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec znázorňuje expresiu adhéznej molekuly P-selektín u experimentálnej skupiny Sol-Eng⁺. Namerané hodnoty v [%]. Pod grafom sú špecifické signály molekuly P-selektín a pod ním signály GAPDH. Prvých 5 bandov odpovedá kontrolnej skupine a druhých 5 bandov odpovedá experimentálnej skupine myší so zvýšením sEng.

6. DISKUSIA

Endoglin je glykoproteín (180 kDa), ktorý zohráva úlohu koreceptoru typu III pre dráhu TGF- β . Má kľúčovú úlohu počas angiogenézy, proliferácie, migrácie a adhézie endotelových buniek. Prevažne je exprimovaný aktivovanými endotelovými bunkami, a preto bol navrhnutý ako vhodný endotelový markér endotelovej dysfunkcie. Štiepením endoglinu v extracelulárnej doméne pomocou enzýmu metaloproteáza-14 (MMP-14), vzniká rozpustná forma endoglinu (sEng) (93).

Podieľa sa na mnohých vaskulárnych ochoreniach, najmä na dedičnej hemoragickej teleangiektázii, preeklampsii a nádorovej angiogenéze. Okrem toho so zvýšenými hladinami sEng v krvi súvisia hypercholesterolémia, ateroskleróza, ischemická choroba srdca, diabetes mellitus a hypertenzia (94).

Ukázalo sa, že cirkulujúce hladiny sEng sú vyššie v sére pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami s významnou zápalovou zložkou. Počas zápalu v tele dochádza k uvoľňovaniu cytokínov a vazoaktívnych zlúčenín, ktoré zvyšujú priepustnosť a expresiu adhézných molekúl aktivovaním endotelových buniek (95).

Zistilo sa že, vysoké hladiny sEng nemodifikujú zápalový stav Sol-Eng⁺ a že výsledky neukazujú signifikantné rozdiely v zápalovom stave medzi myšami divokého typu (Wild type) a Sol-Eng⁺ za presne stanovených podmienok. Týka sa to prevažne infiltrácie leukocytov, zápalových cytokínov, vaskulárnej permeability alebo expresie adhézných molekúl. Rovnako aj štúdie Nemeckova a kol., 2015 ukazujú, že vysoké hladiny sEng neindukujú rozdiely v infiltrácii leukocytov, zápalových cytokínov, vaskulárnej permeability alebo expresii adhézných molekúl v tkanivách Sol-Eng⁺ a kontrolných myší (96).

Štúdia Ruiz-Remolina a kol., 2017 hovorí, že sEng bráni zvýšenej expresii adhézných molekúl (ICAM, VCAM a E-selektín), ktoré sú vyvolané zápalovým stimulom. Zníženie expresie adhézných molekúl môže viesť k zníženiu počtu transmigrovaných leukocytov a to by mohlo vysvetliť zníženie zápalových cytokínov v prítomnosti sEng. Narušená bariéra endotelových buniek vedie k prítoku rozpustených látok a zvýšenej infiltrácii neutrofilov. Preto cirkulujúci sEng by mohol brániť zvýšeniu zápalovo indukovanej vaskulárnej permeability, ktorá bráni zvýšeniu zápalových cytokínov v dôsledku zníženia náboru zápalových buniek (95).

Varejckova a kol., 2017 zistili, že liečba rozpustným endoglinom vedie k aktivácii expresie NF- κ B (nukleárny faktor-kappa B) / IL-6 (interleukin-6), ale taktiež bez výrazných

účinkov na iné markéry endotelovej dysfunkcie a zápalu, vrátane VCAM-1 a ICAM-1 (73).

Na druhej strane, niekoľko dokumentov ukázalo, že podávanie adenovírusového sEng u gravidných myší spôsobovalo zvýšenú expresiu hladín P-selektínu, rozpustného E-selektínu a VCAM-1, zvýšenie počtu leukocytov a narušenie endotelovej vaskulárnej autoregulácie (97).

