

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Sledovanie zmeny expresie vybraných ukazovateľov u
glukózou indukované endotelové dysfunkcie in vitro**

Alexandra Hudecová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Katarína Tripská

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Podakovanie

Predovšetkým by som sa chcela poďakovať svojmu vedúcemu diplomovej práce prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za čas, ktorý mi venoval a za ochotu pri zodpovedaní odborných aj praktických otázok spojených s touto diplomovou prácou. Ďalej by som chcela poďakovať Mgr. Kataríne Tripské za pomoc a trpezlivosť s experimentálnou časťou a za cenné rady pri spisovaní tejto diplomovej práci. V neposlednom rade patrí vďaka aj mojej rodine za ich neustálu podporu počas celého môjho štúdia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

OBSAH

Obsah	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1 Endotel	11
2.1.1 Funkcia endotelu	13
2.2 Dysfunkcia endotelu	17
2.2.1 Príčiny vzniku ED	17
2.2.2 Následky ED	18
2.3 Endoglin	20
2.3.1 Štruktúra endoglínu	20
2.3.2 Signalizačná kaskáda	21
2.3.3 Expresia endoglínu	23
2.3.4 Solubilný endoglin	23
2.3.5 Funkcia endoglínu a jeho vzťah k endotelovej dysfunkcii	23
2.4 Diabetes mellitus	26
2.4.1 Diabetes mellitus 1.typu	29
2.4.2 Diabetes mellitus 2.typu	30
2.4.3 Hyperglykémia a jej vzťah k endotelovej dysfunkcii	33
2.5 Adhézne molekuly	35
2.5.1 ICAM-1	37
2.5.2 VCAM-1	39
2.6 Carotuximab	42
2.6.1 Mechanizmus účinku	42
2.6.2 Klinické použitie	43
2.7 Prietoková cytometria	44
2.7.1 Typy prietokovej cytometrie	48

2.8	Polymerázová reťazová reakcia	52
2.8.1	Real time kvantitatívna PCR.....	54
3.	ZADANIE – CIEĽ PRÁCE	57
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	58
4.1	HAEC.....	58
4.2	Príprava vzoriek.....	59
4.2.1	Rozmrazovanie buniek.....	59
4.2.2	Pasážovanie.....	60
4.2.3	Premedikácia buniek na PCR/FC.....	62
4.3.	PCR.....	66
4.4	Prietoková cytometria	72
5.	VÝSLEDKY.....	74
5.1	PCR	74
5.1.1	mRNA expresia Eng.....	75
5.1.2	mRNA expresia eNOS.....	76
5.1.3	mRNA expresia ICAM-1.....	77
5.1.4	mRNA expresia VCAM-1	78
5.1.5	mRNA expresia SELE	79
5.2	Prietoková cytometria.....	80
5.2.1	Proteínová hladina Eng.....	81
5.2.2	Proteínová hladina ICAM-1.....	82
6.	DISKUSIA.....	83
7.	ZÁVER	86
8.	POUŽITÉ SKRATKY	87
9.	ZOZNAM TABULIEK	91
10.	ZOZNAM OBRÁZKOV	92
11.	ZOZNAM GRAFOV	93

12.	POUŽITÁ LETERATÚRA	94
-----	--------------------------	----

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Názov diplomovej práce: Sledovanie zmeny expresie vybraných ukazovateľov u glukózou indukované endotelové dysfunkcie in vitro.

Autor: Alexandra Hudecová

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Cieľ práce: Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či nová monoklonálna protilátka carotuximab ovplyvňuje expresiu endoglínu a ďalších biomarkerov endotelovej dysfunkcie (eNOS, ICAM-1, VCAM-1, E-selektín), u ľudských aortálnych endotelových buniek, ktoré boli vystavené pôsobeniu vysokej hladiny glukózy.

Metódy: Ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC) boli po dobu 72 hodín vystavené pôsobeniu vysokej hladiny glukózy (45 mmol) a po dobu 12 hodín pôsobeniu carotuximabu (300 µg/ml). Pomocou real-time PCR sme zmerali génovú expresiu endoglínu, eNOS, ICAM-1, VCAM-1, E-selektínu. Metódou prietokovej cytometrie sme zmerali proteínové hladiny endoglínu a ICAM-1.

Výsledky: Génová expresia endoglínu a všetkých biomarkerov endotelovej dysfunkcie bola po pôsobení vysokej glukózy signifikantne zvýšená. Po pridaní carotuximabu k vysokej glukóze došlo k signifikantnému zvýšeniu génovej expresie u eNOS, zatiaľ čo u endoglínu ani ostatných markerov endotelovej dysfunkcie nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel. Proteínová hladina endoglínu bola po pôsobení vysokej glukózy signifikantne zvýšená a po pridaní carotuximabu došlo k výraznému poklesu endoglínu. Podobne, proteínová hladina ICAM-1 bola po vysokej glukóze signifikantne zvýšená, avšak pridanie carotuximabu viedlo k jej ďalšiemu nárastu.

Záver: Tieto výsledky dokazujú, že carotuximab má vplyv na glukózou-indukovanú expresiu endoglínu a ostatných biomarkerov endotelovej dysfunkcie, avšak presný dopad týchto dejov musí byť ďalej preskúmaný.

Kľúčové slová: endoglín, endotelová dysfunkcia, hyperglykémia, carotuximab (TRC 105)

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Monitoring the change in expression of selected indicators in the glucose induced endothelial dysfunction in vitro.

Author: Alexandra Hudecová

Supervisor of Diploma Thesis: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Background: The aim of this diploma thesis was to determine, whether the new monoclonal antibody carotuximab affects the expression of endoglin and other biomarkers of endothelial dysfunction (eNOS, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) in human aortic endothelial cells exposed to high glucose.

Methods: Human aortic endothelial cells (HAEC) were exposed to high glucose levels (45 mmol) for 72 hours and carotuximab (300 µg/ml) for 12 hours. We measured the gene expression of endoglin, eNOS, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin by real-time PCR. We measured endoglin and ICAM-1 protein levels by flow cytometry.

Results: Gene expression of endoglin and all biomarkers of endothelial dysfunction was significantly increased after high glucose. After the addition of carotuximab to high glucose, we observed a significant increase in gene expression of eNOS, while no significant difference was measured in endoglin or other markers of endothelial dysfunction. Protein levels of endoglin were significantly increased after high glucose and after the addition of carotuximab we observed a significant decrease in protein levels of endoglin. The protein levels of ICAM-1 were significantly increased after high glucose and the addition of carotuximab led to a further increase of ICAM-1 protein levels.

Conclusion: These results demonstrate that carotuximab has an effect on high glucose-induced expression of endoglin and other biomarkers of endothelial dysfunction, but the consequences of these results need to be further investigated.

Key words: endoglin, endothelial dysfunction, hyperglycemia, carotuximab (TRC 105)

1. ÚVOD

Endotel, najväčší orgán v tele, je umiestnený medzi stenou krvných ciev a krvným obehom [1]. Endotelové bunky sa podieľajú na regulovaní vaskulárneho tonu, trombózy a hemostázy ale aj zápalových reakcií s cieľom zachovať normálne fungovanie v obehovom systéme [2]. Najznámejšou vazodilatačnou látkou produkovanou endotelom je oxid dusnatý. Na druhej strane endotel uvoľňuje vazokonstriktory ako sú endotelín-1, angiotenzín II, tromboxan A2 a reaktívne formy kyslíku [1].

Rôzne škodlivé podnety ako je oxidačný stres a zápal môžu viesť k rozvoju endotelovej dysfunkcie [2]. Dysfunkcia môže nastať pri nerovnováhe medzi dilatačne a vazokonstriktorne pôsobiacimi faktormi či medzi antikoagulačne a prokoagulačne pôsobiacimi faktormi [3]. Endotelová dysfunkcia je dôležitým predstupňom v patogenézií aterosklerózy a podieľa sa aj na patofyziológii rôznych foriem kardiovaskulárnych chorôb: arteriálnej hypertenzie, ischemickej choroby srdca, zlyhaní srdca a diabete mellitus [1]. Pri zápalovom procese sa na prestupe leukocytov do subendotelovej časti podieľajú aj adhézne molekuly a zúčastňujú sa teda aj rozvoja dysfunkcie endotelu [4].

Najčastejšou formou diabete mellitus (DM) je DM 2. typu, ktorý predstavuje 90% diabetikov. Vzniká na základe rezistencie periférnych buniek na inzulín a jeho nedostatočnej sekrécie [5]. Toto ochorenie je teda charakteristické chronickou hyperglykémiou. Predpokladá sa, že hyperglykémia vytvára nerovnováhu medzi dostupnosťou NO a reaktívnymi formami kyslíku (ROS), ale aj reaktívnych foriem dusíku, čo vedie k endotelovej dysfunkcii. Hyperglykémia spôsobuje vyššiu produkciu adhézných molekúl a cytokínov, čo aktivuje zápalové bunky v cievnej stene. Pri stave hyperglykémie je zvýšená aj náchylnosť k tvorbe trombov [6].

Endoglin je transmembránový proteín, ktorý je prítomný u endotelových buniek a podieľa sa na aktivácii TGF- β signalizačnej dráhy [7]. Zmeny expresie a funkcie endoglinu sú spojené s rôznymi patologickými stavmi ako napríklad: nádorové ochorenia, angiogenézia, zápalové stavy a endotelová dysfunkcia [8]. Dôležitú úlohu

zohráva aj pri arteriálnej hypertenzii, metabolickom syndróme, cukrovke a iných kardiovaskulárnych ochoreniach [9].

Carotuximab (TRC 105) je monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na humánny a myší endogln. Po naviazaní dochádza k zablokovaniu signalizačnej kaskády endoglnu a výsledkom je inhibícia angiogenézie [10, 11], takže sa jedná o potencionálne protinádorové liečivo [12].

Táto diplomová práca sa venuje sledovaniu zmien v génovej expresii a proteínových hladinách u biomarkrov dysfunkcie endotelu pod vplyvom pôsobenia vysokých hladín glukózy a liečiva TRC 105.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Endotel

Endotel je tvorený tenkou vrstvou endotelových buniek (endothelial cells, EC), ktorá oddeľuje cievny lúmen od okolitých tkanív [13]. Cievne endotelové bunky lemujú celý obehový systém - od srdca až po tie najmenšie kapiláry. V minulosti bol považovaný za obal a nemal žiadne špecifické funkcie iba poskytovanie selektívnej permeability pre vodu a elektrolyty. Postupné pokroky viedli k lepšiemu pochopeniu komplexnej funkcie tohto veľkého endokrinného orgánu [14].

Endotel je tvorený tesne priliehajúcimi bunkami [13]. Tie sú navzájom prepojené rôznymi typmi adhézných štruktúr alebo spojmi typu bunka - bunka. Na základe morfológie a ich funkcie boli popísané tri základné typy spojov medzi bunkami.

1. Tesné spoje - tight junctions
2. Adherenčné spoje - adherens junctions
3. Spojovacie medzery - gap junctions [15]

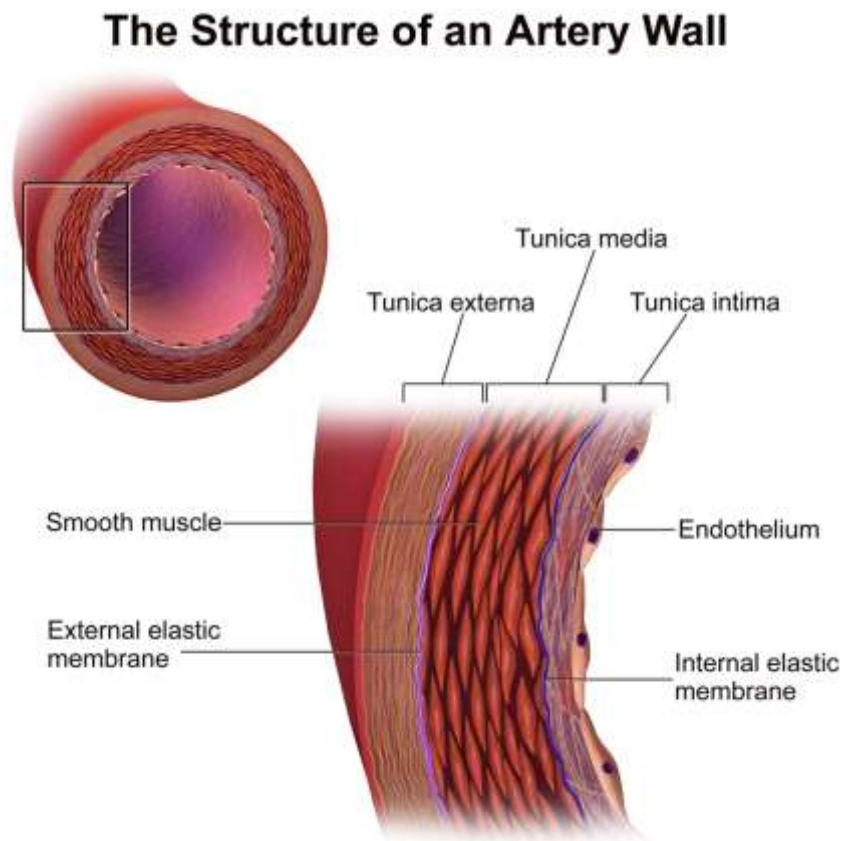
EC su polarizované - luminálnu membránu majú priamo vystavenú k cirkulácii krvi, bazolaterálny povrch smeruje k tkanivám a je od nich oddelený bazolaterálnou glykoproteínovou membránou, ktorá je ukotvená a vylučovaná samotnými EC. V závislosti od orgánu a tkaniva sa ich tvar mení, ale vo všeobecnosti môžeme povedať, že sú tenké a mierne pretiahnuté. Ich rozmery sú popísané zhruba dĺžkou 30-50 μm , šírkou 10-30 μm a hrúbkou 0,1-10 μm [16].

Stena tepny (viz. obrázok č. 1) pozostáva z troch vrstiev – *tunica externa* (vonkajšia vrstva) je tvorená tzv. spojivovým tkanivom, v ktorom prevládajú kolagénne a elastické vlákna. Stredná vrstva - *tunica media*, je tvorená bunkami hladkého svalstva a vnútorná vrstva - *tunica intima* obsahuje EC tvoriace lem cievnej steny [17].

Okrem celej rady ďalších procesov endotel reguluje aj bariérové vlastnosti vaskulárnej steny. V zdravom stave reguluje priechod tekutín a živín nie len do tkanív a orgánov, ale aj von z nich. Za patologických podmienok môže byť funkcia endotelových buniek vážne narušená a môže nastať akútny vaskulárny stav – ťažká sepsa a

anafylaktický šok alebo chronický vaskulárny stav - diabetická retinopatia či ateroskleróza [13].

Obrázok 1: Stavba steny tepny



Obrázok znázorňuje stavbu steny tepny (*The structure of an artery wall*). Vľavo je vonkajšia vrstva (*tunica externa*), potom nasleduje vonkajšia elastická membrána (*external elastic membrane*), ďalej stredná vrstva (*tunica media*), ktorá obsahuje bunky hladkého svalstva (*smooth muscle*). Nasleduje vnútorná elastická membrána (*internal elastic membrane*) a monovrstva jednotlivých endotelových buniek, ktorá je súčasťou vnútornej vrstvy (*tunica intima*).

Prevzaté z: en.wikipedia.org, *Tunica externa* [online] dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/Tunica_externa#Structure [17.3.2021]

2.1.1 Funkcie endotelu

Hemostáza

Aby bola zachovaná bariérová funkcia endotelu je potrebné po narušení cievy rýchlo toto poškodenie opraviť. Ak dôjde k poraneniu tkaniva, často dochádza aj k poraneniu cievy. To iniciuje, aby endotel zahájil procesy zamerané na zastavenie krvácania. Tento proces sa nazýva koagulácia – tvorba pevných krvných zrazenín, ktoré upchávajú otvor v cieve a tak zastavujú krvácanie. Avšak je dôležité aby táto funkcia bola aktivovaná v správnej chvíli, pretože keď je aktivovaná aberantne môže byť nebezpečná a mať fatálne následky. V prípade ak sa zrazeniny tvoria nekontrolovane, môžu upchávať cievy, hlavne úzke kapiláry, a viesť tak k trombóze [18].

Proces hemostázy je prísne regulovaný a závislý na úplnej kaskáde proteázových aktivít a na proenzýmoch. Na tvorbe zrazeniny sa podieľajú prokoagulačné molekuly. Proces je iniciovaný odhalením tkaninového faktoru (TF), ktorý je exprimovaný subendotelovými bunkami, a normálne je teda skrytý v neporušenej vrstve. Keď dochádza k zraneniu, tento tkanivový faktor je vystavený krvi a interaguje s ďalším faktorom - VIIa. Týmto dôjde k aktivácii koagulačnej kaskády [18].

Aktivácia koagulačnej kaskády je zakončená tvorbou fibrínu z fibrinogénu. Fibrinogén sa mení na lepkavú látku, ktorá vytvára sieť pre aktivované krvné doštičky. Podporuje tým tvorbu zrazeniny. Vzniknuté tromby môžu byť behom hojenia degradované proteázami, napríklad plazmínom [18].

Vaskulárny tonus

Vaskulárny tonus je rovnovážne regulovaný prostredníctvom vazodilatačných a vazokonstričných faktorov. Hlavným cieľom je udržanie krvného tlaku a prietoku krvi. EC vysielajú parakrinné signály do buniek hladkého svalstva. Tie môžu vyvolať sťah cievy alebo naopak jej uvoľnenie [18].

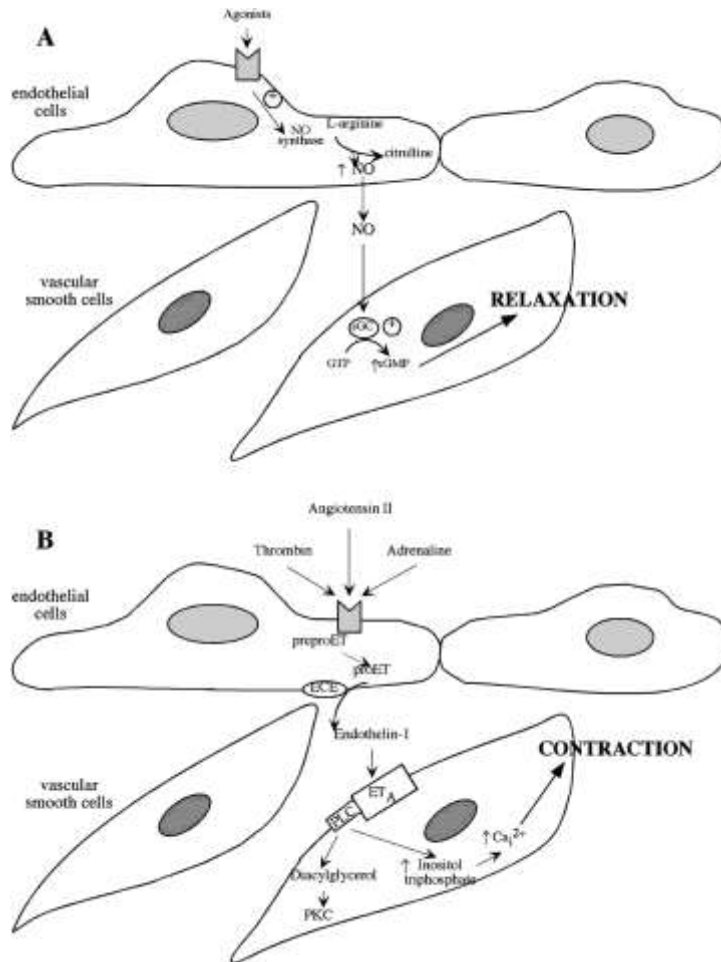
Najdôležitejší vazodilatačný činiteľ je oxid dusnatý (NO). EC ho produkujú neustále, ale jeho produkcia môže byť ovplyvnená ďalšími faktormi. NO je syntetizovaný z kyslíku a aminokyseliny L-arginínu pomocou enzýmu endotelová NO syntáza (eNOS).

NO prechádza do buniek hladkého svalstva, kde stimuluje guanylát cyklázu (GC), čo vedie k tvorbe cyklického guanozín 3'5'-monofosfátu (cGMP) a následne k relaxácii ciev [15].

V prípade nedostatku kyslíka v tkanivách, endotel generuje nie len NO, ale aj prostaglandín I₂, hlavne z dôvodu zvýšeného prietoku krvi [3]. V bunkách hladkého svalstva spôsobuje aktiváciu adenylát cyklázy (AC) a následnú tvorbu cyklického adenosín 3'5'-monofosfátu (cAMP).

Medzi najdôležitejšie činitele, ktoré pôsobia vazokonstrikčne patrí endotelin-1 (ET-1), tromboxan A₂ (TXA₂), prostaglandín H₂ (PGH₂) a angiotenzín II. ET-1 je tvorený výlučne EC a jedná sa o peptid. Pôsobí silne konstrikčne, čím môže vyvolať až stav ischémie alebo arytmie. ET-1 vykazuje aj prozápalové a promitogénne vlastnosti. Existujú dva rôzne typy receptorov v EC pre ET-1, prvý typ ET-A a druhý ET-B, ktoré vedú k vazokonstrikcii a proliferácii buniek hladkého svalstva ciev [3]. TXA₂ a PGH₂ vedú k aktivácii tromboxanových receptorov na doštičkách a bunkách hladkého svalstva ciev, a pôsobia teda antagonisticky voči NO. Angiotenzín I je premieňaný na angiotenzín II prostredníctvom angiotenzín konvertujúceho enzýmu. To vedie k degradácii bradykinínu, ktorý má vasodilatačné účinky. Angiotenzín II nasadá na angiotenzínové receptory a tie ďalej stimulujú tvorbu ET-1 a ďalších mediátorov. Nastáva vazokonstrikcia [3]. Mechanizmus vazodilatácie a vazokonstrikcie je zobrazený na obrázku č. 2.