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, aký vplyv má dlhodobé pôsobenie solubilného endoglínu na expresiu adhézných molekúl VCAM-1, ICAM-1 a P-selektínu. Tieto molekuly zabezpečujú prichytenie leukocytov k vaskulárnemu endotelu a zohrávajú tak úlohu pri zápalových reakciách (98). Expresiu adhézných molekúl sme sledovali pomocou metódy Western blot. Na testovanie sme používali 12 mesačné transgénne samice myší na štandardnej diéte pre hlodavce.

Z výsledkov tejto diplomovej práce môžeme usúdiť, že ani dlhodobé pôsobenie vysokých hladín sEng nevedie k zvýšenej expresii adhézných molekúl v myšacej aorte. Bude ale potrebné potvrdiť tieto výsledky pomocou ďalších metód.

7. ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, aký vplyv má dlhodobé pôsobenie solubilného endoglínu na expresiu adhézných molekúl cievneho endotelu. Skúmali sme expresiu molekuly VCAM-1, ICAM-1 a P-selektínu. Pracovali sme s kontrolnou a s experimentálnou skupinou geneticky modifikovaných samíc myší na štandardnej diéte, ktoré sa líšili hladinami sEng. Išlo o 12 mesačné samice z kmeňa CBAXC57BL/6J.

Na zistenie hladiny cholesterolu a TAG bola využitá biochemická analýza. Táto analýza nepreukázala signifikantný rozdiel medzi transgénymi myšami so zvýšeným sEng a kontrolnou skupinou myší, bez zvýšeného sEng.

Pomocou analýzy ELISA sme stanovili hladiny markérov sVCAM-1 u všetkých skúmaných myší. Ani ELISA analýza nepreukázala signifikantný rozdiel medzi pozorovanými skupinami.

Expresiu adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín sme sledovali a vyhodnotili pomocou metódy Western blot. Štrukturálny proteín GAPDH sme použili ako kontrolu. Podobne aj táto analýza nepreukázala signifikantný rozdiel v expresii adhézných molekúl medzi transgénymi myšami so zvýšeným sEng a kontrolnou skupinou myší, bez zvýšeného sEng.

Na základe výsledkov nemôžeme potvrdiť našu hypotézu. Zistili sme, že dlhodobé pôsobenie sEng nemá značný dopad na dysfunkciu endotelu a zároveň, že vysoké hladiny endoglínu v plazme nemajú výrazný vplyv na expresiu adhézných molekúl endotelovej dysfunkcie ICAM-1, VCAM-1 a P-selektínu.

8. POUŽITÉ SKRATKY

skratka	význam skratky	slovenský význam
ALK	activin receptor like kinase	aktivín receptor podobné kinázy
APS	ammonium persulfate	peroxodisíran amónny
BMPs	bone morphogenetic proteins	kostné morfogenetické proteíny
CAMs	cell adhesion molecules	bunkové adhézne molekuly
ELISA analýza	enzyme-linked immunosorbent immunosorbent assay	enzýmová imunoanalytická metóda
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HRP	horseradish peroxidase	chrenová peroxidáza
HRV	human rhinovirus	ľudský rinovírus
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1	intercelulárna adhézna molekula-1
IL-1	interleukin-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6	interleukin-6
kDa	kilodalton	kilodalton
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1	leukocytový funkčný antigén-1
Mac-1	macrophage-1 antigen	antigén makrofágu
Milli-Q H₂O	„ultrapure“ water	redestilovaná, ultračistá voda
MMP-14	matrix metalloproteinase-14	matrixová metalloproteináza-14
NO	nitrate oxide	oxid dusnatý
NF-κB	nuclear factor-kappa B	nukleárny faktor-kappa B
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	polyakrylamidová gélová elektroforéza