Obrázok 2: Vazodilatácia a vazokonstrikcia



Obrázok A popisuje proces vazodilatácie (relaxation). Po stimulácii receptorov endotelových buniek (endothelial cells) agonistami (agonists) sa aktivuje enzým NO syntáza a dochádza k tvorbe NO z L-arginínu. NO následne prechádza do buniek hladného svalstva v cievach (vascular smooth cells), kde aktivuje GC, ktorá premieňa GTP (guanozín-trifosfát) na cGMP. To vedie k dilatácii buniek. Obrázok B popisuje kontrakciu buniek hladkého svalstva (contraction). V endotelových bunkách po aktivácii receptorov angiotenzinom II, adrenalínom alebo trombínom, dochádza k premene preproEndotelínu (preproET) na proEndotelín (proET) a následne z tejto formy vzniká Endotelín-1 pomocou Endotelín konvertujúceho enzýmu (ECE). Endotelín-1 prechádza do buniek hladkého svalstva, stimuluje svoje receptory (ET-A) čo vedie k aktivácii fosfolipázy C (PLC) a dochádza k zvýšeniu hladiny inozitol-trifosfátu a Ca²⁺ iónov. Výsledkom je kontrakcia buniek hladkého svalstva.

Prevzaté z: *Endothelial cell functions* [15]

Angiogenéza

Jedná sa o tvorbu nových krvných ciev, ktorá je potrebná behom vývoja a rastu, ale je spojená aj s opravou tkanív a obnovením dodania kyslíku a metabolitov napríklad pri ischemických stavoch alebo v prípade zápalu.

Pri angiogenéze dochádza k aktivácii EC a jednotlivé bunky z existujúcich ciev začnú migrovať v smere gradientu vaskulárneho endotelového rastového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF), ktorý je produkovaný pri hypoxických podmienkach [18].

Permeabilita

EC vytvárajú vo väčšine orgánov dynamickú bariéru medzi krvou a tkanivami. Za normálnych podmienok dochádza ku konštantnému prepúšťaniu rozpustných látok a malých molekúl, ale prechod väčších molekúl a buniek je už obmedzený [19]. Malé molekuly prechádzajú pomocou difúzie, ktorá je riadená koncentračným gradientom [20]. Malé lipofilné látky sa môžu rozpúšťať v membránach EC a tak prechádzať z cievného lúmen do interstícia [20].

Leukocyty majú schopnosť migrovať z cievného systému do miesta poranenia, čo je nevyhnutné napríklad pri zápale. Ich prestup vyžaduje molekulárne mechanizmy, ktoré umožnia rozpoznať miesta zápalu. Rozpoznanie a vytvorenie kontaktu sa uskutočňuje prostredníctvom adhézných molekúl. Patria sem molekuly, ktoré sú exprimované na bunkách endotelu - napríklad medzibunková adhézna molekula (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) alebo cievná adhézna bunková molekula (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) [15].

Permeabilita je ovplyvnená aj zápalovými cytokínmi ako je bradykinín a histamín ale napríklad aj rastovým faktorom VEGF. Taktiež stav po akútnom infarkte myokardu môže spôsobovať zmeny v permeabilite endotelu [19].

2.2 Dysfunkcia endotelu

Endotelová dysfunkcia (endothelial dysfunction, ED) nastáva pri nerovnováhe medzi dilatácie a vazokonstrikčne pôsobiacimi faktormi, medzi antikoagulačne a prokoagulačne pôsobiacimi faktormi a medzi rastovými faktormi. Poškodenie endotelu môže byť mechanické (fyzikálne), napríklad pri ochorení ako je arteriálna hypertenzia. Na druhej strane sa môže jednať o poškodenie biochemické, napríklad pri hypercholesterolémií, diabete mellitus alebo fajčení [3]. Vznik ED schematicky znázorňuje obrázok č. 3.

2.2.1 Príčiny vzniku ED

Oxidatívny stres

Oxidatívny stres vzniká, keď produkcia reaktívnych foriem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) prevýši vlastnú antioxidačnú obranu. ROS sú druhými poslami v signálnych kaskádach na udržanie homeostázy v bunkách. Zvýšenie ich množstva môže viesť k poškodeniu bunkových štruktúr a zhoršeniu ich funkcie. Vysoká reaktivita kyslíku tiež predstavuje riziko napadnutia akejkoľvek molekuly (proteín, lipid, DNA- (deoxyribonukleová kyselina)). Rovnováhu udržiava práve antioxidačný systém. Niekedy môže byť táto rovnováha narušená a vtedy hovoríme o zmene prooxidačnej-antioxidačnej rovnováhy [21]. Zvýšený oxidatívny stres bol popísaný pri rôznych ochoreniach, napríklad arteriálnej hypertenzií, ateroskleróze, cievnej mozgovej príhode či diabete mellitus [14].

Nedostatok oxidu dusnatého

Endotel uvoľňuje jednu z najdôležitejších vazodilatačných látok a to je NO. Ten pôsobí vazodilatačne, inhibuje zápalovú reakciu a má antiagregačné účinky na krvné doštičky.

Enzým NO syntáza sa podieľa na tvorbe NO. Funkcia tohto enzýmu môže byť znížená endogénnymi alebo exogénnymi inhibítormi. Nedostatok NO ale môže spôsobiť aj neprítomnosť substrátu L-arginínu [1].

Taktiež bolo publikované, že oxidatívny stres potlačuje tvorbu NO tým, že sa namiesto neho tvorí peroxynitrit, cytotoxický oxidant. Ten spôsobuje nitráciu bielkovín a následné poškodenie endotelu. Peroxynitrit je dôležitý mediátor oxidácie lipoproteínov s nízkou hustotou (low density lipoproteins, LDL) a má teda proaterogénne vlastnosti. Oxidačný prebytok priamo súvisí s pro-zápalovým stavom v stenách ciev. ROS zvyšuje expresiu adhézných molekúl (ICAM-1 a VCAM-1) a chemotaktických molekúl (monocyte chemoattractant peptide-1, MCP-1). Pri zápale je prítomný aj C-reaktívny proteín (CRP), u ktorého bolo dokázané priame znížovanie aktivity eNOS [1].

2.2.2 Následky ED

Arteriálna hypertenzia

Na jednej strane niektoré štúdie uvádzajú, že ED spôsobuje arteriálnu hypertenziu (AH). Na strane druhej iné štúdie tvrdia, že AH vedie k poškodeniu funkcie endotelu. Nie je preto známe, či je AH výsledkom alebo príčinou tohto poškodenia. U pacientov s hypertenziou sa často zistila nižšia produkcia endotelových vazodilatačných faktorov, poprípade ich neúčinnosť a nadprodukcia vazokonstrikčných látok. Hypertenzné stavy tiež vedú k zvýšenému oxidačnému stresu z dôvodu zníženej dostupnosti NO. Vyšší oxidačný stres môže byť tiež spôsobený prítomnosťou angiotenzínu II, ktorý stimuluje NADPH-oxidázu k tvorbe ROS [14].

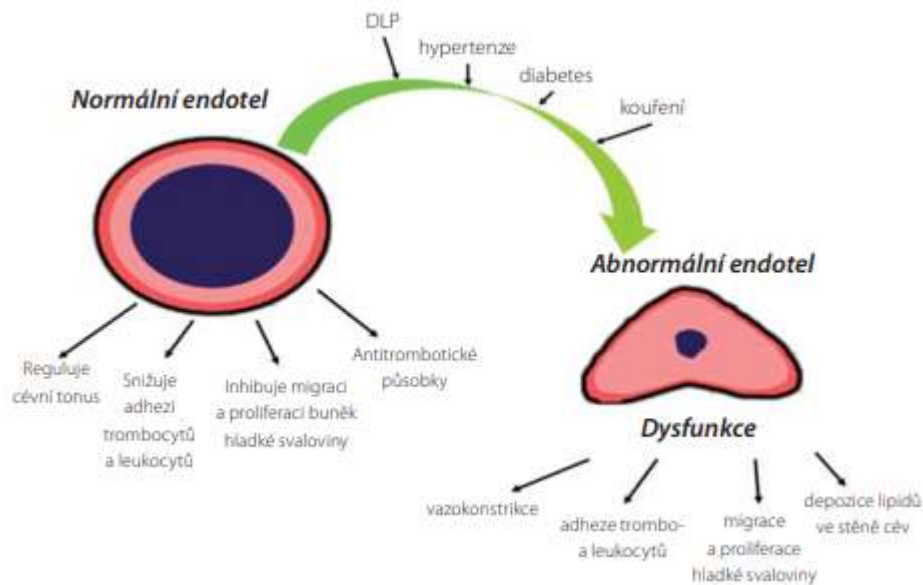
Ateroskleróza

Ateroskleróza (ATS) postihuje hlavne veľké a stredne veľké artérie a je pre ňu typická ED, vaskulárny zápal, hromadenie lipidov, vápniku a bunkového odpadu v cievnej stene [22].

Zmeny funkcie endotelu nastávajú už pred samotným začiatkom štrukturálnych aterosklerotických zmien. Pri ED sa priepustnosť endotelu výrazne zvyšuje, pretože dochádza k nepomeru medzi vazoaktívnymi a hemokoagulačnými činiteľmi. To vedie k vyššej adhézii a priepustnosti pre lipidy a makrofágy [23]. Za možné príčiny poškodenia endotelu sa považujú tukové častice LDL, infekčné agens a toxíny. Monocyty prestupujú

do subendotelovej vrstvy, kde pohlcujú lipidy a vznikajú z nich tzv. „penové bunky“. Tie vylučujú látky, ktoré môžu endotel poškodzovať alebo môžu podporovať proliferáciu hladkých svalových buniek [22].

Obrázok 3: Vznik a následky endotelovej dysfunkcie



Obrázok popisuje zmenu normálnej funkcie endotelu na dysfunkčný. DLP (dyslipidémie), hypertenzia, diabetes a fajčenie sú príčinami vzniku ED.

Prevzaté z: Endoteliální dysfunkce- první stadium aterosklerózy [23]

Diabetes mellitus 2.typu

Diabetes mellitus 2.typu (DM2) je charakteristický výskytom hyperglykémie, dyslipidémie a inzulínovej rezistencie. Tieto faktory pôsobia aterogénne a narušujú funkciu artérií. U diabetikov je znížené množstvo NO z troch dôvodov:

1. zvýšená degradácia
2. znížená biologická dostupnosť
3. prítomnosť asymetrického dimetylarginínu, ktorý priamo inhibuje eNOS

Zúčastňujú sa na tom práve vysoká hladina glukózy, voľné mastné kyseliny a adipokíny (cytokíny z tukového tkaniva).

Ďalšou príčinou ED u DM2 je priame pôsobenie glukózy na proteíny endotelu, následkom čoho proteíny uvoľňujú látky, ktoré potencujú produkciu zápalových cytokínov a expresiu adhézných molekúl pre leukocyty [24].

2.3 Endoglin

Endoglin (Eng) je proteín známy aj ako CD 105 (cluster of differentiation 105) alebo receptor typu III transformujúceho rastového faktoru beta (transforming growth factor β , TGF- β) [25]. Podieľa sa na regulácii proliferácie, diferenciácie a migrácie buniek. V tele sa nachádza v endotelových bunkách, makrofágoch, bunkách hladkého svalstva a ďalších [7, 26]. Eng je súčasťou signálnej dráhy, ktorá ovplyvňuje expresiu eNOS v endotelových bunkách. Podľa *in vitro* štúdií Eng zohráva úlohu v procese zápalovej adhézie trombocytov k cievnej stene a pri infiltrácii leukocytov [27]. Zistilo sa, že zmeny v expresii Eng sú spojené s rôznymi patologickými stavmi ako napríklad: hereditárna hemoragická telangiektázia, nádorové ochorenia, angiogenézia, zápalové stavy, ED a fibróza [8]. Eng zohráva úlohu aj pri AH, preeklampsií, metabolickom syndróme, diabete mellitus a iných kardiovaskulárnych ochoreniach [9].

2.3.1 Štruktúra endoglinu

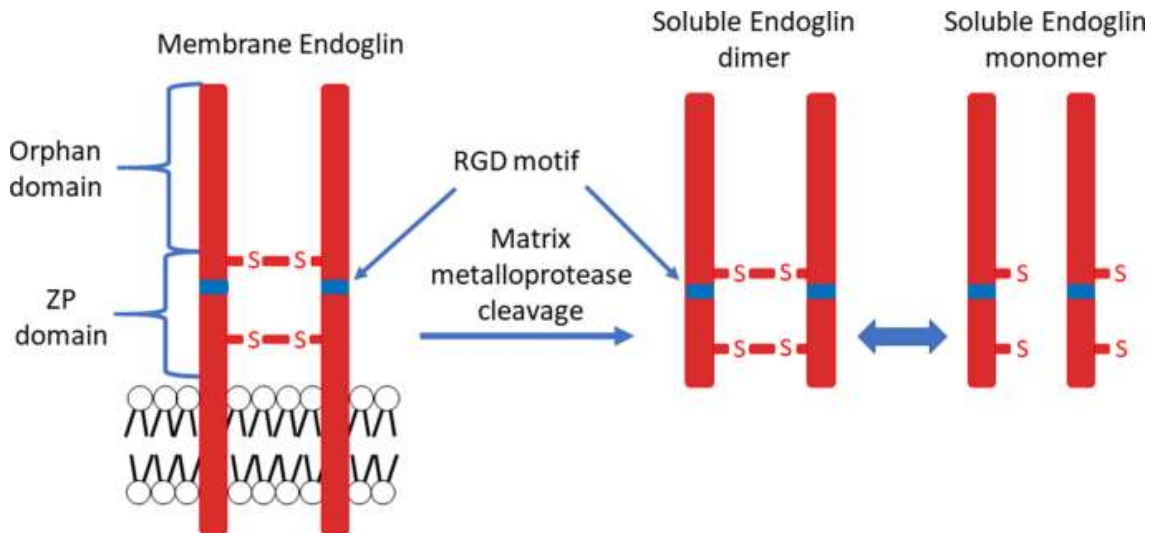
Eng je 180kDa homodimérny, transmembránový receptor, ktorý prestupuje membránu jedenkrát. Obsahuje krátku cytoplazmatickú doménu (47 aminokyselín), membránovú hydrofóbnú doménu a väčšiu extracelulárnu doménu (561 aminokyselín). Disulfidické mostíky zabezpečujú jeho stabilizáciu [7].

Extracelulárna doména pozostáva z tzv. orphan časti (oprhan = sirota, nie je známa podobnosť so žiadnymi inými proteínovými rodinami) a zo zona pellucida (ZP), ktorá sprostredkováva protein-protein interakcie. Súčasťou ZP domény je sekvencia arginín-glycín-asparágová kyselina (RGD), ktorá zabezpečuje rozpoznanie a viazanie integrínov alebo iných RGD receptorov [28] [8].

Okrem „bežnej formy“ endoglinu (L-endoglinu) existuje aj kratšia varianta S-endoglin (short endoglin, S-Eng). Má kratšiu cytoplazmatickú doménu (14 aminokyselín) a chýba mu miesto pre fosforyláciu a interakčné miesta proteínov. To má za následok

funkčné rozdiely medzi S- a L-endoglínom [7]. Štruktúra Eng je zobrazená na obrázku č. 4.

Obrázok 4: Štruktúra endoglínu a solubilný endoglin



Vľavo na obrázku je zobrazený membránový Eng (membrane endoglin) ako dimer spojený disulfidickými mostíkmi, ktorý prestupuje mebránou 1x a ktorého extracelulárna doména sa delí na „orphan“ doménu (orphan domain) a zona pellucida doménu (ZP domain). RGD motif (arginyl-glycyl-aspartic acid), je štruktúra, ktorá umožňuje rozpoznať miesto viazania integrínov. Matrixová metalloproteináza (matrix metalloprotease) zabezpečuje štiepenie membránového Eng za vzniku rozpustného (soluble endoglin) a uvoľňuje ho do cirkulácie. V cirkulácii sa sEng môže vyskytovať ako dimer alebo ako monomer.

Prevzaté z: *Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome* [8]

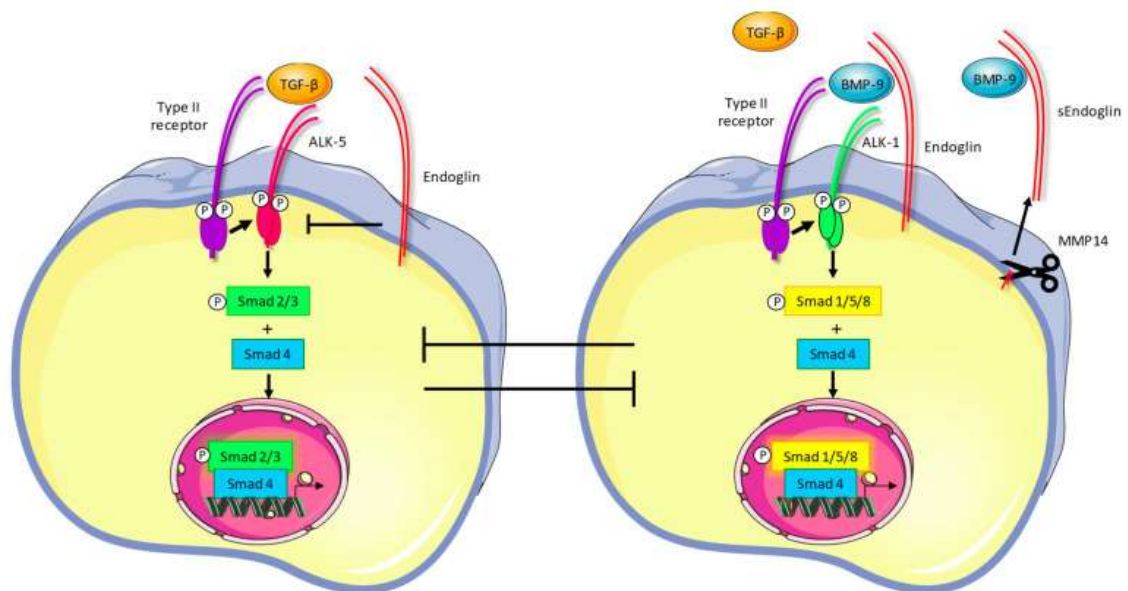
2.3.2 Signalizačná kaskáda

Cytoplazmatická doména je pomocnou zložkou TGF- β receptorového komplexu. Fosforylácia serín/threonínu pomocou Scr kinázy, reguluje interakciu so signálnymi receptormi typu I - ALK 1 a ALK 5 (activin receptor-like kinase 1 a 5) a receptormi typu II, napríklad TGF β RII, prostredníctvom ktorých moduluje bunkové odpovede. Tento receptorový komplex je teda schopný viazať rôzne ligandy z TGF- β nadrodiny ako napríklad TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-9 a BMP-10 (bone morphogenetic protein). Naviazanie týchto ligandov vedie buď k aktivácii SMAD1/5/8 signalizačnej kaskády a následnej

migrácií, proliferácií a angiogenéze endotelových buniek alebo k aktivácii SMAD2/3 signálnej dráhy a navodeniu pokojového fenotypu [7, 26, 28] (viz. obrázok č. 5).

L-Eng vedie k aktivácii dráhy Eng/ALK-1/SMAD 1/5/8 v EC. Aktivácia tejto signalizačnej kaskády vedie k migrácií, proliferácií a angiogenéze buniek. S-Eng pravdepodobne inhibuje migráciu, proliferáciu a angiogézu a indukuje starnutie buniek prostredníctvom Eng/ALK-5/SMAD2/3 signálnej dráhy [7, 9]. L-Eng má proangiogénne účinky a zvyšuje expresiu eNOS v tele, zatiaľ čo S-forma vykazuje účinky opačnej povahy [9].

Obrázok 5: Signálna kaskáda endoglinu



Naviazanie TGF- β alebo BMP ligandov vedie k fosforylácii buď ALK-5 (vľavo na obrázku) alebo ALK-1 (vpravo na obrázku) receptorov. Fosforylácia ALK-5 vyvolá následnú fosforyláciu SMAD 2/3, ktorý potom vytvorí komplex so SMAD 4, a následne spoločne prechádzajú do jadra bunky. Po fosforylácii ALK-1 sa fosforyluje SMAD 1/5/8 a po vytvorení komplexu so SMAD 4, spolu prechádzajú do jadra. Na obrázku vpravo je zobrazený aj enzým MMP14 (matrix metalloproteinase 14, matrixová metaloproteináza 14), ktorá je zodpovedná za štiepenie Eng a tvorbu jeho rozpustnej formy – solubilného endoglinu (sEndoglin), ktorý cirkuluje v plazme [29].

Prevzané z: *Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain* [11]

2.3.3 Expresia endoglínu

Zvýšená hladina Eng bola zistená za určitých patologických stavov, ako je napríklad hemoragická hereditárna telangiektázia, nádorové ochorenia, hypoxia či poranenie cievnej steny. Pre správnu expresiu Eng je potrebná prítomnosť jeho transkripčných faktorov ako je Kruppel-like faktor 6 (KLF6) [9], podjednotka 65 nukleárneho faktoru kappa-B (RELA) a pečňový X receptor (liver X receptor, LXR) [27].

2.3.4 Solubilný endoglín

Solubilný endoglín (sEng) vzniká odštiepením extracelulárnej domény membránovo viazaného Eng za pomoci matrixovej metaloproteinázy 12 alebo 14 (matrix metalloproteinase 12 or 14, MMP12 or 14) a následne voľne cirkuluje v plazme. Zvýšená koncentrácia sEng bola nameraná u pacientov s rôznymi kardiovaskulárnymi a metabolickými ochoreniami ako napríklad AH, familiárna hypercholesterolémia, preeklampsia a diabetes mellitus typu 2 [29], avšak nie je známe, ako sa sEng podieľa na patogenézii týchto ochorení. Niektoré štúdie uvádzajú, že vyvoláva antagonistické účinky membránového endoglínu alebo viaže ligandy TGF- β signalizačnej kaskády. sEng sa môže viazať napríklad na voľne cirkulujúci TGF- β 1 a vznik tejto väzby znemožní naviazanie TGF- β 1 na membránový endoglín, ktorý následne nie je schopný aktivovať SMAD2/3 signálnu kaskádu, ktorej súčasťou je aj eNOS[30].

2.3.5 Funkcia endoglínu a jeho vzťah k endotelovej dysfunkcii

Bolo publikovaných niekoľko štúdií, ktoré sa zaoberajú úlohou Eng v ATS, konkrétne či Eng pôsobí aterogénne alebo antiaterogénne, avšak výsledky týchto štúdií sú v celku kontroverzné [9]. Hypotetický model a rola Eng u ATS je znázornená na obrázku č. 6.

Enzým eNOS je kľúčový pre tvorbu NO. Zníženie expresie eNOS je spojené s rozvojom ED a aterogenézie [9]. Niekoľko štúdií sa zameralo na skúmanie vzťahu medzi Eng, eNOS a správnu funkciou endotelu. Tieto štúdie preukázali, že v prípade zmien hladín Eng môže dôjsť k rozvoju poruchy funkcie endotelu. [31] Zistilo sa, že Eng sa podieľa na aktivácii a stabilizácii eNOS, a že po *in vitro* stimulácií tumor nekrotizujúcim

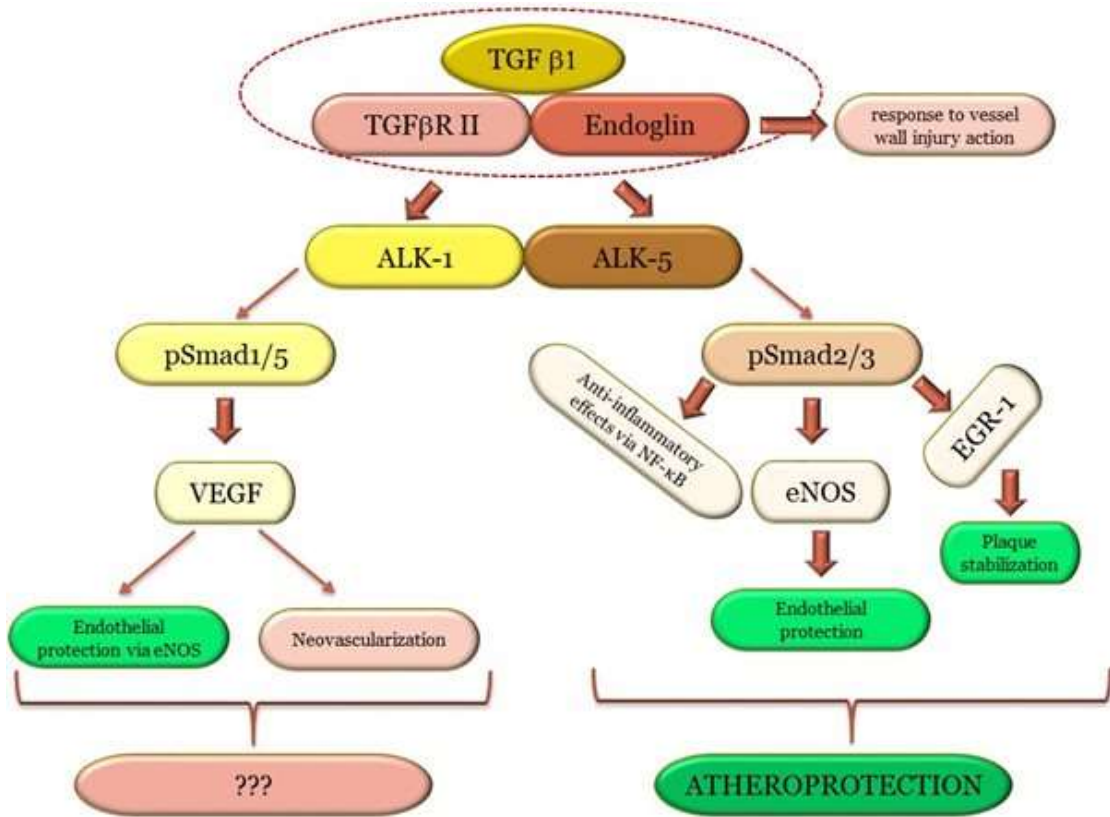
faktorom α (tumor necrosis factor α , TNF- α) sa expresia Eng/eNOS znižuje [32]. Iná *in vivo* štúdia taktiež preukázala, že navodenie hypercholesterolémie (po dobu 2 mesiacov) vedie k zníženej expresii Eng/eNOS/SMAD 2/3 v aorte a k zvýšeniu hladiny sEng v plazme [33].

Na druhej strane, Eng ale zohráva zásadnú úlohu aj pri zápalom indukovanej adhézii a transmigrácii leukocytov cez endotel a pri akútnej fáze zápalu, takže je dôležitou zložkou pri regulácii odpovedi na škodlivé podnety [33].

Dodatočne, solubilná forma Eng hrá dôležitú úlohu v preeklampsii, hypertenzii a iných ochoreniach spojených s ED. Zvýšené hladiny sEng v plazme ďalej môžeme nájsť u pacientov s hyperglykémiou či hypercholesterolémiou [9].

Avšak možná úloha Eng ako potenciálneho spúšťača ED musí byť predmetom ďalšieho skúmania [34].

Obrázok 6 : Hypotetický model roly endoglinu u aterosklerózy



Na obrázku je znázornená funkcia Eng. Eng tvorí komplex s TGF-βRII a TGF-β1 a tento komplex môže aktivovať buď signálnu kaskádu ALK1/pSMAD1/5, ktorá povedie k aktivácií VEGF a teda ochrane endotelu prostredníctvom eNOS, alebo neovaskularizácii. Na druhej strane sa môže aktivovať kaskáda ALK5/pSMAD2/3, čo povedie k zvýšeniu produkcie eNOS a ochrane endotelu, protizápalovému efektu inhibíciou NF-κB (nuclear factor kappa B, nukleárny faktor kappa B) a stabilizácií plátu aktiváciou transkripčného faktora skoréj rastovej odozvy (early growth response-1, EGR-1). Aktivácia tejto kaskády môže predstavovať ochranný mechanizmus pred aterosklerózou.

Prevzaté z: *The role of endoglin in atherosclerosis* [9]

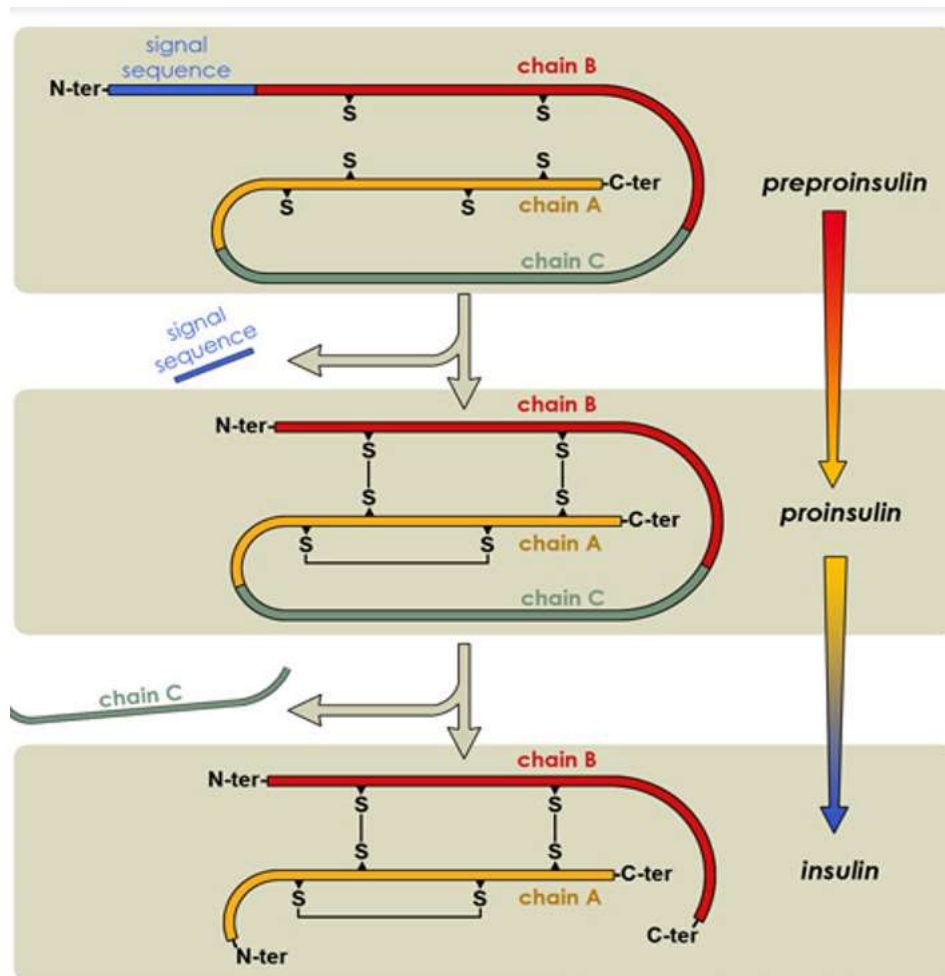
2.4 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je skupina metabolických chorôb charakterizovaná chronickou hyperglykémiou [5]. Za hyperglykémiu sa považuje stav, kde nie je glukóza transportovaná do buniek a zostáva teda v extracelulárnej tekutine. Príčinou môže byť celá rada dôvodov spojených s absolútnym alebo relatívnym nedostatkom inzulínu [35], ako napríklad porucha sekrécie inzulínu, porucha pôsobenia inzulínu alebo kombinácia oboch týchto faktorov [5].

Glukóza v našom tele pochádza buď z rozloženého škrobu, sacharózy alebo ďalších sacharidov prijatých z potravy. V čase lačnenia si ju však telo môže vytvárať samo, buď prostredníctvom glykogenolýzy (rozklad glykogénu) alebo prostredníctvom glukoneogenézy (syntéza glukózy *de novo*), na čom sa podieľajú pečeň a obličky [35].

β -bunky pankreasu sú jediné miesto, kde dochádza k syntéze a sekrécii inzulínu. Hormón sa syntetizuje najskôr vo forme preproinzulínu a z neho je vytváraný proinzulín, (viz. obrázok č. 7). Biosyntéza preproinzulínu prebieha v cytozole bunky. Následne je táto forma inzulínu premiestnená do endoplazmatického retikula bunky, kde sa tvorí proinzulín. Ten sa skladá z B-reťazca, A- reťazca a C-peptidu. Odštiepením C-peptidu z proinzulínu vzniká aktívna forma inzulínu [36].

Obrázok 7: Biosyntéza inzulínu



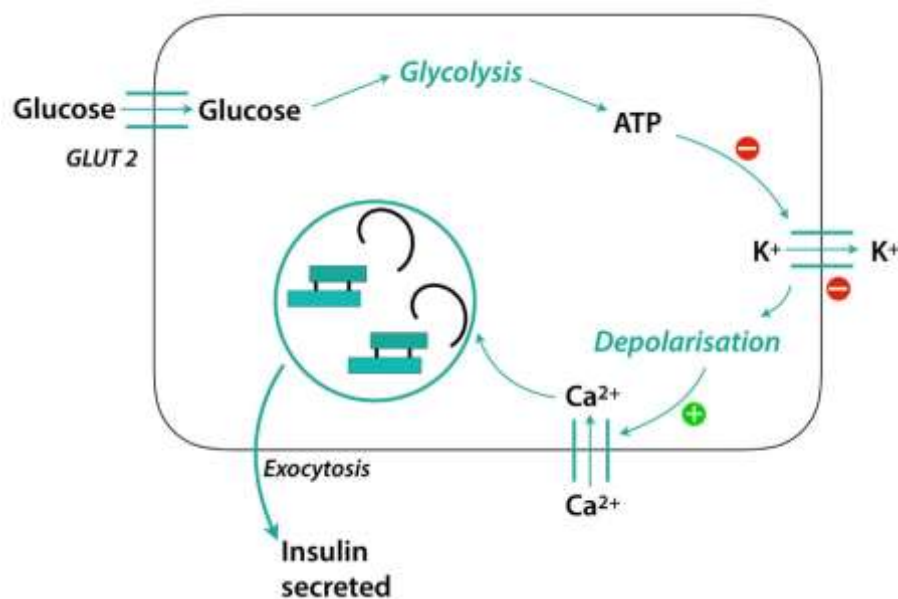
Na obrázku sa nachádza schéma syntézy inzulínu. Najskôr vzniká preproinzulín (preproinsulin), ktorý sa skladá zo signálnej sekvencie (signal sequence), B-reťazca (B-chain), A-reťazca (A-chain) a C-peptidu (C-chain). Odstránením signálnej sekvencie vzniká proinzulín (proinsulin). Následným odštiepením C-peptidu vzniká samotný inzulín (insulin).

Prevzaté z: Paty's endocrinology, [online] dostupné na: <http://patysendocrinology.blogspot.com/2015/> [28.3.2021]

Dôležitou funkciou β -buniek pankreasu je vylučovať inzulín, aby udržoval fyziologickú hladinu glukózy v relatívne úzkom rozmedzí [37]. β -bunky inzulín vylučujú dvojfázovým spôsobom ako odpoveď na stimuláciu glukózou. Glukóza vstupuje do β -buniek prostredníctvom glukózového transportéru GLUT-1 a jej rýchlym zmetabolizovaním dochádza k zvýšeniu koncentrácie ATP (adenosine triphosphate,

adenozín trifosfát) v bunke. Draslíkové kanály citlivé na ATP sa uzatvoria a draslík sa hromadí v bunke, čo spôsobí depolarizáciu membrány a otvorenie napätovo závislých vápnikových kanálov. Nahromadený vápnik spúšťa exocytózu granúl s inzulínom (viz. obrázok č. 8). To vedie k rýchlemu nárastu a sekrécii inzulínu v tzv. „prvej fáze“ [38], ktorá sa tiež označuje ako postprandiálna - po jedle [39], ku ktorej dochádza približne 5-10 minút po stimulácii glukózou. Postupne rýchlosť vylučovania inzulínu klesá a nastáva tzv. „druhá fáza“ [38], v ktorej sa inzulín uvoľňuje trvale počas celého dňa v malých dávkach (nazývaná aj pulzná sekrécia inzulínu). Významom tejto fázy je udržať citlivosť inzulínových receptorov a potlačiť glukoneogéniu v pečeni, a tým zabezpečiť normálne hladiny glykémie počas obdobia lačnenia [39].

Obrázok 8: Sekrécia inzulínu



Pomocou transportérov GLUT vstupuje glukóza (glucose) do β -buniek pankreasu. Glykolýzou (glycolysis) sa glukóza zmetabolizuje za vzniku ATP, ktoré zablokuje ATP-senzitívny draslíkový kanál, čo spôsobí hromadenie draselných iónov, a to vedie k depolarizácii napätovo riadených vápenatých kanálov. Zvýšená koncentrácia vápenatých iónov vyvolá exocytózu (exocytosis) granúl naplnených inzulínom.

Prevzaté z: *Insulin secretion- the untold story [online]* dostupné na: <https://www.firstclassmed.com/articles/insulin-secretion> [28.3.2021]

Prevažná väčšina prípadov DM spadá do dvoch širokých etiopatogenetických kategórií:

2.4.1 Diabetes mellitus 1.typu

Diabetes mellitus 1.typu (DM1), predstavuje jedno z viac ako 80 ochorení, ktoré sa považujú za autoimunitné [37]. Táto forma predstavuje 5-10% pacientov s DM. DM1 sa najčastejšie objavuje v detstve a v dospievaní, ale môže sa vyskytnúť aj neskôr. Je známy tiež ako diabetes závislý na inzulíne či juvenilný diabetes. Nastáva z dôvodu bunkovo-sprostredkovanej autoimunitnej deštrukcie β -buniek pankreasu [5]. Za markery imunitnej deštrukcie β -buniek sa považujú autoprotilátky proti β -bunkám Langerhansových ostrovčekov pankreasu, vrátane autoprotilátok proti inzulínu, autoprotilátok proti dekarboxyláze glutámovej kyseliny a autoprotilátky proti tyrozínfosfatázam IA-2 and IA-2 β . Jedna alebo zvyčajne aj viac z týchto autoprotilátok je prítomná u 85-90% jedincov (keď sa na začiatku zistí hyperglykémia nalačno). Autoimunitná deštrukcia sa spája s genetickými predispozíciami, ale súvisí aj s environmentálnymi faktormi, ktoré však momentálne nie sú jasne definované. Rýchlosť zničenia β -buniek je u pacientov variabilná. U niektorých (hlavne deti) je rýchla, u iných (hlavne dospelých) býva pomalšia. V poslednom štádiu ochorenia nedochádza k žiadnej alebo skoro žiadnej sekrécii inzulínu a títo jedinci sa stanú závislí na terapii inzulínom [5].

Typické príznakmi DM1 sú polyúria, polyfágia, dehydratácia a polydypsia, pretože dochádza k rýchlemu rozvoju závažnej hyperglykémie. Ketoacidóza je spojená s výskytom ketolátok v moči a pri prehĺbenej acidóze dochádza aj k predĺženiu dychu, tzv. Kussmaulovmu dýchaniu. Pri acidóze sa môže vyskytnúť aj tzv. foetor acetonaemicus – acetónový dych [35]. Ďalšími symptómami bývajú nevysvetliteľné a výrazné chudnutie, únava, nepokoj, bolesť tela [40] alebo časté infekcie [5].

Po zničení β -buniek pankreasu, organizmus stráca kontrolu nad hladinou glukózy v krvi, čo môže mať za následok akútne stavy (hyperglykémia, ketoacidóza), ale aj sekundárne komplikácie (rôzne srdcové ochorenia, poruchy videnia až slepota, zlyhanie obličiek a ďalšie) [37].

2.4.2 Diabetes mellitus 2.typu

Touto formou diabetu trpí 90-95% pacientov. V minulosti bol tiež označovaný ako diabetes nezávislý od inzulínu, či diabetes začínajúci u dospelých [5]. Často sa objavuje od 6. decénia a rozvoj do 30. roku života je vzácny. Napriek tomu, s nárastom obezity v detskom veku, už boli popísané prípady diabetu 2.typu (DM2) aj u detí [35]. Táto forma diabetu vzniká na základe pôsobenia dvoch patogenetických faktorov: rezistencie periférnych buniek na inzulín a nedostatočnej sekrécie inzulínu posprandiálne [5]. Inzulínová rezistencia je stav, pri ktorom sa vyžaduje väčšie množstvo inzulínu, na dosiahnutie normálnej odpovede (respektíve normálna koncentrácia inzulínu vedie k menšej biologickej odpovedi). Podľa poslednej definície Medzinárodnej diabetologickej federácie platia pre syndróm inzulínovej rezistencie kritériá zobrazené v tabuľke č. 1. V β -bunkách Langerhansových ostrovčekov boli tiež zistené nálezy amyloidu, ktorý interferuje so sekréciou inzulínu [35].