PVDF membrána	polyvinylidene difluoride mambrane	polyvinyliden difluoridová membrána
RIPA	radio immuno precipitation assay buffer	tlmivý roztok používaný k lýze buniek
SDS	sodium dodecyl sulphate	dodecylsírán sodný
SDF-1	the stromal cell-derived factor-1	faktor-1 odvodený zo stromálnych buniek
sEng	soluble endoglin	solubilný endoglin
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule-1	solubilná intercelulárna adhézna molekula-1
Sol-Eng⁺	transgenic mouse model with high level of human sEng	transgénny myšací model s vysokou hladinou ľudského sEng
sP-selektín	soluble P-selectin	rozpustný P-selektín
sVCAM-1	soluble vascular cell adhesion molecule-1	solubilná vaskulárna bunková adhézna molekula-1
TAG	triacylglycerols	triacylglyceroly
TBS	tris-buffered saline	tris pufor hydrochlorid
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine	N, N, N', N' - tetrametyletylendiamín
TGF-β	transforming growth factor- β	transformujúci rastový faktor- β
TNF-α	tumor necrosis factor- α	tumor nekrotizujúci fakto- α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	vaskulárna bunková adhézna molekula-1
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulárny endotelový rastový faktor
VLA-4	very late antigen-4	veľmi neskorý antigén-4

9. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok č. 1: Priečny rez krvnej cievy	- 11 -
Obrázok č. 2: Krvný obeh	- 12 -
Obrázok č. 3: Zobrazenie vrstiev tunica intima, media a adventitia vo véne (vľavo) a v artérii (vpravo)	- 15 -
Obrázok č. 4: Typy kapilár	- 16 -
Obrázok č. 5: Schematické znázornenie steny krvných ciev. Porovnanie tepny, žily a kapiláry	- 17 -
Obrázok č. 6: Endotel vystieľajúci cievy	- 18 -
Obrázok č. 7: Konformačná zmena ligandu VLA-4	- 22 -
Obrázok č. 8: Zobrazenie domén a ligandov molekuly ICAM-1	- 23 -
Obrázok č. 9: Štruktúra adhéznej molekuly P-selektínu	- 25 -
Obrázok č. 10: Štruktúra endoglínu	- 26 -
Obrázok č. 11: Schematická hypotetická úloha endoglínu (CD105) v signálnych dráhach TGF- β /ALK-1 a TGF- β /ALK-5 v endotelových bunkách	- 28 -
Obrázok č. 12: Membránovo viazaná a rozpustná forma endoglínu	- 30 -
Obrázok č. 13: Schéma metódy Western blot	- 31 -
Obrázok č. 14: Elektroforetická aparátúra	- 37 -
Obrázok č. 15: Aparátúra pre prenos proteínov na membránu	- 40 -

10. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka č. 1: Rozpis riedenia vzoriek na 1 gél	- 35 -
Tabuľka č. 2: Zloženie separačného a zaostrovacieho gélu	- 36 -
Tabuľka č. 3: Výber primárnej protilátky podľa príslušného antigénu	- 41 -
Tabuľka č. 4: Výber sekundárnej protilátky podľa príslušného antigénu	- 42 -

11. ZOZNAM GRAFOV

Graf č. 1: Hmotnosť myši v [g]	- 44 -
Graf č. 2: Hladiny celkového cholesterolu v [mmol/L]	- 45 -

Graf č. 3: Hladiny triacylglycerolov (TAG) v [mmol/L]	- 46 -
Graf č. 4: Plazmatické hladiny sVCAM-1 v [ng/mL]	- 47 -
Graf č. 5: Expresia adhéznej molekuly ICAM-1 v [%]	- 48 -
Graf č. 6: Expresia adhéznej molekuly VCAM-1 v [%]	- 49 -
Graf č. 7: Expresia adhéznej molekuly P-selektín v [%].....	- 50 -