Tabuľka 1: Kritériá pre syndróm inzulínovej rezistencie

Centrálna obezita	Obvod pásu ≥ 94 cm u európskych mužov
	Obvod pásu ≥ 80 u európskych žien

+ najmenej 2 kritériá z nasledujúcej časti tabuľky

bud'	alebo
Triacylglyceroly $> 1,7$ mmol/l	Špecifická liečba
HDL cholesterol $< 1,03$ mmol/l – muži HDL cholesterol $< 1,29$ mmol/l – ženy	Špecifická liečba
Krvný tlak $\geq 135/85$ mmHg	Antihypertenzná liečba
Glykémia na lačno $\geq 5,6$ mmol/l	Diagnostikovaný DM2.typu

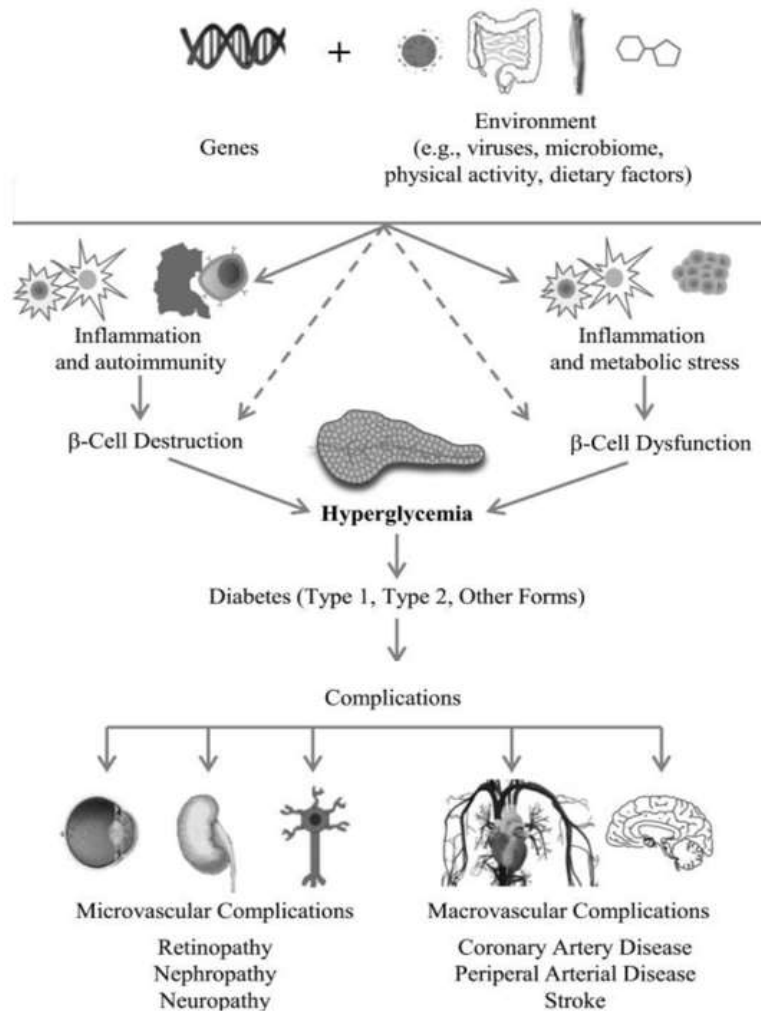
Akútne komplikácie u DM2 sú vzácne, pretože ochorenie má pozvoľný nástup. U týchto pacientov bývajú hlavné príznaky únava, menšia telesná popripade aj duševná výkonnosť, niekedy sa objaví polyúria, polydipsia. Menej často sa objavuje hyperglykémia či glykosúria. Vo veľa prípadoch k diagnostike dochádza až po prejavení

sa chronických komplikácií, najmä diabetickej neuropatie a retinopatie, či kožných a slizničných zápalov. U týchto jedincov často dochádza k rozvoju aterosklerózy a s ňou spojenými orgánovými komplikáciami. Znamená to frekventovanejší výskyt infarktu myokardu, ischemickej choroby dolných končatín a srdca alebo cievnej mozgovej príhody [35]. Prehľad komplikácií DM je uvedený na obrázku č. 9.

Nameraním opakovanej náhodnej glykémie nad 11,1 mmol/l alebo pri opakovanej glykémii nalačno nad 7,0 mmol/l je diagnóza nepochybná. Základom liečby je úprava diéty a edukácia pacienta. Až v prípade nedostatočnej kompenzácie diétou sa zahájí liečba antidiabetikmi [35].

Rizikové faktory pre vznik DM typu 2 sú: vek, obezita, nedostatok fyzickej aktivity. Vyskytuje sa častejšie u žien, ktoré prekonalí DM v tehotenstve, u pacientov s hypertenziou a dyslipidémiou. Často je spojená s genetickou predispozíciou. Genetika tejto formy je zložitá a nie je jasne definovaná [5].

Obrázok 9: Príčiny vzniku DM



Rizikové faktory ako sú gény (*genes*) a životné prostredie (*environment*), vírusy (*viruses*), mikrobiom (*microbiom*), fyzická aktivity (*physical activity*) či diétne faktory (*dietary factors*), môžu viesť k zápalu (*inflammation*) a autoimunitnej reakcii (*autoimmunity*) čo vedie k zničeniu β -buniek *pancreasu* (*β -cell destruction*) alebo tieto rizikové faktory môžu spôsobiť zápal a metabolický stres (*metabolic stress*), čo povedie k nefunkčnosti β -buniek (*β -cell dysfunction*). Výsledkom je hyperglykémia (*hyperglycemia*) a diabetes rôznych typov (*type 1, type 2, other forms*). Pri dlhodobej hyperglykémii sa rozvíjajú komplikácie (*complications*). Rozdeľujeme ich na mikrovaskulárne (*microvascular*) - retinopatia, nefropatia, neuropatia a makrovaskulárne (*macrovascular*) – ischemická choroba srdiečna (*coronary artery disease*), periférne artériové ochorenie (*peripheral arterial disease*) a cievna mozgová príhoda (*stroke*).

Prevzaté z: *Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis* [41]

2.4.3 Hyperglykémia a jej vzťah k endotelovej dysfunkcii

Prevalencia a výskyt DM sa celosvetovo zvyšuje alarmujúcou rýchlosťou. Práve DM 2. typu je najčastejšie vyskytujúcou sa formou a okrem ovplyvnenia schopnosti tela spracovať glukózu je spojený aj s mikro- a makro-vaskulárnymi komplikáciami, a je tiež považovaný za rizikový faktor ischemickej choroby srdce [6].

Glukóza vstupuje do EC pomocou GLUT-1 transportéru, ktorého aktivita je riadená hlavne extracelulárnou koncentráciou glukózy. Vstup glukózy do EC cez tento transportér nie je závislý na inzulíne. EC sú teda náchylnejšie k poškodeniu vyvolanému hyperglykémiou ako ostatné bunky v tele [42].

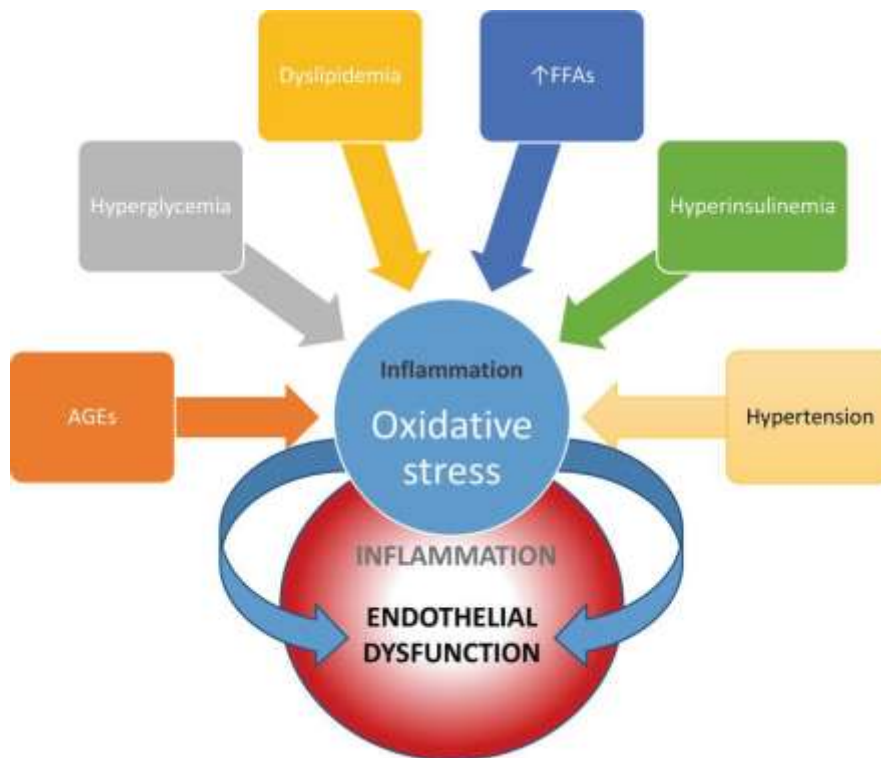
Bunky sú schopné sa do určitej miery prispôbiť zmenám v prostredí. Keď je ale prekročená ich schopnosť adaptácie, dochádza k ich poškodeniu, ktoré sa prejaví zo začiatku ako dysfunkcia a neskôr vo forme morfológických zmien [43].

Za normálnych podmienok spôsobuje inzulín zvýšenú aktiváciu eNOS, a teda zvýšenú produkciu NO. Avšak inzulínová rezistencia u diabetikov tento fyziologický proces potlačuje, čo spôsobuje zníženú sekréciu NO. Okrem toho inzulín aktivuje signálnu dráhu, ktorej výsledkom je expresia vazokonstrikčného ET-1 [43].

Predpokladá sa, že hyperglykémia vytvára nerovnováhu medzi dostupnosťou NO a ROS, ale aj reaktívnych foriem dusíku, čo vedie k ED [6]. Ďalšie poškodenie endotelu môže byť následkom zvýšenej produkcie koncových produktov pokročilej glykácie (AGEs, advanced glycation end products) a zvýšenej expresie AGE receptorov. Väzbou AGEs na vlastný receptor dochádza k zvýšenej tvorbe superoxidu, ktorý podporuje zápal. Hyperglykémia tiež aktivuje NK- κ B, ktorý spôsobuje zápal v cievach. Aktivácia tohto faktoru vedie k zvýšenej produkcii adhézných molekúl a cytokínov, čo aktivuje zápalové bunky v cievnej stene. Hyperglykémia ďalej zvyšuje expresiu koagulačných faktorov, výsledkom ktorej, je náchylnosť k tvorbe trombov [6]. U diabetikov dochádza ďalej k zvýšenej hladine voľných mastných kyselín v cirkulácii. Tento jav sa pripisuje nadmernému uvoľňovaniu z tukového tkaniva a zníženému príjmu kostenými svalmi. Nadmerné množstvo voľných mastných kyselín narušuje normálnu funkciu endotelu rovnakým spôsobom ako hyperglykémia [6].

Poškodenie funkcie EC vedie k zvýšenej adhézii a migrácii leukocytov, nadbytku vazokonstričných látok a k strate antiagregačných vlastnosti endotelu. Zápalové mediátory ako napríklad TNF- α , interleukín-1 (IL-1) a endotoxíny, aktivujú EC, čím dochádza k zvýšenej expresii adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1, E-selektín a P-selektín, sekrécii cytokínov a chemokínov, či produkcii ROS. To ďalej spôsobuje oxidáciu LDL častí v subendotelovej vrstve. Poškodený endotel teda produkuje menej NO (má zníženú vazodilatačnú schopnosť) a naopak sa zvyšuje vazokonstrikcia a agregácia trombocytov. Všetky tieto popísané mechanizmy sa podieľajú na patogenéze ATS [43] a zobrazené sú v nasledujúcom obrázku č. 10.

Obrázok 10: Rizikové faktory pre rozvoj ED



Na obrázku sú znázornené rizikové faktory spojené s DM2, ktoré sú schopné navodiť endotelovú dysfunkciu (endothelial dysfunction) tým, že vedú k rozvoju zápalu (inflammation) a oxidatívneho stresu (oxidative stress). Medzi tieto rizikové faktory radíme: koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs), hyperglykémii (hyperglycemia), dyslipidémiu (dyslipidemia), zvýšené hladiny voľných mastných kyselín (free fatty acids), hyperinzulinémiu (hyperinsulinemia) a hypertenziu (hypertension).

Prevzaté: Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes: Targeting Inflammation [44]

2.5 Adhézne molekuly

Prepojenie medzi bunkami navzájom a medzi bunkami a extracelulárnym matrix je sprostredkované rôznymi membránovými proteínmi, ktoré sú známe ako bunkové adhézne molekuly (cell adhesion molecules, CAMs) [4, 45]. Rozhodujúcu úlohu pri bunkových interakciách majú nie len CAMs, ale aj ďalšie bunkové mediátory ako napríklad cytokíny, fibronektín a kolagén. Fyziologický stav závisí od udržania rovnováhy medzi týmito systémami. Narušenie jedného zo systémov môže vyvolať patologický stav [4].

Adhézne molekuly sú látky glykoproteínovej povahy a nachádzajú sa na povrchu všetkých buniek [46]. CAMs sa podieľajú prakticky na každej interakcii typu bunka-bunka. Zúčastňujú sa kontroly životne dôležitých procesov ako je embryogenéza, migrácia, rast buniek, diferenciácia a bunková smrť [4]. Taktiež hrajú zásadnú rolu pri vzniku zápalu, pri patofyziológii kardiovaskulárnych, neoplastických, infekčných a kožných ochorení [45, 47]. V prípade nekontrolovateľných interakcií medzi bunkami môžu viesť k ED, poškodeniu tkaniva alebo k rozvoju ATS, hypertenzie, ischémii, hypercholesterolémii a diabetickej vaskulopatii [48]. Adhézne molekuly sa tiež uplatňujú pri raste a šírení nádorových ochorení [49].

Podľa štruktúrnych znakov a funkcií ich rozdeľujeme do týchto základných skupín: integríny, selektíny, kadheríny, mucíny a nadrodina imunoglobulínov (Ig) [50].

Integríny sú zložené z α a β reťazca a rozdeľujú sa do nadrodín, ktoré majú rôzne funkcie. Zabezpečujú adhéziu buniek a extracelulárnych proteínov ako kolagén, fibronektín, laminín alebo adhéziu medzi bunkami navzájom. Ďalej sprostredkovávajú adhéziu leukocytov, ich infiltráciu a aktiváciu glykoproteínového IIb/IIIa receptora, čo vedie k agregácii trombocytov [45].

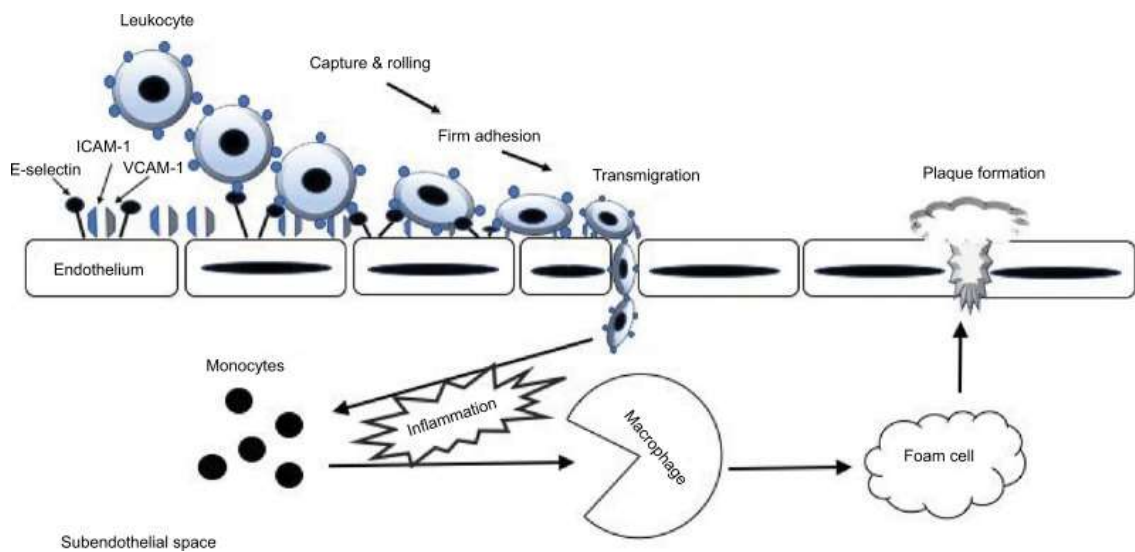
Selektíny, molekuly podobné lektínu, sú exprimované na leukocytoch (L-selektín), endotelových bunkách (E-selektín) a trombocytoch (P-selektín). Cirkulujúce rozpustné formy selektínov sa nachádzajú v plazme vtedy, keď je prítomné zápalové ochorenie. Cytokíny a bakteriálne toxíny podporujú syntézu E- a P-selektínu v endotelových bunkách [48].

Do skupiny kadherínov sa zaraďuje viac ako 80 molekúl ako napríklad: E-, N-, P-, T-, a VE-kadherín. Expresia kadherínov závisí od typu buniek - epitelové bunky exprimujú E-kadherín, vaskulárne endotelové bunky exprimujú VE-kadherín. Tento typ adhézných molekúl vytvára silné medzibunkové väzby. Podieľajú sa na komunikácii medzi bunkami a na angiogenéze [50].

Medzi mucíny (glykoproteíny s veľkou molekulovou hmotnosťou) patrí napríklad epitelový mucín, ktorý sa nachádza na povrchu buniek dýchacieho a gastrointestinálneho traktu. Hlavnú úlohu zohráva pri ochrane pred mikrobiálnymi patogénmi a zabezpečuje čistenie inhalovaných častíc [50].

Nadrodina imunoglobulínov zahŕňa medzibunkovú adhéznú molekulu (intercellular adhesion molecule, ICAM-1), vaskulárnu bunkovú adhéznú molekulu (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1) a bunkovú adhéznú molekulu trombocytov a endotelových buniek (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1). V našej diplomovej práci sa budeme zaoberať hlavne s ICAM-1 a VCAM-1, ktoré budú podrobnejšie popísané v nasledujúcich kapitolách [45].

Obrázok 11: Adhúzia a transmigrácia leukocyty cez endotel



Obrázok znázorňuje prechod leukocyty (leukocyte) z cirkulácie, cez endotel (endothelium), do subendotelového priestoru (subendothelial space). Iničiálna fáza tejto adhézne kaskády je zachytenie a roľovanie (capture and rolling), na ktorom sa podieľa E-selektín. V druhej fáze dochádza k adhézii (firm adhesion) a zmene tvaru zo sférického k sploštenému. Tento proces vyžaduje prítomnosť členov Ig nadrodiny (ICAM-1 a VCAM-1). Následne leukocyt prechádza endotelovou vrstvou (transmigration) cez pevné spoje buniek do subendotelového priestoru. Tu dochádza ku kumulácii monocytov (monocytes) pri zápale (inflammation) a tie sa premieňajú na makrofágy (macrophages) a následne na penové bunky (foam cell). Výsledkom je vznik aterosklerotického plátu (plaque formation).

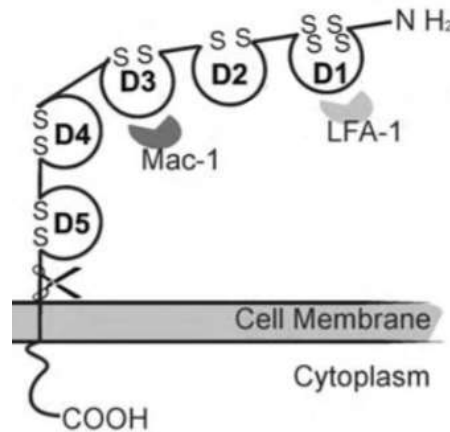
Prevzaté z: *Cell adhesion molecules and exercise* [46]

2.5.1 ICAM-1

ICAM-1 je transmembránový proteín typu I s molekulovou hmotnosťou 80-114 kDa, v závislosti na úrovni glykozylácie. Neglykozylovaná forma má 60 kDa. Extracelulárna časť pozostáva zo 453 aminokyselín (hlavne hydrofóbných), ktoré tvoria päť domén, ktoré sú podobné imunoglobulínu (viz. obrázok č. 12). Táto extracelulárna časť je pripojená k transmembránovej oblasti a ku krátkemu cytoplazmatickému koncu molekuly. Každá Ig doména má tvar listu a je stabilizovaná pomocou disulfidových mostíkov. Cytoplazmatická časť molekuly ICAM-1 nemá klasické signálne motívy, ale má jeden tyrozínový zvyšok, ktorý môže byť dôležitý pre signálnu kaskádu. Bolo

identifikovaných niekoľko ligandov pre ICAM-1, napríklad antigén spojený s funkciou lymfocytov (lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1) a makrofágový antigén 1 (macrophage-1 antigen, Mac-1) [51].

Obrázok 12: Štruktúra ICAM-1



Extracelulárna časť ICAM-1 sa rozdeľuje do 5 domén (D1-D5), ktoré sú stabilizované S-S väzbami. Malá časť molekuly prechádza membránou bunky (cell membrane) a v cytoplazme (cytoplasm) sa nachádza chvost tejto molekuly. LFA-1 a Mac-1 sú ligandmi. Nožnice reprezentujú, že enzymatickým odštiepením extracelulárnej časti vzniká rozpustná forma - sICAM-1.

Prevzaté z: ICAM-1 signaling in endothelial cells [51]

ICAM-1 hrá dôležitú úlohu ako vo vrodenej imunitnej odpovedi, tak v získanej. Sprostredkováva interakcie medzi antigén-prezentujúcimi bunkami a aktivovanými T-bunkami a podieľa sa na transendotelovej migrácii leukocytov do miesta zápalu, kde je dôležitý pre prvotný krok transmigrácie. Ďalej sa predpokladá, že hrá kostimulačnú úlohu pri aktivácii NK buniek. Zápalové cytokíny prítomné u ATS (TNF-alfa, IL-1) a LDL častice, môžu prispievať k zvýšeniu expresie ICAM-1, čo potvrdzuje skutočnosť, že jeho prítomnosť bola detekovaná v aterosklerotickom pláte. Zvýšená expresia ICAM-1 tiež podporuje tvorbu depozít monocytov, ktoré potom prestupujú do subendotelovej vrstvy. Tento proces je zásadný pri vývoji aterosklerotických lézií [52].

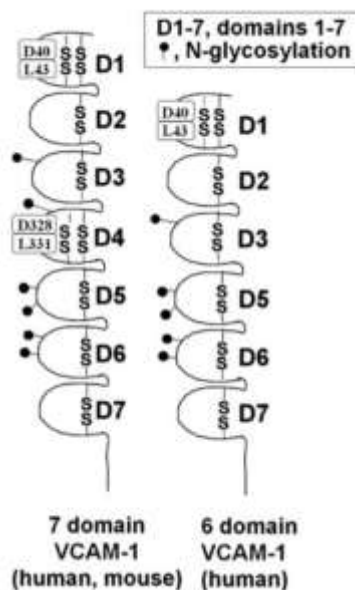
ICAM-1 exprimujú EC, epitelové bunky, makrofágy, monocyty, fibroblasty, dendritické bunky u ľudí v lymfatických uzlinách, črevách, koži, obličkách, pečeni a kostnej dreni.

V plazme sa zistila aj solubilná forma ICAM-1 (sICAM-1). Zdrojom sú najmä už spomínané EC, keratinocyty, hepatocyty a bunky melanómu. Cirkulujúca forma pozostáva z väčšiny extracelulárnej časti. Presný pôvod tejto rozpustnej formy je potrebné objasniť, ale predpokladá sa, že je výsledkom proteolytického štiepenia. Veľa štúdií uvádza asociáciu medzi sICAM-1 a zápalovými alebo malígnymi poruchami. Tie pravdepodobne odrážajú zvýšenú expresiu membránového ICAM-1, ktorý je zvýšený pri kardiovaskulárnych, zápalových a nádorových ochoreniach [52].

2.5.2 VCAM-1

VCAM-1 je rovnako ako ICAM-1, transmembránový proteín z rady imunoglobulínov. Skladá sa z extracelulárnej časti z niekoľkých imunoglobulínových domén, ktoré sú stabilizované disulfidickými väzbami. Ďalšou časťou je transmembránová doména a cytoplazmatická doména tvorená 19 AMK s karboxylovým koncom. Extracelulárna časť pozostáva zo 7 Ig domén, medzi ktorými je pozorovaná homológia u 1. a 4. domény, u 2. a 5. domény a u 3. a 6. domény. Sú známe 2 formy VCAM-1 u človeka. Jedna obsahuje 7 domén a druhá varianta má iba 6 domén s tým, že chýba 4. doména (viz. obrázok č. 13) [53]. Transmembránová časť ukotvuje molekulu k membráne bunky a cytoplazmatická časť molekuly sa môže podieľať na signalizácii [50].

Obrázok 13: Štruktúra a formy VCAM-1



Na obrázku sú dve formy molekuly VCAM-1. Obe sú tvorené extracelulárnou časťou, ktorá pozostáva z domén stabilizovaných disulfidickými mostíkmi. Vľavo sa nachádza sedemdoménová (7 domain) forma VCAM-1, ktorá sa vyskytuje u myší (mouse) aj u ľudí (human). Vpravo je šesť-doménová (6 domain) forma, ktorej chýba doména číslo 4.

Prevzaté z: *Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants* [53]

VCAM-1 sa nachádza na povrchu EC [50]. Expresiu VCAM-1 indukujú cytokíny produkované bunkami (TNF- α , IL-1, adipokinín), vysoké hladiny ROS, oxidované LDL častice a vysoká hladina glukózy. Mechanizmus pravdepodobne spočíva v aktivácii transkripčného faktoru NF- κ B [53]. Pri vysokom stupni zápalu alebo u chronických ochorení je VCAM-1 exprimovaný aj na povrchu iných buniek ako sú napríklad makrofágy, dendritické bunky, fibroblasty, bunky kostnej drene a rakovinové bunky [54].

VCAM-1 môže byť tiež uvoľnený do cirkulácie pomocou enzymatického štiepenia za vzniku rozpustnej formy (sVCAM-1) [53]. Je prítomný v plazme a môže byť považovaný za biomarker ED a zápalu [55].

VCAM-1 zohráva regulačnú úlohu pri zápalových stavoch a pri rôznych ochoreniach [53]. Leukocyty sa pomocou leukocytového ligandu α 4 β 1 integrínu viažu na

molekulu VCAM-1 a dochádza k ich adhézii k endotelovej vrstve a následnej transmigrácii do miesta zápalu (viz. obrázok č. 11) [50]. VCAM-1 taktiež zohráva dôležitú úlohu aj pri ochoreniach kardiovaskulárneho systému. Je prvou adhéznou molekulou, ktorá je exprimovaná ešte pred samotným rozvojom aterosklerotického plátu. V pokročilých štádiách sa dokonca nachádza aj na povrchu buniek hladkého svalstva [54].

Štúdie na endotelových bunkách premedikovaných vysokou hladinou glukózy viedli k zvýšenej expresii adhézných molekúl ICAM-1 a VCAM-1, čo môže poukazovať na určitú spojitosť medzi hyperglykémiou a aterosklerózou u DM [56].

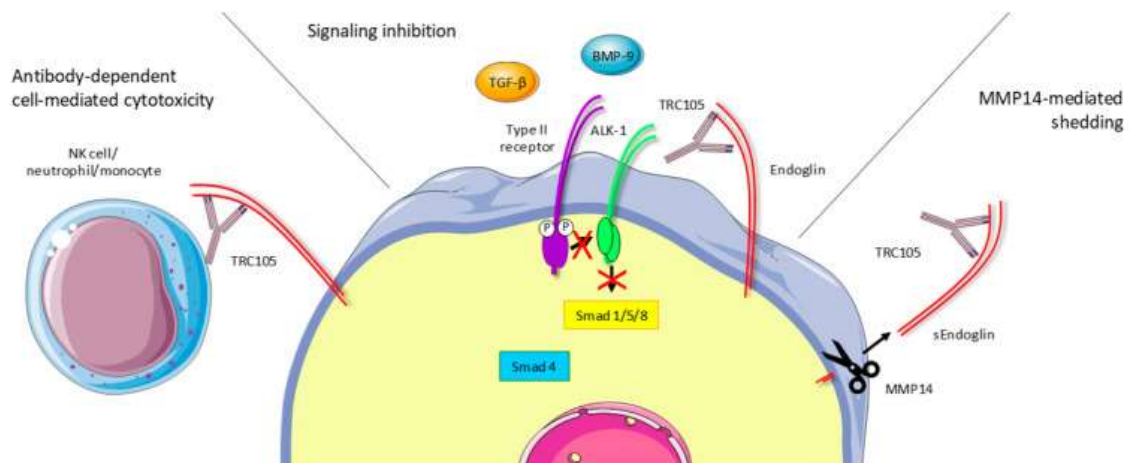
2.6 Carotuximab

2.6.1 Mechanizmus účinku

Carotuximab (TRC 105, Tracoon Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA) je chimérická monoklonálna IgG1 protilátka, ktorá sa viaže na humánny a myš'í Eng s vysokou afinitou.

TRC 105 môže priamou väzbou na Eng blokovať väzobné miesto pre BMP9, čo vedie k potlačeniu SMAD1/5/8 signalizačnej kaskády, a následnej inhibícií angiogenézy [10, 11]. Ďalšie možné mechanizmy účinku TRC 105 predstavuje obrázok č. 14.

Obrázok 14: Carotuximab - mechanizmus účinku



Na obrázku sú navrhované mechanizmy účinku TRC105. Ako prvé, väzbou na Eng TRC 105 indukuje na protilátkach závislú bunkami sprostredkovanú cytotoxicitu (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) pomocou NK buniek (NK cells), neutrofilov (neutrophil) a monocytov (monocyte), čo vedie k usmrteniu cieľových buniek. Po druhé, inhibícia signalizácie (signaling inhibition) prostredníctvom blokácie väzby BMP-9 na Eng, čím sa inhibuje spustenie následnej signalizačnej kaskády SMAD1/5/8. Tretím možným mechanizmom je MMP14-sprostredkované štiepenie (MMP14-mediated shedding). Po naviazaní TRC105 dochádza k štiepeniu membránového Eng na sEng, ktorý môže fungovať ako „lapač“ ligandov, a tak inhibovať signalizáciu prostredníctvom Eng.

Prevzaté z: *Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain* [11]

2.6.2 Klinické použitie

Carotuximab bol vyvíjaný za účelom použitia u nádorových indikácií [12]. Za jednu z možných indikácií bol zvažovaný angiosarkóm (AS). Jedná sa o obzvlášť agresívnu formu sarkómu mäkkých tkanív s incidenciou asi 2000 prípadov ročne v USA a EÚ. Súčasná forma terapie AS pomocou pazopanibu, inhibítora receptora vaskulárneho endotelového rastového faktoru (VEGFR), ktorý je schválený v tejto indikácii, je nedostačujúca. Preto bola vykonaná klinická štúdia (fáza I a II), v ktorej sa pazopanib kombinoval s TRC105. Táto kombinácia viedla k predĺženia mediánu prežívania bez progresie (progression-free survival) v porovnaní so samotným pazopanibom. Navyše, u pacientov s kožnými léziami sa zdal byť benefit vyšší ako u pacientov bez lézií [57].

Avšak farmaceutická spoločnosť Traccon sa rozhodla klinické skúšanie fáze 3 carotuximabu a pazopanibu zastaviť, z dôvodu nedostatočnej účinnosti carotuximabu. Toto ukončenie navrhol nezávislý výbor pre monitorovanie údajov klinických skúšok [58].

V súčasnosti je carotuximab zaradený do predklinických štúdií v novej oftalmologickej formulácii. Očakáva sa, že by mohol zvýšiť účinok inhibítorov VEGF, ktoré sú schválené na liečbu vlhkej vekom podmienenej makulárnej degenerácie. Randomizovaná štúdia hodnotí účinnosť a bezpečnosť intravitreálnej injekcie carotuximabu a ranibizumabu proti monoterapii ranibizumabom [58].

2.7 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria (flow cytometry, FC) umožňuje rýchlu analýzu viacerých parametrov jednotlivých buniek [59] a lokalizáciu veľkej škály antigénov na ich povrchu alebo vo vnútri [60, 61]. Pomocou FC je ďalej možné oddeliť zmes buniek a roztriediť ju na jednotlivé populácie (napr. bunky krvi) [59]. Veľkou výhodou FC je, že umožňuje meranie veľkého množstva buniek v krátkych časových intervaloch (sto až tisíc buniek za sekundu) [62].

FC sa uplatňuje v rôznych oblastiach vedy - imunológia, virológia, bakteriológia, molekulárna biológia, výskum rakoviny a monitorovanie infekčných ochorení [59].

Najvhodnejšie na meranie sú krvné bunky, pretože sa prirodzene vyskytujú v suspenzii a nevyžadujú ďalšiu manipuláciu pred meraním. Bunečné línie a bunky v kultúrach je tiež možné analyzovať, avšak pri adherentných bunkách je potreba ich najprv oddeliť od povrchu, na ktorom boli kultivované. V súčasnej dobe sa FC používa aj pri analýze baktérií, vírusov, fragmentov DNA alebo chromozómov. Jedinou podmienkou je, aby bunky alebo častice boli pred meraním vo forme suspenzie a ich veľkosť bola v rozmedzí 1-30 μm . Väčšie bunky by sa mohli zaseknúť, menšie by nemuseli byť zachytené [63].

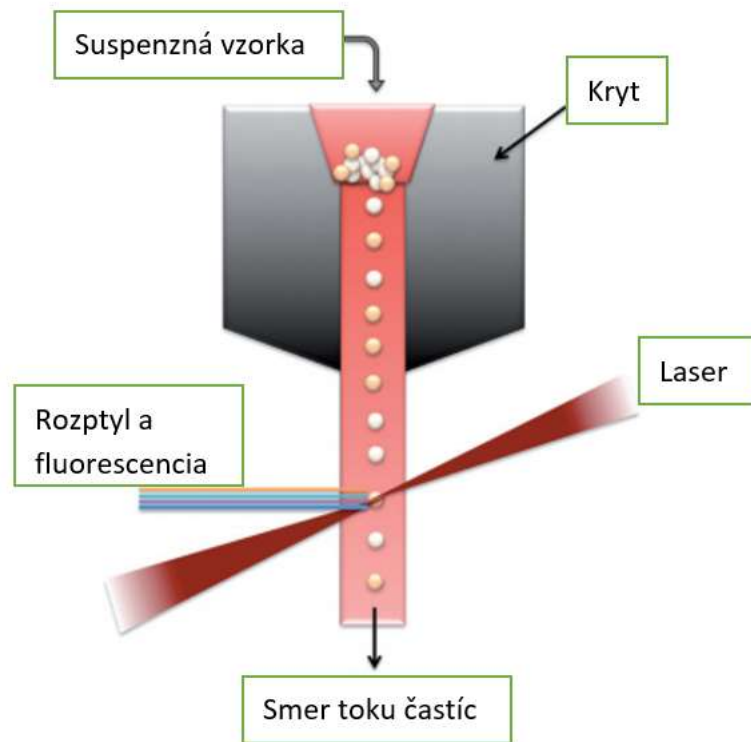
Cytometer analyzuje bunky, ktoré prechádzajú jednotlivo zdrojom svetla [63]. Fluorescenčné a rozptýlené signály sú zachytávané detektorom. Tie sa menia na elektronické signály a sú spracovávané počítačom. Populácia buniek môže byť analyzovaná na základe rozptylu svetla alebo fluorescencie [59].

Prietokový cytometer má 3 základné časti, ktoré sú vzájomne prepojené:

1. *Fluidika* - transportuje bunky zo vzorky a zabezpečuje ich prechod prietokovou komorou, kde bunky prechádzajú konštantnou rýchlosťou laserovými lúčmi (viz. obrázok č. 15).
2. *Optika* - zahŕňa lasery (zdroje svetla) a zberné optické dráhy - systém šošoviek, zrkadiel a optických filtrov. Počas prechodu buniek laserovým lúčom, optika zachytáva fluorescenciu/rozptyl žiarenia a privádza ich na opticky aktívnu vrstvu detektorov (fotonásobičov a fotodiód).

3. *Elektronika* - premieňa optické signály na elektronické, zosilňuje ich a spracuje ich do grafickej formy reprezentujúcej jednotlivé bunky [60].

Obrázok 15: Prúdenie vzorku cytometrom



Obrázok popisuje ako jednotlivé častice prechádzajú laserom postupne za sebou a dochádza k meraniu rozptylu svetla a fluorescencie.

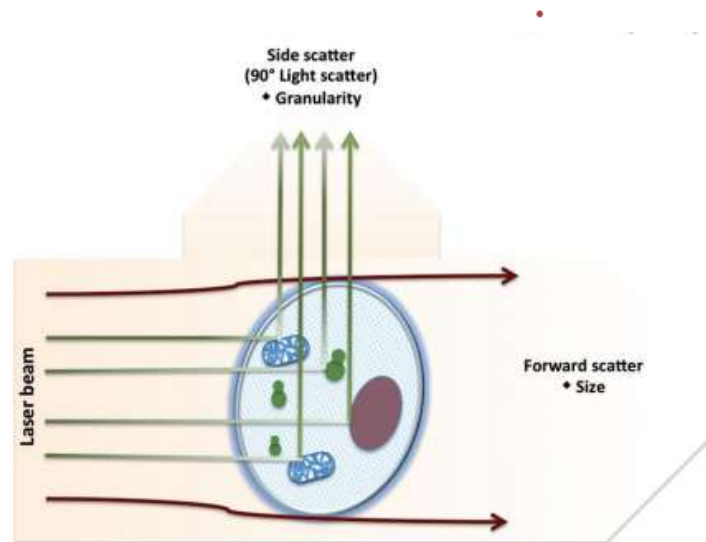
Prevzaté z: Flow cytometry: basic principles and applications [64]

Na označenie antigénov na bunkách sa používajú fluorescenčné farbivá. Tie sú schopné absorbovať svetlo o špecifickej vlnovej dĺžke a vyžiariť svetlo inej vlnovej dĺžky [63]. Príkladom sú: fluoresceín, cyaníny, farby typu Alexa, fykobiliproteíny, nanokryštály a ďalšie [60].

Výsledkom merania je veľký počet parametrov, ktoré popisujú jednotlivé bunky. Pri analýze výsledkov sa zameriavame na dva rozptylové parametre – rozptyl v priamom smere (forward scatter, FSC), ktorý je priamo úmerný veľkosti buniek, a bočný rozptyl (side scatter, SSC), ktorý vypovedá o granularite bunky (viz. obrázok č. 16). Pri

spracovávaní výsledkov je potreba odstrániť tzv. konfliktné prípady: napríklad dublety (zdvojené bunky) či mŕtve bunky [60].

Obrázok 16: Rozptylové parametre u FC

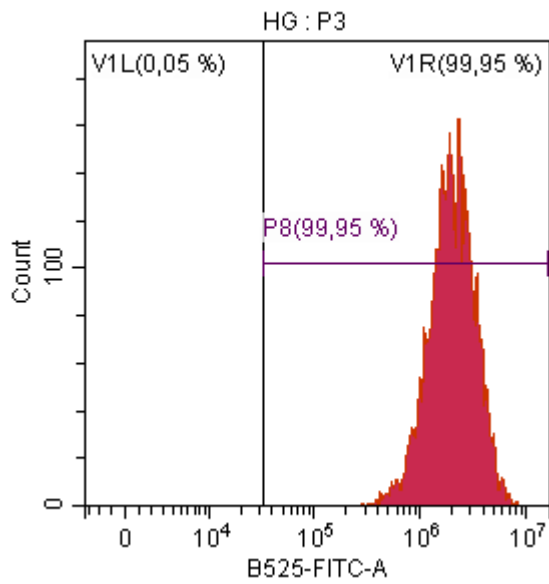


Na obrázku je vidieť ako laserový lúč (laser beam) dopadá na bunku. Bočný rozptyl (side scatter) vypovedá o granularite (granularity) a povrchu/štruktúre buniek. Druhý parameter, ktorý môžeme vidieť na obrázku je priamy rozptyl (forward scatter), ktorý popisuje veľkosť (size) buniek.

Prevzaté z: *Flow cytometry: basic principles and applications* [64]

Na analýzu dát sa využíva histogram (obrázok č. 17) a bodový graf (dot plot-obrázok č. 18). Osa x na histograme odráža fluorescenciu (alebo intenzitu rozptylu), osa y hovorí o počte častíc s danou intenzitou svetla [64]. Ak teda sledujeme určitý znak na bunkách, intenzita fluorescencie je priamo úmerná množstvu naviazanej protilátky. Sleduje sa aj kvalitatívna informácia, a to či dochádza k fluorescencii alebo nie. To vypovedá o (ne)prítomnosti sledovaného znaku [60].

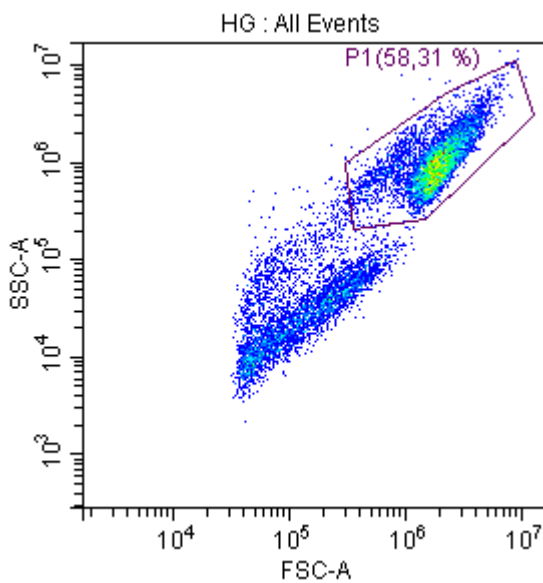
Obrázok 17: Histogram



Na obrázku je vidieť príklad histogramu. Jedná sa o výstup z prietokovej cytometrie. Na ose x je vynesená fluorescencia, osa y značí počet častíc, ktoré odpovedajú intenzite svetla. Signály s rovnakou intenzitou sa akumulujú v rovnakom bode. Signály, ktoré majú rovnakú intenzitu sa hromadia v rovnakom bode. V ideálnom prípade sa vytvorí jeden pík [64].

(Vlastné výsledky)

Obrázok 18: Bodový graf- dot plot



Obrázok znázorňuje bodový graf, ktorý umožňuje odlišiť populáciu buniek podľa ich veľkosti a granularity. Predný rozptyl (FSC-A) hovorí o ploche bunkového povrchu či veľkosti. Bočný rozptyl (SSC-A) udáva granularitu bunkových štruktúr [64].

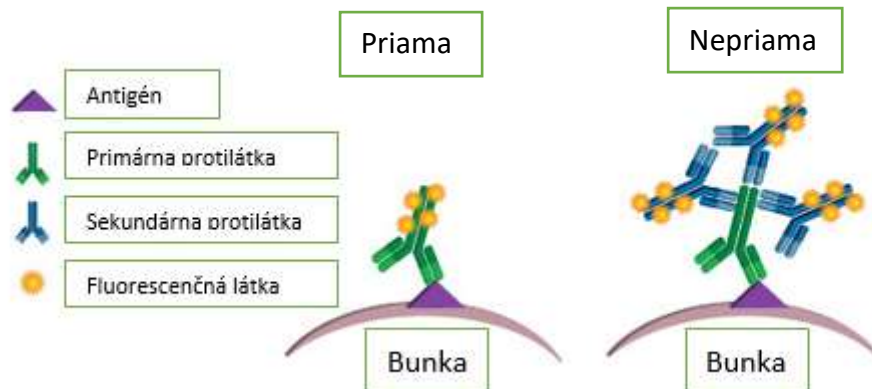
(Vlastné výsledky)

2.7.1 Typy prietokovej cytometrie

V závislosti na použitých protilátkach sa prietoková cytometria rozdeľuje na dve metódy:

1. Priama metóda – primárna protilátka, na ktorej je naviazaný fluorofór, sa priamo viaže na cieľový antigén na bunke
2. Nepriama metóda - primárna protilátka sa viaže na antigén a sekundárna protilátka s konjugovaným fluorofórom sa viaže sa na primárnu protilátku [65]. Typy prietokovej cytometrie (priama a nepriama) sú znázornené na obrázku č. 19.