12. POUŽITÁ LITERATÚRA

- 1) WANG Z., A KOL. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472, s. 57-63.
- 2) HANSSON G. K., HERMANSSON A. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 12(3), s. 204–212.
- 3) VERSARI D., A KOL. 2009. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol*, 157(4), s. 527–536.
- 4) RUBANYI G.M. (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22(4), s. 1-14.
- 5) ENDEMANN D. H. 2004. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 15(8), s. 1983–1992.
- 6) STEPAN H., KRÄMER T., FABER R. 2007. Maternal Plasma Concentrations of Soluble Endoglin in Pregnancies with Intrauterine Growth Restriction. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(7), s. 2831–2834.
- 7) RATHOUSKA J., A KOL. 2015. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*, 243(2), s. 383-388.
- 8) HUDÁK R., KACHLÍK D., A KOL. 2013. *Memorix anatomie* 1. vydanie, Praha: TRITON, ISBN: 978-80-7387-674-6, s. 264-265.
- 9) VAJNER L., UHLÍK J., NOVOTNÝ T., A KOL. 2014. *Lékařská histologie II. Mikroskopická anatomie*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Karolinum, ISBN 978-80-246-2165-4, s. 6-14.
- 10) JUNQUEIRA L., CARNEIRO J., KELLEY R. 1997. *Základy histologie*, 7. vydání, Jinočany: H & H, ISBN 80-85787-37-7.1, s. 204-218.
- 11) LÜLLMANN-RAUCH R. 2012. *Histologie*. 3.vydání, Praha: Grada, s. 212-224, ISBN 978-80-247-3729-4.
- 12) SAIDI A.R., JAHANSHAHI A. 2018. An Analytical Study on Mechanical Behavior of Human Arteries – A Nonlinear Elastic Double Layer Model. *Scientia Iranica*, 26(4), s. 2432.
- 13) HUDEK F. *Oběhová soustava*. [online][cit. 2020-02-01] Prevezaté z: http://vyuka.zsjarose.cz/index.php?action=lesson_detail&id=432.

- 14) PÁČ L. 2012. *ANATOMIE ČLOVEKA II: Splanchnologie, kardiovaskulární systém, žlázy s vnitřní sekrecí*. 1. vydání, Brno: Masarykova univerzita, ISBN: 978-80-210-4291-9, s. 132-172.
- 15) MEGÍAS M., MOLIST P., POMBAL M.A. 2019. *Atlas of Plant and Animal Histology* [online][cit. 2020-01-31] Prevezaté z :
http://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_inicio.php.
- 16) VAJNER L., A KOL. 2014. *Lékařská histologie II. Mikroskopická anatomie*, první dotisk, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Karolinum, s. 9, ISBN 978-80-246-2165-4.
- 17) HEARD B. 2013. *The Cardiovascular System: Blood Vessels: Part A* [online][cit. 2020-01-31] Prevezaté z:
http://web.as.uky.edu/Biology/faculty/cooper/BCTC/ch19_lecture_presentation.pdf.
- 18) RAJENDRAN P. A KOL. 2013. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*, 9(10), s. 1057-1069.
- 19) DURAND M.J., GUTTERMAN D.D. 2013. Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. *Microcirculation*, 20(3), s. 239–247.
- 20) PRIES A. R., KUEBLER W. M. 2006. *The Vascular Endothelium I.*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-540-32966-4, vol 176/I., Normal Endothelium, s. 2-3.
- 21) GALLEY H.F. a WEBSTER N.R. 2004. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*, 93(1), s. 105-113.
- 22) *Endotel* [online][cit. 2020-01-31] Prevezaté z:
<http://biyolojiterimleri.com/?madde=Endotel>.
- 23) LÜSCHER T.F., BARTON M. 1997. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*, 20(11 suppl 2), s. II-3-10.
- 24) KINLAY S., LIBBY P., GANZ P. 2001. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol*, 12(4), s. 383–389.
- 25) VANE J.R., ANGGARD E.E., BOTTING R.M. 1990. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*, 323(1), s. 27–36.
- 26) DREXLER H. 1998. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol*, 82(9), s. 3S–4S.
- 27) BEHRENDT D., GANZ P. 2002. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*, 90(suppl), s. 40L–48L.