Obrázok 19: Typy prietokovej cytometrie

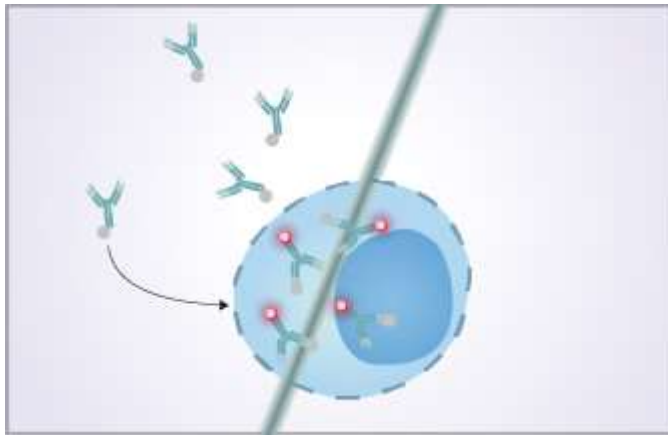


Na obrázku s priamou metódou je vidieť vazbu primárnej protilátky s farbivom na antigén. U nepriamej metódy sa najskôr naviaže primárna protilátka na antigén bunky a na ňu sa naviaže sekundárna protilátka s farbivom.

Prevzaté z: *Overreview of flow cytometry [online] dostupné na: Overview of Flow Cytometry | Cell Signaling Technology [18.3.2021]*

Najväčšie uplatnenie imunofluorescencie v prietokovej cytometrii je pri identifikácii konkrétneho znaku na povrchu bunky (viz. obrázok č. 21). Avšak rovnaký postup sa môže použiť aj na detekciu intracelulárnych zložiek bunky (viz. obrázok č. 20). Protilátky môžu byť teda proti antigénom na povrchu buniek alebo antigénom priamo v bunkách. Na detekciu sa potom používa buď priama alebo nepriama metóda, ktorá bola popisovaná vyššie [65]. Intracelulárne farbenie znakov bunky vyžaduje navyše fixáciu a permeabilizáciu buniek, aby mohlo dochádzať k vzniku interakcií medzi protilátkou a cieľovou molekulou vo vnútri bunky [66].

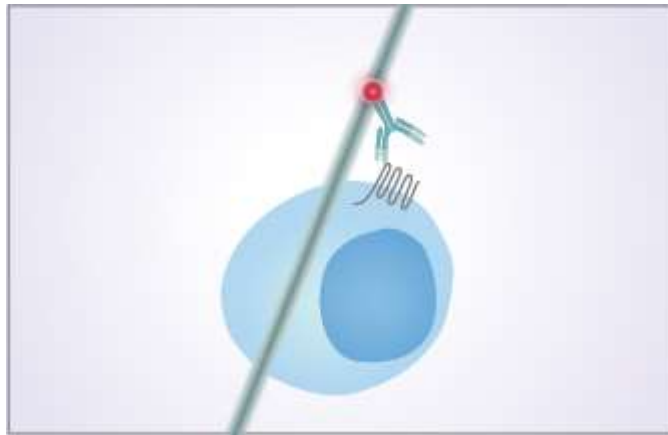
Obrázok 20: Intracelulárna prietoková cytometria



Na obrázku vidíme protilátku, na ktorej je naviazané farbivo. Pred samotnou detekciou je potrebné bunky zafixovať a permeabilizovať, čo umožní prechod protilátky cez plazmatickú membránu do vnútra bunky. Po prechode protilátky do bunky sa protilátka naviaže sa na cieľovú štruktúru a pomocou FC sa detekuje fluorescencia protilátok.

Prevzaté z: *Intracellular Flow Cytometry Overview* [online] dostupné na: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-staining-intracellular-molecules-using-alcohol> [14.4.2021]

Obrázok 21: Extracelulárna prietoková cytometria



Na obrázku je vidieť bunka, ktorá má na svojom povrchu antigén. Keďže povrchové znaky sú ľahko dostupné pre protilátky, nevyžaduje sa krok fixácie ani permeabilizácie. Protilátka sa naviaže na cieľovú štruktúru a pomocou FC sa detekuje fluorescencia.

Prevzaté z: *Intracellular Flow Cytometry Overview* [online] dostupné na: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-staining-intracellular-molecules-using-alcohol> [14.4.2021]

2.8 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction, PCR) je jednoduchá a dômyselná technika, ktorá umožňuje namnožiť určitý úsek molekuly DNA alebo RNA (ribonukleová kyselina) [67]. Genetický materiál môže byť z rôznych zdrojov ako napríklad: krv, vlasy, tkanivo, mikroby, zvieratá, rastliny, ale aj taký, ktorý je niekoľko miliónov rokov starý [68]. PCR sa uplatňuje napríklad pri odhaľovaní polymorfizmov alebo bodových mutácií genetického materiálu, patogénov infekčných chorôb alebo vo forenznej analýze vzoriek [67].

Pre každú PCR je potrebná prítomnosť vzorovej DNA alebo RNA, ktorú chceme namnožiť [68]. Ďalej sú potrebné 2 typy primerov. Jeden z primerov by mal byť komplementárny k plusovému vláknu DNA, v smere 5' → 3' (tiež nazývaný ako sense) a ďalší primer má dopĺňovať mínus vlákno, v smere 3' → 5' (antisense) [69]. Primery sú krátke jednovláknové reťazce obsahujúce 4 základné komponenty, ktoré sa nazývajú nukleotidy. Zloženie a poradie týchto nukleotidov v primeroch je dôležité, pretože iba v prípade správneho poradia sa primer bude viazať k cieľovému vláknu DNA alebo RNA [68]. Na vytvorenie kópie vzorovej DNA alebo RNA sú tiež potrebné samotné nukleotidy, konkrétne adenín, thymín, cytozín a guanín (A, T, C, G), ktoré sa nachádzajú v DNA. Pri PCR sa tiež nezaobídeme bez DNA polymerázy, čo je kľúčový enzým, ktorý viaže jednotlivé nukleotidy a najčastejšie sa získava z termostabilnej baktérie *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymeráza) [67]. V prípade ak je templátom RNA, musí byť najskôr prepísaná do cDNA (komplementárna DNA) pomocou enzýmu nazývaného reverzná transkriptáza (RT) [70].

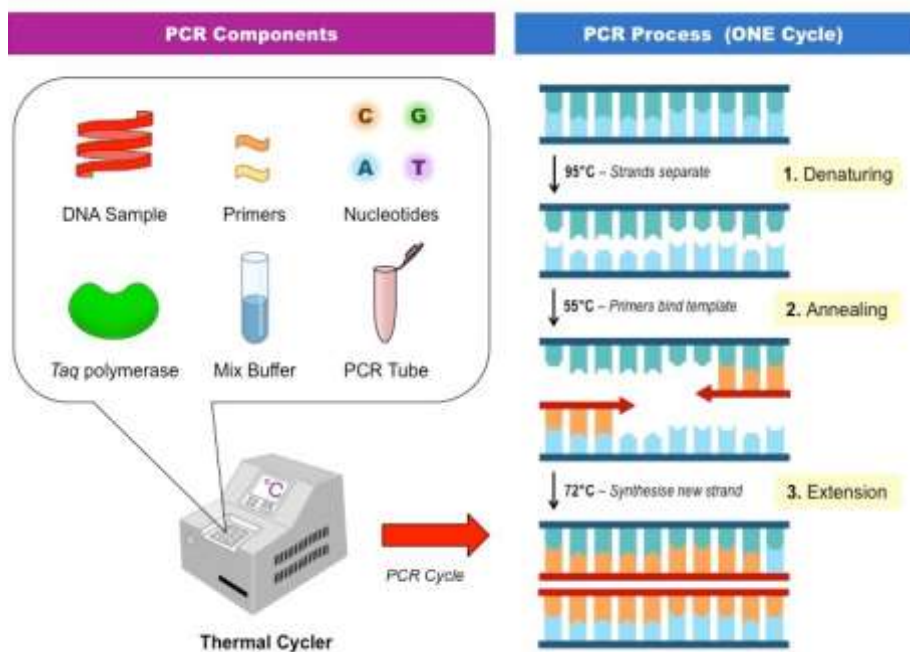
Jednotlivé komponenty sa zmiešajú a následne sa spolu so vzorkami napipetujú do 96-jamkovej doštičky, v ktorej sú umiestnené do termocykléra. Ten opakuje cykly, aby došlo k prepisu DNA [71]. Celý proces PCR znázorňuje obrázok č. 22.

Každý cyklus má 3 základné kroky:

1. *Denaturácia* – V prvej fáze dochádza pri teplote 90-96°C k rozvoľňovaniu vodíkových väzieb dvojláknovej DNA [68].

2. Hybridizácia - Počas druhej fázy sa teplota zníži na 30- 65°C, čo umožní komplementárne naviazanie primeru na jedno vlákno DNA.
3. *Elongácia* - V poslednej fáze sa teplota zvýši na hodnotu 72°C. Tá je dôležitá pre správnu funkciu enzýmu Taq polymeráza, ktorá za využitia dostupných nukleotidov nasyntetizuje nové vlákno DNA komplementárne k pôvodnému vláknu [67] [68] [71].

Obrázok 22: Prevedenie PCR



Na ľavej strane obrázka sa nachádzajú komponenty (PCR components), ktoré sú potrebné pre PCR, konkrétne vzorka DNA (DNA sample), primery (primers), nukleotidy (nucleotides), Taq polymeráza (Taq polymerase), pufer (mix buffer) a skúmavky na PCR (PCR tubes), kde sa komponenty zmiešajú a napipetujú do 96-jamkovej dosky, ktorá sa vloží do termocykléra (thermal cycler). Prístroj pracuje v cykloch (PCR cycle) a jeden cyklus má 3 fázy. Prvá fáza – denaturácia (denaturing) - zvýši sa teplota, čím dôjde k rozvoľneniu dvojvláknovej DNA (strands separate). Druhá fáza – hybridizácia (annealing) - teplota klesne na 55°C, to umožní nasadenie primeru na vlákno (primers bind template). Tretia fáza – elongácia (extension) – dochádza k predlžovaniu nového vlákna (synthesise new strand) pri teplote 72°C a Taq polymeráza ukladá nukleotidy podľa komplementarity a spoločne ich viaže. Tým sa tvorí nové komplementárne vlákno.

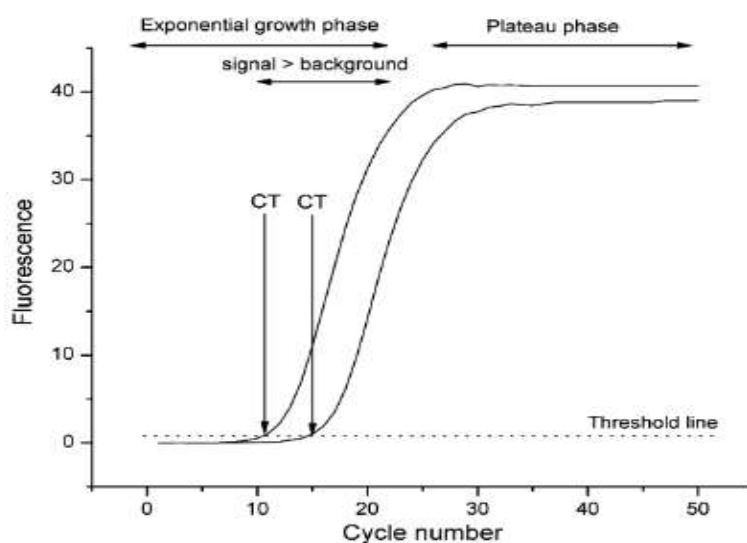
Prevzaté z: PCR [online] dostupné na: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html> [15.3.2021]

2.8.1 Real time kvantitatívna PCR

Pôvodná amplifikácia DNA pomocou PCR a detekcia gélovou elektroforézou mala svoje nevýhody a nebola presná, a tak v roku 1992 popísali Higuchi et al. [72] koncept PCR v reálnom čase (qRT-PCR, quantitative real time PCR). Jedná sa o začlenenie fluorescenčného reportérovho systému a následným vyvinutím termocyklérov, ktoré boli schopné detekovať túto fluorescenciu v reálnom čase sa metóda zdokonalila, stala sa citlivejšou a jednoduchšou na kvantifikáciu [73].

Počas prvých cyklov je signál fluorescencie malý, ale s narastajúcim počtom cyklov sa kumuluje aj množstvo produktu a signál rastie exponenciálne. Počet cyklov k dosiahnutia prahovej hodnoty detekcie sa nazýva CT hodnota (cycle treshold) [70] (viz. obrázok č. 23).

Obrázok 23: Real-time PCR, CT hodnota

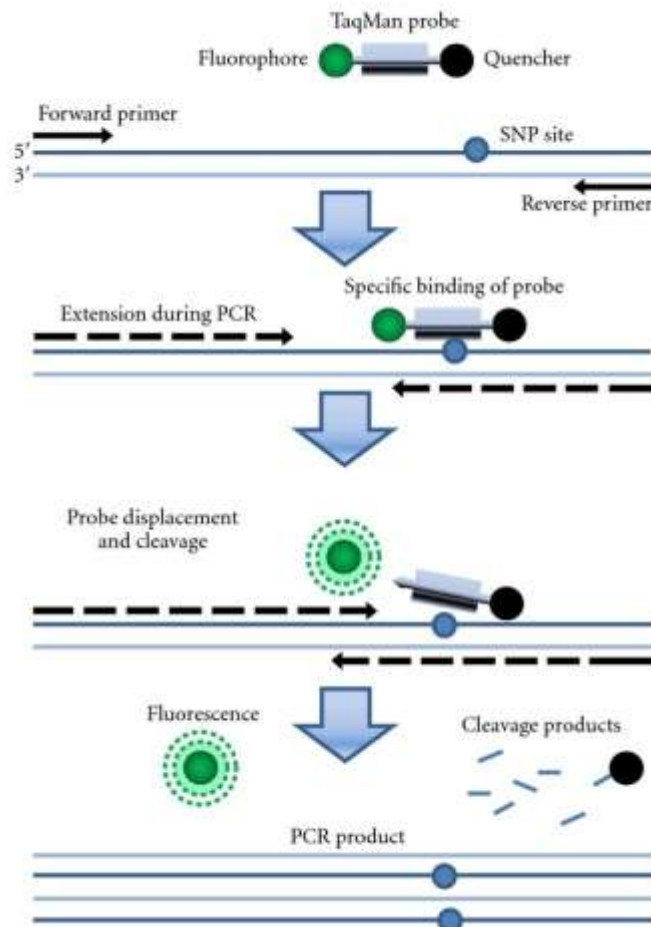


Na obrázku môžeme vidieť, že na osy y je fluorescencia (fluorescence), na osy x je počet cyklov (cycle number). Vo fáze s exponenciálnym rastom (exponential growth phase) rastie fluorescencia exponenciálne na základe množstva tvorby výsledného produktu. V prípade keď sa prekoná prahové množstvo fluorescencie, zaregistruje sa počet cyklov, ktorý bol potrebný k zachyteniu fluorescencie (CT). Na obrázku je hodnota CT v 10. a 15. cykle. Potom nastáva fáza plateau (plateau phase), kde sa úroveň signálu už nemení, pretože dochádza k vyčerpaniu jednotlivých komponentov potrebných pre PCR a nasýteniu signálu.

Prevzaté z: *The real-time polymerase chain reaction* [70]

Ako už bolo spomínané, pre real-time PCR je potrebná prítomnosť fluorescenčného reportéra, ktorý generuje fluorescenciu [70]. Používajú sa dve základné skupiny fluorescenčných markerov. Do prvej skupiny patria látky ako napríklad SYBR GREEN I alebo BEBO. Ak sa tieto farbivá nachádzajú voľne v roztoku, nevykazujú žiadnu fluorescenciu, ale keď sa interkalačne naviažu na DNA, začnú fluoreskovať [74]. Druhú skupinu tvoria značené primery/sondy na báze nukleových kyselín alebo ich syntetických derivátov. Radíme sem aj oligonukleotidovú sondu Taqman (viz. obrázok č. 24). Táto sonda má na sebe naviazané dve fluorescenčné farbivá - tzv. „reportér“ (generuje fluorescenciu) a „quencher“ (zhasína fluorescenciu). V prípade ak je sonda v celku, fluorescenčný signál od reportéra je tlmený quencherom. Pri predlžovaní komplementárneho vlákna DNA, Taq polymeráza spôsobuje rozdelenie sondy, kedy sa oddelí reportér a quencher a reportér začne vyžarovať fluorescenčný signál, ktorý je zachytávaný v reálnom čase pomocou termocykléra. Množstvo zachyteného signálu je priamo úmerné vytvorenému produktu [70].

Obrázok 24: Taqman fluorescenčná sonda



Na obrázku sú vidieť 2 vlákna DNA, na ktoré nasadajú primery (forward primer, reverse primer) a TaqMan sonda (Taqman probe), ktorá sa špecificky naviaže na vlákno (specific binding of probe). Fluorofór na sonde (fluorophore) vyžaruje fluorescenciu a quencher, ktorý túto fluorescenciu tlmí kým je sonda nepoškodená. Postupným predlžovaním vlákna (extension during PCR) dôjde k rozštiepeniu sondy (probe displacement and cleavage) a quencher nie je v dostatočnej blízkosti reportéra. Dochádza tak k uvoľneniu fluorescencie, ktorá je zachytená prístrojom v reálnom čase. Proces PCR je dokončený za vzniku výsledného produktu (PCR product). Zbytok sondy je rozstrihaný na menšie fragmenty (cleavage products).

Prevzaté z : *The Vector Population Monitoring Tool (VPMT): High-Throughput DNA-Based Diagnostics for the Monitoring of Mosquito Vector Populations* - Scientific Figure on ResearchGate [online] dostupné na: https://www.researchgate.net/figure/TaqMan-SNP-genotyping-The-TaqMan-assay-is-a-PCR-method-employing-oligonucleotide-probes_fig1_221845071 [15.3.2021]

3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či nová monoklonálna protilátka carotuximab ovplyvňuje expresiu endoglínu a ďalších biomarkerov endotelovej dysfunkcie ako sú eNOS, ICAM-1, VCAM-1, E-selektín, u ľudských aortálnych endotelových buniek, ktoré boli vystavené pôsobeniu vysokej glukózy (45 mmol/l) po dobu 72 hodín.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 HAEC

Pre účely tejto diplomovej práce sme používali ľudské aortálne endotelové bunky (human aortic endothelial cells, HAEC). Tieto bunky produkujú antitrombotické a trombotické faktory, sú schopné reagovať na faktory korelujúce so zápalovým procesom (napr. TNF- α), následkom čoho HAEC môžu na svojom povrchu exprimovať adhézne molekuly, či produkovať NO a ET-1. Preto je táto bunková kultúra vhodná na štúdium patogenézy vaskulárnych ochorení alebo dysfunkcie endotelu [75].

Manipulácia s bunkami prebiehala v laminárnom boxe, ktorý znižuje riziko kontaminácie buniek nežiadúcimi mikroorganizmami [76]. Keď sa s bunkami nepracovalo, boli uložené v inkubátore - zariadení, ktoré udržiava optimálne podmienky pre rast buniek, konkrétne teplotu 37°C, 5% obsah CO₂ a 95% vlhkosť [76].

Na sledovanie rastu buniek sme používali inverzný mikroskop. Objektívy sú u tohto typu mikroskopu uložené v spodnej časti, čo umožňuje pozorovať bunky zo spodnej strany, a nie je teda potrebné prekonávať vysokú masu kultivačného média, akoby to bolo potrebné pri mikroskope klasickom [76].

Zdrojom živín pre bunky bolo médium, ktoré sme museli pravidelne meniť kvôli zmenám v pH. Súčasťou väčšiny médií býva aj fenolová červeň, ktorá pri kyslom pH prechádza z ružovej cez oranžovú až do žltej farby. Alebo v prípade zásaditého pH sa mení do fialovej farby [76].

Keď bunky pokrývali celú plochu kultivačnej nádoby, museli sme ich pasážovať, pretože v tomto momente už nemohli ďalej proliferovať [76] viz. obrázok č. 25.

4.2 Príprava vzoriek

4.2.1 Rozmrazovanie buniek

Nahriali sme si želatínu a médium pre HAEC bunky na 37°C vo vodnom kúpeli.

Zloženie 0,1% želatíny:

- 76 ml sterilného PBS (*phosphate-buffered saline = fosfátový tlmivý roztok*)
- 4 ml 2% želatíny

Zloženie HAEC média:

- 200 ml EBM-2 (*endothelial cell growth basal medium = médium pre rast endotelových buniek*)
- 22 ml FBS (*fetal bovine serum = fetálny hovädzie sérum*)
- 800 µl FGF (*fibroblast growth factor = fibroblastový rastový faktor*)
- 80 µl hydrokortizónu
- 200 µl VEGF (*vascular endothelial growth factor = cievny endotelový rastový faktor*)
- 200 µl R₃-IGF (*recombinant insulin-like growth factor = rekombinantný rastový faktor podobný inzulínu*)
- 200 µl acidum ascorbicum
- 200 µl hEGF (*human epidermal growth factor = ľudský epidermálny rastový faktor*)
- 200 µl GA-1000 (*gentamicin sulfát, amfotericin*)
- 200 µl heparínu

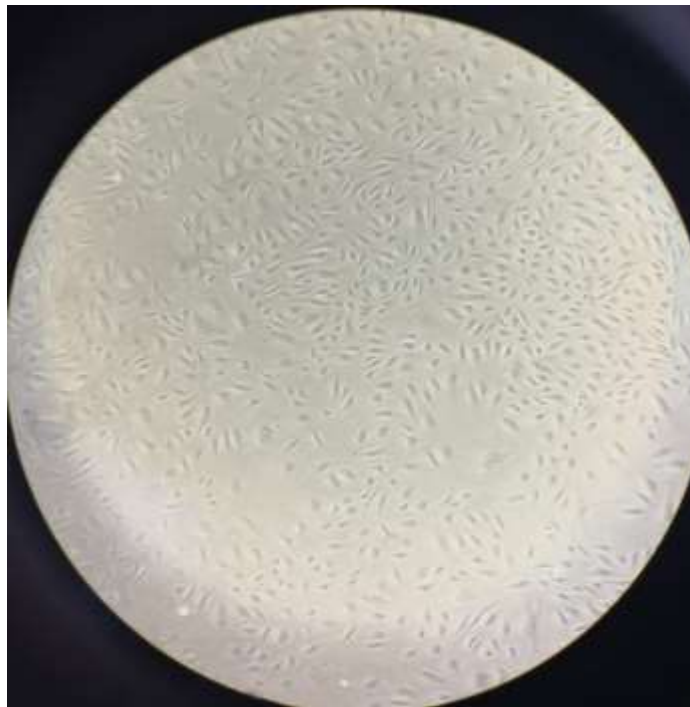
Následne sme do každej kultivačnej nádoby pridali 2 ml želatíny. Miernym poklepaním o dlaň sme dosiahli, že želatína pokryla celý povrch nádoby. Potom sme kultivačné nádoby vložili na 20 minút do inkubátora, kde došlo k prichyteniu želatíny na dno kultivačnej nádoby. Po 20 minútach sme prebytočnú želatínu odsali a pridali 8 ml média do každej nádoby.

Bunky, ktoré sú uchovávané v -80°C sme rozmrazili vo vodnom kúpeli tak, aby tam zostala malá guľička ľadu. Celý obsah skúmavky sme potom preniesli do kultivačných nádob s pripraveným médiom. Následne sme ich umiestnili do inkubátora a nechali inkubovať ďalšie 2 dni..

4.2.2 Pasážovanie

Pred samotným pasážovaním sme si museli skontrolovať bunky pod mikroskopom, či pokrývajú 80% plochy kultivačnej nádoby.

Obrázok 25: HEAC bunky



Na obrázku sa nachádzajú HAEC bunky, ktoré majú pretiahnutý tvar a pokrývajú približne 80-90% povrchu kultivačnej nádoby.

(vlastné výsledky)

Keď boli bunky dostatočne narastené, tak sme si do vodného kúpeľa dali nahriať médium, PBS a enzým akutázu.

Pripravili sme si potrebný počet kultivačných nádob na pasážovanie a do každej sme pridali 2 ml želatíny, ktorú sme rozprestrelí po povrchu celej nádoby. Kultivačné nádoby sme potom na 20 minút vložili do inkubátora.

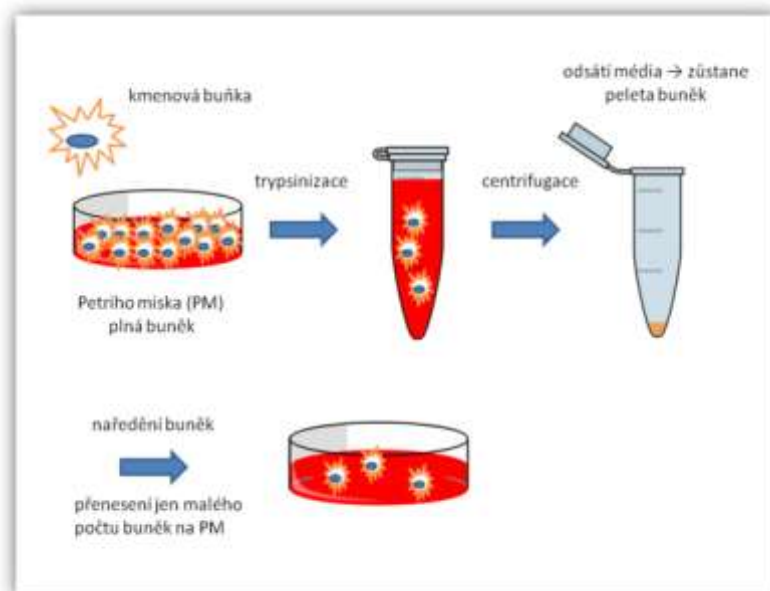
Z kultivačných nádob s HAEC bunkami sme odsali staré médium, pridali sme 3ml PBS, preplachovali sme pohybovaním kultivačných nádob a potom sme PBS odsali. Postup sme opakovali dvakrát. Týmto sme odstránili mŕtve bunky. Následne sme pridali 2 ml enzýmu akutázy, ktorá oddelila bunky z dna nádoby a kultivačné nádoby sme vložili do inkubátora na 10 minút.

Potom sme z novo-pripravených kultivačných nádob odsali želatínu a pridali do každej z nich 8 ml nahriateho média.

Po 10 minútach sme vytiahli kultivačné nádoby s bunkami z inkubátora a napipetovali sme do nich 3ml PBS, čím došlo k zriadeniu akutázy a jej inaktivácii. Následne sme celý obsah preniesli z kultivačnej nádoby do 15 ml centrifugačnej skúmavky. Znovu sme do kultivačných nádob pridali 3ml PBS a preniesli obsah do rovnakej skúmavky. Tú sme vložili do centrifúgy na 5 minút pri 1000 otáčkach za minútu (revolutions per minute, rpm).

Po centrifugácii bolo na dne skúmavky vidieť peletku buniek, ktoré sa tam usadili. Prebytočné PBS s akutázou nad bunkami (supernatant) sme odsali pomocou vákuovej odsávačky. K bunkám sme pridali 3 ml nového média, resuspendovali sme ich a napipetovali 0,5 ml do každej pripravenej kultivačnej nádoby. Postup pasážovania zobrazuje aj obrázok č. 26.

Obrázok 26: Postup pasážovania buniek



Obrázok popisuje postup pasážovania buniek. Do Petriho misky, kde sa nachádzajú bunky, sa pridá enzým trypsin (my sme pracovali s akutázou, ktorá je k bunkám šetrnejšia). Tým dôjde k uvoľneniu buniek z povrchu kultivačnej nádoby. Centrifugáciou vznikne peleta buniek a nad ňou sa nachádza médium (u nás PSB) a enzým, ktoré sa odsaje. K pelete buniek sa pridá nové médium a do pripravených Petriho misiek sa preniesie časť média s bunkami.

Prevzaté z: *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů* [76]

4.2.3 Premedikácia buniek na PCR/FC

Pre obe metódy, tzn. PCR aj FC, sme si napasážovali bunky do 12 kultivačných nádob. Samotný experimentálny dizajn však nebol pre obe metódy rovnaký. Pri metóde PCR sme si 12 kultivačných nádob rozdelili do 3 experimentálnych skupín, tzn. na každú skupinu pripadali 4 Petriho misky. V prípade FC metódy sme mali 4 experimentálne skupiny, a teda na každú pripadali 3 Petriho misky. Podľa nižšie popísaného experimentálneho dizajnu sme do každej kultivačnej nádoby pridávali premedikované médium v objeme 8 ml. Médium sme nechali pôsobiť 72 hodín.

Experimentálny dizajn (PCR):

1. Skupina kontrolná (K) – Koncentrácia glukózy bola 5 mmol a koncentrácia manitolu bola 40 mmol (manitol sme pridávali, aby sa odstránil vplyv osmotických javov spôsobených glukózou), obsahovala 4 kultivačné misky
2. Skupina s vysokou glukózou (HG) – koncentrácia glukózy bola 45 mmol, obsahovala 4 kultivačné misky
3. Skupina s vysokou glukózou a TRC 105 (HG+TRC) – koncentrácia glukózy bola 45 mmol a koncentrácia TRC 105 bola 300 µg/ml, obsahovala 4 kultivačné misky

Tabuľka 2: Experimentálny dizajn premedikácie buniek na PCR

Skupina	Glukóza (mmol)	Manitol (mmol)	TRC 105 (µg/ml)
K	5	40	X
HG	45	X	X
HG + TRC	45	X	300

K - kontrolná skupina, HG - skupina s vysokou glukózou, HG+TRC - skupina s vysokou glukózou a TRC 105

Experimentálny dizajn buniek premedikovaných na FC:

1. Skupina kontrolná (K) – Koncentrácia glukózy bola 5 mmol a koncentrácia manitolu bola 40 mmol, obsahovala 3 kultivačné misky
2. Kontrolná skupina s TRC 105 (TRC) – koncentrácia glukózy bola 5 mmol, koncentrácia manitolu bola 40 mmol a koncentrácia TRC 105 bola 300 µg/ml, obsahovala 3 kultivačné misky
3. Skupina s vysokou glukózou (HG) – koncentrácia glukózy bola 45 mmol, obsahovala 3 kultivačné misky
4. Skupina s vysokou glukózou a TRC 105 (HG+TRC) – koncentrácia glukózy bola 45 mmol a koncentrácia TRC 105 bola 300 µg/ml, obsahovala 3 kultivačné misky

Tabuľka 3: Experimentálny dizajn premedikácie buniek na FC

Skupina	Glukóza (mmol)	Manitol (mmol)	TRC 105 (µg/ml)
K	5	40	X
TRC	5	40	300
HG	45	X	X
HG + TRC	45	X	300

K- kontrolná skupina, TRC- kontrolná skupina s liečivom TRC 105, HG- vysoká glukóza, HG + TRC – skupina s vysokou glukózou a TRC 105

Výpočet množstva glukózy a manitolu:

$$m = c \cdot V \cdot M_m$$

1. Výpočet navážky 40 mmol glukózy:

$$m = 40 \cdot 0,035 \cdot 180,16 = \underline{\underline{252,224 \text{ mg}}}$$

2. Výpočet navážky 40 mmol manitolu:

$$m = 40 \cdot 0,035 \cdot 182,17 = \underline{\underline{255,038 \text{ mg}}}$$

Výpočet množstva TRC 105:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = \frac{8000 \text{ } \mu\text{l} \times 300 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25000 \text{ } \mu\text{g/ml}} = \underline{\underline{96 \text{ } \mu\text{l}}}$$

Pri navažovaní manitolu a glukózy sme nepočítali so 45 mmol koncentráciou, ale so 40 mmol, pretože v médiu, v ktorom sme ich rozpúšťali sa už 5 mmol glukózy nachádzalo.

Vypočítané množstvo glukózy a manitolu sme si navážili na analytických váhach. Následne sme ich rozpustili v 35 ml média.

Z našich kultivačných misiek sme odsali staré médium. Pridali sme 3 ml PBS, opláchli misky a PBS sme odsali. Následne sme pridali do každej kultivačnej nádoby 8 ml média podľa plánu (viz. tabuľky 2 a 3). Médium sme nechali pôsobiť 72 hodín.

Na posledných 12 hodín sme do média pridali 96 μl TRC 105. Vypočítané množstvo TRC 105 sme nasali do pipety a pridali priamo do kultivačných nádob. Potom sme kultivačné misky dôkladne premiešali a vložili do inkubátora.

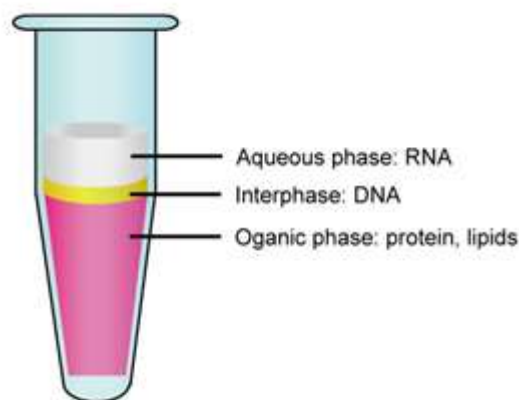
4.3.PCR

Každú kultivačnú miskú sme prepláchli s 3 ml PBS a to sme odsali. Tento postup sme opakovali 2 krát. Potom sme do každej kultivačnej nádoby pridali 2 ml TRI Reagent™ Solution (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), ktorý spôsobuje rozpad buniek a uvoľnenie RNA. Misky sme nechali na zamrzenej doske po dobu 5 minút a občas sme ich premiešali. Do mikrocentrifugačnej skúmavky sme preniesli 1 ml tejto zmesi, takže z jednej Petriho misky sme získali 2 skúmavky.

Ďalej sme vzorky zhomogenizovali pomocou ultrazvukovej ihly (10 pulzov, 80 % amplitúda) a následne pomocou natiahnutia do inzulínových striekačiek (3krát)

Potom sme pridali ku každej vzorke 200 µl chloroformu a pretrepali. Vzorky sme nechali stáť 5 minút pri izbovej teplote a následne sme ich vložili do centrifúgy vychladenej na 4°C pri 12000 rpm na 15 minút. Po centrifugácii sme pozorovali oddelenie vodnej a organickej vrstvy a na ich rozhraní bielu medzivrstvu (viz. obrázok č. 27).

Obrázok 27: Oddelenie vodnej a organickej vrstvy a precipitácia RNA v isopropanole



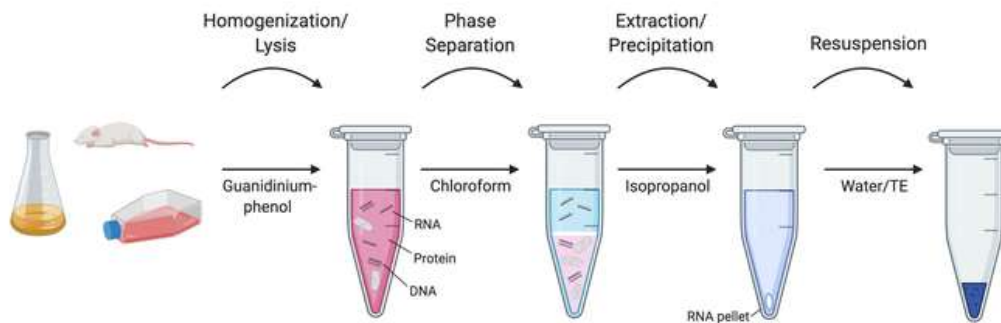
Na obrázku sú znázornené 3 vrstvy, ktoré sa nám oddelia po centrifugácii. Horná fáza je vodná (aqueous phase), kde sa nachádza izolovaná RNA, potom nasleduje medzifáza (interphase) – ktorá obsahuje DNA a v spodnej časti je fáza organická (organic phase), ktorá obsahuje proteíny a lipidy (protein, lipids).

Prevzaté z: Total protein extraction by TRIzol [online] dostupné na: <https://www.creative-diagnostics.com/total-protein-extraction-by-trizol.htm> [15.3.2020]

Do nových mikrocentrifugačných skúmaviek sme napipetovali 5 μ l GenElute™-LPA a pridali sme 300 μ l hornej – vodnej vrstvy, ktorá obsahovala izolovanú RNA. Následne sme pridali 500 μ l isopropanolu a vzorky sme premiešali. Potom sme ich nechali stáť 10 minút pri izbovej teplote a následne sme vzorky zcentrifugovali pri 12 000 rpm a 4°C po dobu 10 minút.

Po centrifugácii sme isopropanol opatrne odsali a k peletke sme pridali 1 ml 75% etanolu na odstránenie solí. Etanol sme odsali a pelety nechali vyschnúť na vzduchu pokiaľ neboli priehľadné. Vyschnuté peletky sme rozpustili v 20 μ l vody pre injekcie (aqua pro injectione, API), zortexovali a vložili na 20 minút do chladničky. Celý proces izolácie RNA je znázornený na obrázku č. 28.

Obrázok 28: RNA izolácia



Obrázok znázorňuje proces izolácie RNA. Najskôr dôjde k rozpadu buniek (lysis) a uvoľneniu DNA a RNA. Pridaním chloroformu a vytrepávaním sa oddelia 3 vrstvy (phase separation) – vodná, ktorá obsahuje RNA, medzifáza a organická vrstva. Odobratím vodnej vrstvy a pridaním izopropanolu dôjde k precipitácii RNA (precipitation) za vzniku pelety (RNA pellet). Peleta sa nechá vysušiť a potom sa rozpustí v API (water).

Prevzaté z: RNA extraction without a kit [online] dostupné na: <https://www.addgene.org/protocols/kit-free-rna-extraction> [15.3.2021]

Nasledovalo meranie koncentrácie RNA vo vzorkách pomocou spektrofotometra (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Nemecko). Na prístroji sme nastavili faktor zriedenia 1000, jednotky: ng/μl a lid factor: 50. Vzorky sme merali v objeme 1,5 μl. Ako prvé sme si zmerali tzv. blank vzorku (API), aby sa eliminovala absorbcia ostatných látok a tým sa zvýšila presnosť merania. Po každom meraní sme dôkladne utreli buničinou optickú plochu. Výsledky sme zapisovali do tabuľky č. 4.

Tabuľka 4: Riedenie RNA

číslo vzorku	Vzorka	ng/ul	Riedenie	
			objem mRNA	objem vody
1	K1	643	1,56	8,44
2	K2	625	1,60	8,40
3	K3	654	1,53	8,47
4	K4	649	1,54	8,46
5	K5	676	1,48	8,52
6	K6	672	1,49	8,51
7	K7	635	1,57	8,43
8	K8	649	1,54	8,46
9	HG1	629	1,59	8,41
10	HG2	670	1,49	8,51
11	HG3	629	1,59	8,41
12	HG4	616	1,62	8,38
13	HG5	629	1,59	8,41
14	HG6	660	1,52	8,48
15	HG7	656	1,52	8,48
16	HG8	650	1,54	8,46
17	HG/TRC1	635	1,57	8,43
18	HG/TRC2	668	1,50	8,50
19	HG/TRC3	616	1,62	8,38
20	HG/TRC4	606	1,65	8,35
21	HG/TRC5	596	1,68	8,32
22	HG/TRC6	610	1,64	8,36
23	HG/TRC7	643	1,56	8,44
24	HG/TRC8	682	1,47	8,53

Vzorky kontrolnej skupiny (K) a experimentálnych skupín (HG) a (HG/TRC) sme si nariadili na koncentráciu 100 ng/μl pridaním vypočítaného množstva vzorku a API, ktoré je uvedené v tabuľke.

Po meraní koncentrácie nasledoval prepis RNA do cDNA. Vzorky sme nariadili na 100 ng/μl podľa tabuľky č. 4. Ďalej sme si podľa tabuľky č. 5 pripravili master mix na reverznú transkripciu (master mix for reverse transcription, MM RT).

Tabuľka 5: Mix na reverznú transkripciu

MM RT	24	SAMPLES			
			množ.	nadb.	samp. (uL)
1	nuclease free water		4,2	4,536	127,008
2	RT buffer		2	2,16	60,48
3	RT random primers		2	2,16	60,48
4	dNTP mix		0,8	0,864	24,192
5	reverse transcriptase		1	1,08	30,24

Zmiešaním jednotlivých komponent, ktoré sú v tabuľke uvedené sme si pripravili MM RT. Nuclease free water – voda bez nukleáz, RT buffer – pufer pre reverznú transkripciu, RT random primers – náhodné primery pre reverznú transkripciu, dNTP mix – mix deoxynukleotidtrifosfátov, reverse transcriptase – reverzná transkriptáza.

Do 0,2 ml mikroskúmaviiek sme pridali 10 µl nariedenej vzorky a 10 µl pripraveného MM RT. Vzorky sme zcentrifúgovali a vložili do termocykléra (Biometra TOne 96G, Analytik Jena, Nemecko).

Po skončení prepisu sme získali 1000 ng cDNA v objeme 20 µl (koncentrácia = 50 ng/µl). Vzorky sme nariedili na 5 ng/µl pridaním 180 µl API.

Takto pripravené vzorky sme pipetovali do 96-jamkovej doštičky. Do každej jamky sme pipetovali zmes 5 µl master mixu (TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Kalifornia, USA) a 0,5 µl primeru. Vzorky sme pipetovali v objeme 4,5 µl do jamiek, v duplikátoch, podľa tabuľky č. 6. 96-jamkovú doštičku sme prelepili fóliou a umiestnili do centrifúgy na 2 minúty pri 1000 rpm.

Tabuľka 6: 96-jamková doštička

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	HG1	HG2	HG3	HG4
B	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	HG1	HG2	HG3	HG4
C	HG5	HG6	HG7	HG8	HG/TRC1	HG/TRC2	HG/TRC3	HG/TRC4	HG/TRC5	HG/TRC6	HG/TRC7	HG/TRC8
D	HG5	HG6	HG7	HG8	HG/TRC1	HG/TRC2	HG/TRC3	HG/TRC4	HG/TRC5	HG/TRC6	HG/TRC7	HG/TRC8
E												
F												
G												
H												

Čísla (1-12) označujú stĺpce doštičky a písmená (A-H) označujú jej riadky – doštička teda obsahuje 12 stĺpcov po 8 jamkách. Vzorky sme pipetovali v duplikátoch – tzn. každú vzorku do dvoch jamiek.