- 28) SOWERS J. R. 2002. Hypertension, Angiotensin II, and Oxidative Stress. *N Engl J Med*, 346(25), s. 1999–2001.
- 29) DAVIGNON J. 2004. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*, 109(23_suppl_1), s. III–27–III–32.
- 30) HADI H.A., CARR C.S., AL SUWAIDI H. 2005. Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vasc Health Risk Manag*, 1(3), s. 183–198.
- 31) BLANKENBERG S., BARBAUX S., TIRET L. 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170(2), s. 191–192.
- 32) KIM I., A KOL. 2000. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- κ B Activation in Endothelial Cells. *J Biol Chem*, 276(10), s. 7614–7620.
- 33) RUBANYI G.M., VANHOUTTE P.M. 1986. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol*, 250(5), s. H822–H827.
- 34) DEVARAJ S., SINGH U., JIALAL I. 2009. The Evolving Role of C-Reactive Protein in Atherothrombosis. *Clin Chem*, 55(2), s. 229–238.
- 35) HYNES R.O., LANDER A.D. 1992. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*, 68(2), s. 303–322.
- 36) SPRINGER T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283), s. 425–434.
- 37) BISCHOFF J. 1997. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest*, 99(3), s. 373–376.
- 38) POLTE T., A KOL. 1991. Structural and functional studies of full-length vascular cell adhesion molecule-1: internal duplication and homology to several adhesion proteins. *DNA Cell Biol*, 10(5), s. 349–357.
- 39) BROCKMEYER C. M., A KOL. 1993. Riethmuller and H. E. Feucht. (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation*, 55(3), s. 610–615.
- 40) KONG D.H., A KOL. 2018. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(4), s. 1957.
- 41) MAKGOBA M., A KOL. 1998. ICAM-1, a ligand for LFA-1 dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature*, 331(6151), s. 86–88.

- 42) WIKIPEDIA. 2018. *VLA-4* [online][cit. 2020-03-02] Prevzaté z:
<https://en.wikipedia.org/wiki/VLA-4>.
- 43) LAWSON C., WOLF S. 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 61(1), 22–32.
- 44) VAN DE STOLPE A., VAN DER SAAG P.T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*, 74(1), s. 13–33.
- 45) STAUNTON D.E., A KOL. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*, 61(2), s. 243–254.
- 46) GEARING A.J., NEWMAN W. 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*, 14(10), s. 506–512.
- 47) THORNHILL M., A KOL. 1991. Tumour necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gama to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. *J Immunol*, 146(2), s. 592-598.
- 48) HUBBARD A.K., ROTHLEIN R. 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biol Med*, 28(9), s.1379-1386.
- 49) BEVILACQUA M.P. 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*, 11, s. 767-804.
- 50) PETRUZZELLI L., TAKAMI M., HUMES H.D. 1999. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med*, 106(4), s. 467-476.
- 51) ROSALES C., JULIANO R.L. 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol*, 57(2), s. 189-198.
- 52) BURGER P.C., WAGNER D.D. 2003. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*. 101(7), s. 2661-2666.
- 53) DUNLOP L.C., A KOL. 1992. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med*, 175(4), s. 1147-1150.
- 54) ANDRE P., A KOL. 2000. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(25), s. 13835-13840.
- 55) DRICKAMER K. 2011. *P-Selectin* [online][cit. 2020-03-02] Prevzaté z:
<http://www.functionalglycomics.org/CFGparadigms/index.php/P-Selectin>.
- 56) GOUGOS A., LETARTE M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*, 265(15) s. 8361 – 8364.

- 57) LI C., A KOL. 2000. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta 1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J*, 14(1), s. 55–64
- 58) GUERRERO-ESTEO M., A KOL. 2002. Extracellular and Cytoplasmic Domains of Endoglin Interact with the Transforming Growth Factor- β Receptors I and II. *J Biol Chem*, 277(32), s. 29197–29209.
- 59) GOUGOS A., LETARTE M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*, 265(15), s. 8361–8364
- 60) LÓPEZ-NOVOA J.M., BERNABEU C. 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299(4), s. H959-H974.
- 61) JOVINE L., A KOL. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem*, 74, s. 83–114.
- 62) LASTRES P., A KOL. 1994. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*, 301(3), s. 765–768.
- 63) YAMASHITA H., A KOL. 1994. Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 269(3), s. 1995–2001.
- 64) LOPEZ-CASILLAS F., A KOL. 1991. Structure and expression of the membrane proteo- glycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*, 67(4), s. 785–795.
- 65) BLANCO F.J., A KOL. 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol*, 204(2), s. 574–584.
- 66) BUDA V., A KOL. 2019. Decreased sEng plasma levels in hypertensive patients with endothelial dysfunction under chronic treatment with Perindopril. *Drug Des Devel Ther*, 13, s. 1915–1925.
- 67) BERNABEU C., CONLEY B.A., VARY C.P. 2007. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem*, 102(6), s. 1375–1388.
- 68) CHEN K., A KOL. 2004. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res*, 95(12), s. 1167–1173.
- 69) RODRIGUEZ-PENA A., A KOL. 2002. Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension*, 40(5), s. 713–720.

- 70) CLEMENTE M., A KOL. 2006. Increased intrahepatic and circulating levels of endoglin, a TGF-beta1 co-receptor, in patients with chronic hepatitis C virus infection: relationship to histological and serum markers of hepatic fibrosis. *J Viral Hepat*, 13(9), s. 625–632.
- 71) LASTRES P., A KOL. 1992. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*, 22(2), s. 393–397.
- 72) BOTELLA L.M., A KOL. 2001. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem*, 276(37), s. 34486–34494.
- 73) LI C., A KOL. 2003. TNF α down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF β 1. *Anticancer Res*, 23(2B), s. 1189–1196.
- 74) ROBERTS A.B., SPORN M.B. 1993. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors*, 8(1), s. 1–9.
- 75) WEISS A., ATTISANO L. 2012. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(1), s. 47–63.
- 76) MASSAGUÉ J. 1998. TGF β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, s. 753–791.
- 77) CHEIFETZ S., A KOL. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267(27), s. 19027–19030.
- 78) LETAMENDÍA A., A KOL. 1998. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- beta. A comparative study with betaglycan. *J. Biol. Chem.* 273(49), s. 33011–33019.
- 79) MASSAGUE J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, s. 753–791.
- 80) GOUMANS M.J., A KOL. 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- beta type I receptors. *EMBO J*, 21(7), s. 1743–1753.
- 81) CHENY.G., MASSAGUÉ J. 1999. Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-b family receptors. *J Biol Chem*, 274(6), s. 3672-3677.

- 82) FONSATTI E., A KOL.. 2010. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res*, 86(1), s. 14.
- 83) VENKATESHA S., A KOL. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*, 12(6), s. 642–649.
- 84) LUFT F.C. 2006. Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule. *Nephrol Dial Transplant*, 21(11), s. 3052–3054.
- 85) TOWBIN H., STAEBELIN T., GORDON J. 1974. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), s. 4350–4354.
- 86) WEISS W., GÖRG A. 2008. Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 424, s. 35–42.
- 87) *Public Lab* [online][cit. 2020-04-27] Prevzaté z: <https://publiclab.org/notes/rosieliu/11-19-2018/how-to-calculate-protein-concentration-for-western-blot>.
- 88) VALBUENA-DIEZ A. C., A KOL. 2012. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*, 126(22), s. 2612–2624.
- 89) *LAB Guide, průvodce laboratoři, Western blot* [online][2020-02-15] Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/western-blot/>.
- 90) *Biopedia, Elektroforéza nukleových kyselin* [online][2020-02-15] Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/elektroforeza-nukleovych-kyselin>.
- 91) *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* [online][cit. 2020-02-15] Prevzaté z: <https://www.bio-rad.com/en-sk/product/mini-protean-tetra-cell?ID=d5d6580e-b8f6-4f1c-bbc4-f63d360ea788>.
- 92) *Mini Trans-Blot® Cell* [online][cit. 2020-02-15] Prevzaté z: <https://www.bio-rad.com/en-sk/applications-technologies/types-western-blotting-equipment-cells-power-supplies?ID=LUSPQXC4S>.
- 93) SCHOONDERWOERD M. J. A., GOUMANS M.-J. T. H., HAWINKELS L. J. A. C. 2020. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules*, 10(2), s. 289.
- 94) NACHTIGAL P., A KOL. 2012. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 224(1), s. 4–11.
- 95) RUIZ-REMOLINA L., A KOL. 2017. Circulating soluble endoglin modifies the inflammatory response in mice. *PloS One*, 12(11), s. 1-24.

- 96) NEMECKOVA I., A KOL. 2015. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PloS One*, 10(3), s. 1-13.
- 97) WALSH T.E., A KOL. 2009. Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(8), s. 1185–1192.
- 98) CHEN Y.H., A KOL. 2006. Anti-Inflammatory Effects of Different Drugs/Agents with Antioxidant Property on Endothelial Expression of Adhesion Molecules. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 6(4), s. 279-304.