Takto pripravenú 96-jamkovú dosku sme vložili do termocykléra (QuantStudio™ Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Kalifornia, USA). Namerané výsledky sme exportovali do Excel tabuľky. Jedným z výsledkov bola aj hodnota CT. Z tejto hodnoty sme následne vypočítali relatívnu génovú expresiu vzoriek:

Najprv sme si museli vypočítať hodnotu delta CT. Tá popisuje rozdiel medzi CT cieľového génu a CT referenčného génu:

$$\Delta CT = CT (\text{cieľový gén}) - CT (\text{referenčný gén})$$

Druhá hodnota – delta delta CT je daná rozdielom medzi delta CT cieľového génu a priemerom delta CT kontrolnej skupiny:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{cieľový gén}) - \text{priemer } \Delta Ct (\text{kontrolná skupina})$$

Nakoniec sme si vypočítali negatívnu druhú mocninu delta delta CT:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Tieto hodnoty vyjadrujú expresiu cieľového génu vztiahnutú na expresiu referenčného génu [77].

4.4 Prietoková cytometria

Z Petriho misky sme odsali médium, pridali 3 ml PBS a pomaly sme preplachovali povrch misky. Potom sme PBS odsali. Tento postup sme opakovali 2krát. Potom sme k bunkám pridali 2 ml akutázy . Miernym pohybom sme akutázu rozprestrelí po celom povrchu misiek a následne sme ich vložili na 10 minút do inkubátoru.

Po 10 minútach sme k akutáze pridali 3 ml PBS, čím sme enzým inaktivovali. Zmes akutázy a PSB sme preniesli do 15 ml falkonky. Do Petriho misky sme pridali znovu 3 ml PSB, opláchli a preniesli do rovnakej falkonky. Následne sme falkonky vložili do centrifúgy na 5 minút, pri 1000 rpm. Vzniknutý supernatant sme odsali.

K peletke buniek sme pridali 0,5 ml PBS a tento objem sme rozdelili do 2 centrifugačných skúmaviek. Takže z 1 Petriho misky sme získali 2 centrifugačné skúmavky. Tie sme vložili do centrifúgy vychladenej na 4°C po dobu 5 minút, pri 1000 rpm. Supernatant sme odsali. K vytvorenej pelete sme pridali 1 kvapku R.T.U. 2,5 % Normal Goat Serum (blokuje nešpecifické viazanie protilátok) a 150 µl PBS. Vzorky sme zvortexovali a ponechali 20 minút pri 4°C.

Po uplynutí 20 minút sme skúmavky vložili do centrifúgy (5 minút, 1000 rpm, 4°C). Vzniknutý supernatant sme odsali a k peletke sme pridali 10 µl primárnej protilátky s naviazaným fluorofórom. Museli sme pracovať v tme, pretože inak by mohlo dochádzať k vyžarovaniu fluorescencie. Do vzorky K1 sme protilátku nepridávali, ale namiesto toho sme pridali 10 µl PBS. Táto vzorka slúžila ako negatívna kontrola. Skúmavky sme ponechali 1 hodinu pri 4°C a každých 20 minút sme vzorky zvortexovali, aby sa bunky neusádzali a aby sa primárna protilátka mohla naviazať na povrch všetkých buniek.

Po uplynutí 1 hodiny sme primárnu protilátku nariedili pridaním 250 µl PBS a opäť vložili do centrifúgy (4°C, 5 minút, 1000 rpm). Supernatant nad peletou sme odsali a k pelete sme pridali 300 µl PBS. Vzorky sme resuspendovali a obsah sme preniesli do špeciálnych skúmaviek, ktoré sú vhodné na meranie v prietokovom cytometri. Vzorky sme uložili do řadu a pripravili sme si zmes propídium jodidu a PBS v pomere 1:1. Túto zmes sme pridávali k vzorkám až pri meraní, aby sme mohli odlíšiť bunky živé od mŕtvych (propídium jodidu zafarbuje iba mŕtve bunky).

Vzorky sme merali na prietokovom cytometri CytoFlex LX (Beckman Coulter, Kalifornia, USA). Výsledky, ktoré sme získali z prístroja sme vyhodnotili pomocou programu CytExpert Acquisition and Analysis Software (verzia 2.4, Beckman Coulter, Kalifornia, USA). Výsledky sme exportovali do programu Excel a z nameraných hodnôt sme vypočítali index relatívnej expresie (bunky pozitívne na protilátku v % X priemerná fluorescencia) a ten sme nakoniec previedli na % kontroly (vzorka/priemer kontroly X 100).

Výsledky sme ďalej spracovávali v štatistickom programe GraphPad Prism 9 (verze 9.1.0; GraphPad Software Inc., CA, USA).

5. VÝSLEDKY

Naše výsledky sme uvádzali ako priemer \pm štandardná chyba priemeru. Pomocou neparametrického t-testu (Mann-Whitney) sme stanovili hladinu štatistickej významnosti (p). Štatisticky významné sú rozdiely medzi skupinami, keď $p \leq 0,05$. V prípade ak je hodnota štatisticky významná, tak je označená symbolom „*“ a vtedy platí že: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. V prípade ak hodnota štatisticky významná nebola, je označená symbolom „ns“, pričom platí, že $p > 0,05$. Hodnotu štatistickej významnosti (p) sme získali zo štatistického programu GraphPad Prism 9 (verze 9.1.0; GraphPad Software Inc., CA, USA).

5.1 PCR

Pomocou PCR metódy sme vyhodnotili expresiu mRNA endoglínu a ďalších markerov endotelovej dysfunkcie ako sú enzým eNOS, adhézne molekuly – ICAM-1, VCAM-1 a E-selektín

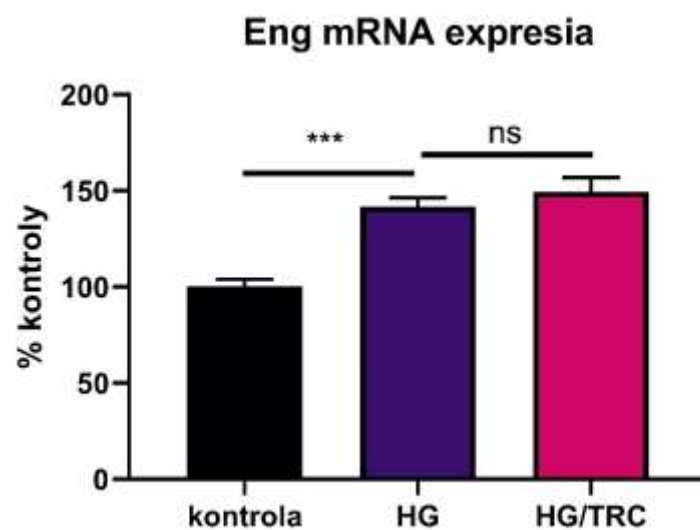
Ďalej sme vyhodnotili aj tzv. housekeep gen – HPRT (hypoxantín guanín fosforibozyl transferáza) na ktorý boli ostatné gény normalizované. Normalizácia nám umožnila spresniť namerané výsledky. Výsledky jednotlivých skupín – K (kontrola), HG (vysoká glukóza), HG/TRC (vysoká glukóza a TRC 105) sme medzi sebou porovnávali.

5.1.1 mRNA expresia Eng

PCR metóda preukázala signifikantný rozdiel v expresii Eng medzi kontrolnou skupinou a skupinou HG ($p < 0,001$). Expresia bola signifikantne vyššia u skupiny HG ako u kontrolnej skupiny.

Signifikancia sa však nepreukázala medzi skupinami HG a HG/TRC ($p = 0,442$). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly a zobrazuje ich graf č. 1.

Graf 1: mRNA expresia Eng



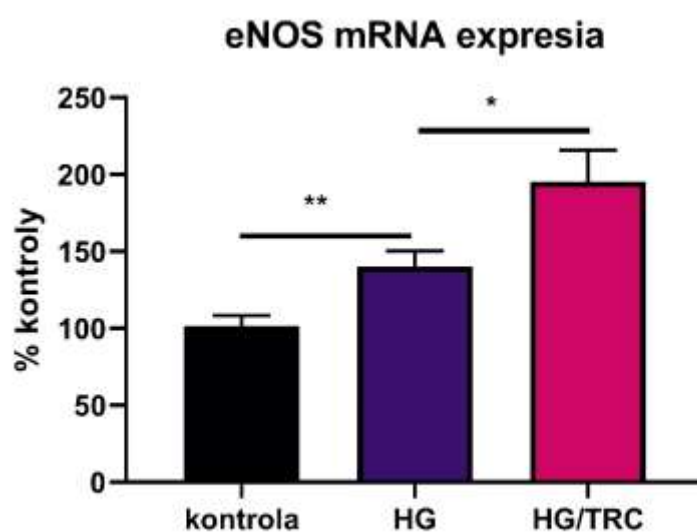
Prvý stĺpec zľava zobrazuje mieru expresie Eng u kontrolnej skupiny (kontrola) predstavujúcu normálnu hladinu glukózy. Stredný stĺpec označený HG zobrazuje expresiu Eng pre experimentálnu skupinu s vysokou glukózou a posledný stĺpec odráža expresiu Eng v experimentálnej skupine HG/TRC. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.1.2 mRNA expresia eNOS

Expresia enzýmu eNOS bola v prípade experimentálnej skupiny HG signifikantne vyššia v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p = 0,005$).

Štatisticky významný rozdiel expresie eNOS sa ukázal aj v porovnaní experimentálnych skupín HG a HG/TRC ($p = 0,050$). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly a zobrazuje ich graf č. 2.

Graf 2: mRNA expresia eNOS



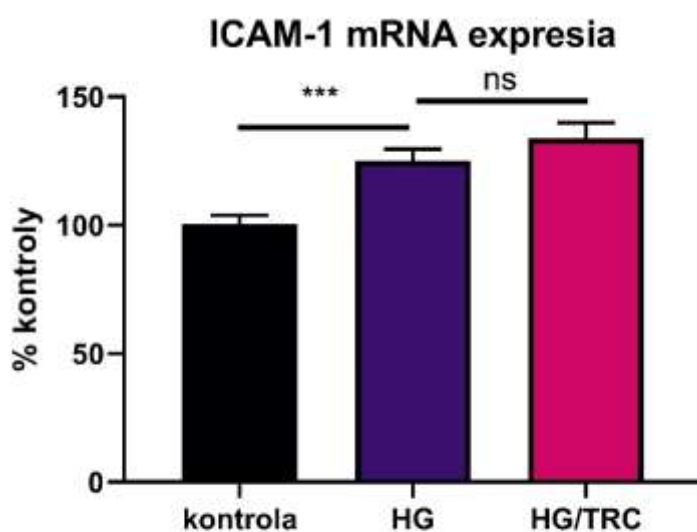
Prvý stĺpec zľava zobrazuje mieru expresie enzýmu eNOS u kontrolnej skupiny (kontrola) obsahujúcej normálnu hladinu glukózy. Stredný stĺpec označený HG zobrazuje expresiu tohto enzýmu pre experimentálnu skupinu s vysokou glukózou. Posledný stĺpec (HG/TRC) predstavuje mieru expresie eNOS pre experimentálnu skupinu s vysokou glukózou a TRC 105. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.1.3 mRNA expresia ICAM-1

Hodnoty expresie ICAM-1 boli štatisticky významne vyššie ($p < 0,001$) u skupiny HG oproti kontrolnej skupine.

PCR metóda neodhalila žiadnu signifikanciu ($p = 0,328$) medzi experimentálnymi skupinami HG a HG/TRC. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly a sú zobrazené v grafe č. 3.

Graf 3: mRNA expresia ICAM-1



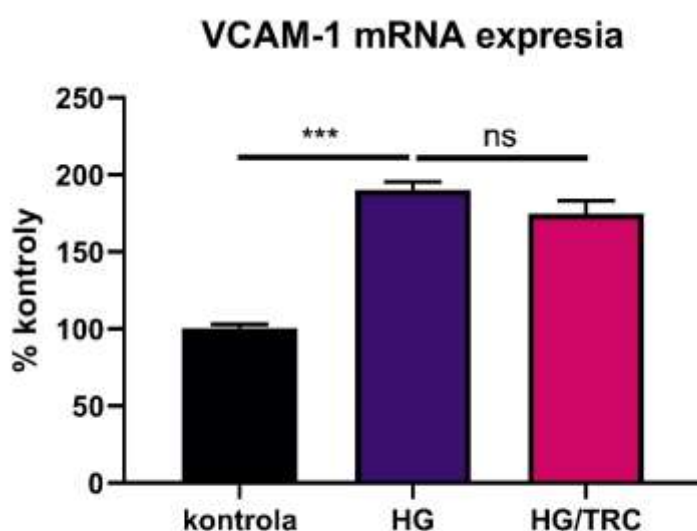
Čierny stĺpec grafu (kontrola) predstavuje mieru expresie ICAM-1 u kontrolnej skupiny s normálnou hladinou glukózy. Stredný stĺpec označený HG zobrazuje expresiu ICAM-1 pre experimentálnu skupinu s vysokou glukózou. Stĺpec vpravo označený HG/TRC predstavuje expresiu ICAM-1 v experimentálnej skupine s vysokou glukózou a TRC 105. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.1.4 mRNA expresia VCAM-1

Pri porovnávaní expresie VCAM-1 molekuly medzi skupinami kontrola a HG sme preukázali signifikantný rozdiel ($p < 0,001$), pričom v skupine HG bola expresia VCAM-1 významne vyššia.

Rozdiel v expresii VCAM-1 u skupín HG a HG/TRC sa preukázal ako nesignifikantný ($p = 0,130$). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly a sú zobrazené v grafe č. 4.

Graf 4: mRNA expresia VCAM-1



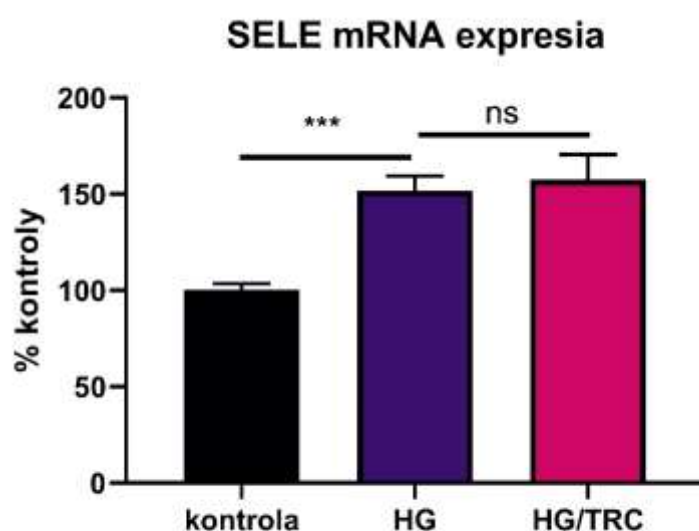
Stĺpec vľavo (kontrola) zobrazuje mieru expresie VCAM-1 u kontrolnej skupiny predstavujúcej normálnu hladinu glukózy. Stĺpec uprostred označený ako HG zobrazuje expresiu VCAM-1 pre experimentálnu skupinu s vysokou glukózou a stĺpec vpravo odráža expresiu VCAM-1 v experimentálnej skupine s vysokou glukózou a TRC 105. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.1.5 mRNA expresia SELE

Zmeny expresie E-selektínu medzi kontrolnou a experimentálnou HG skupinou sa ukázali ako štatisticky významné ($p < 0,001$). Miera expresie bola v skupine HG štatisticky významne vyššia.

Rozdiel expresie SELE u experimentálnych skupín HG a HG/TRC sa ukázal ako nesignifikantný ($p = 0,959$). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly a sú zobrazené v grafe č. 5.

Graf 5: mRNA expresia SELE



Stĺpec s označením (kontrola), predstavujúcu normálnu hladinu glukózy popisuje génovú expresiu E-selektínu. Stredný stĺpec HG zobrazuje expresiu SELE pre experimentálnu skupinu s vysokou glukózou. Stĺpec vpravo odráža expresiu SELE v experimentálnej skupine HG/TRC. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.2 Prietoková cytometria

Pomocou metóda prietokovej cytometrie sme stanovili proteínové hladiny u Eng a ICAM-1.

Medzi sebou sme porovnávali 4 skupiny. Prvá skupina predstavovala kontrolnú skupinu (normálna glukóza), voči ktorej sme porovnávali skupinu TRC (normálna glukóza + TRC 105) a skupinu HG (vysoká glukóza). Porovnaním skupín kontrola a TRC sme mohli určiť, ako pôsobí liečivo na bunky. Ďalej sme medzi sebou porovnávali skupiny HG a HG/TRC a rozdiel medzi týmito skupinami vypovedal o tom, ako pôsobí liečivo na bunky aktivované vysokou glukózou. Všetky výsledky zobrazené v grafoch sú vyjadrené v % kontroly.

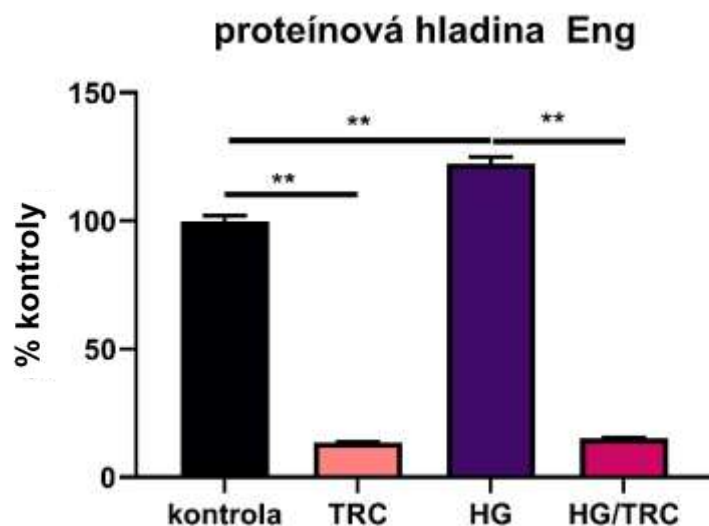
5.2.1 Proteínová hladina Eng

Proteínové hladiny Eng sa preukázali štatisticky významne nižšie ($p = 0,004$) u skupiny TRC oproti skupine kontrolnej.

Hladiny Eng boli signifikantne vyššie ($p = 0,004$) u experimentálnej skupiny HG v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Proteínová hladina Eng u experimentálnej skupiny HG sa ukázala signifikantne vyššia ($p = 0,004$) v porovnaní s Eng u experimentálnej skupiny HG/TRC. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly a sú zobrazené v grafe č. 6.

Graf 6: Proteínová hladina Eng



Prvý stĺpec zľava zobrazuje proteínovú hladinu Eng u kontrolnej skupiny s normálnou hladinou glukózy. Stĺpec grafu s označením TRC predstavuje hladinu proteínu pre skupinu s normálnou hladinou glukózy a s pridaným liečivom TRC 105. Stĺpec s označením HG zobrazuje experimentálnu skupinu s vysokou glukózou a stĺpec experimentálnej skupiny HG/TRC odráža proteínové hladiny Eng po vysokej glukóze a liečive. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

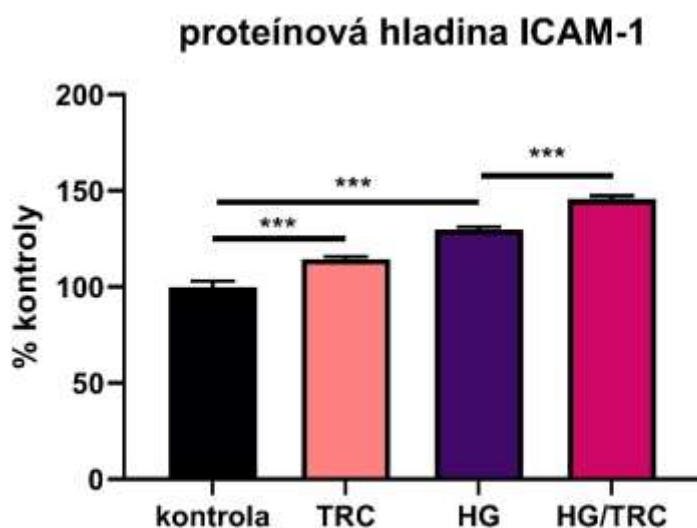
5.2.2 Proteínová hladina ICAM-1

Proteínová hladina ICAM-1 bola štatisticky významne vyšší ($p < 0,001$) u skupiny TRC v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Proteínová hladina ICAM-1 pri porovnávaní kontrolnej skupiny a HG skupiny bola signifikantne vyššia ($p < 0,001$) u skupiny HG.

Miera proteínovej hladiny je signifikantne zvýšená ($p < 0,001$) u skupiny HG/TRC v porovnaní so skupinou HG. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly a sú zobrazené v grafe č. 7.

Graf 7: Proteínová hladina ICAM-1



Prvý stĺpec zľava zobrazuje hladinu proteínu ICAM-1 u kontrolnej skupiny. Stĺpec grafu s označením TRC predstavuje hladinu proteínu pre skupinu s normálnou hladinou glukózy a s pridaným liečivom TRC 105. Stĺpec s označením HG popisuje proteínové hladiny namerané u skupiny s vysokou glukózou a stĺpec HG/TRC predstavuje proteínové hladiny ICAM-1 u skupiny s vysokou glukózou a TRC 105. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

6. DISKUSIA

Endoglin je transmembránový glykoproteín, ktorý je silne exprimovaný v aortálnych endotelových bunkách. Ukázalo sa, že za expresiu Eng, ktorá bola zaznamenaná v aorte u myšieho modelu aterosklerózy, sú zodpovedné hlavne endotelové bunky a nie iné bunkové typy [9]. Expresia membránového Eng bola znížená v pokročilých aterosklerotických plátoch, čo naznačuje, že jeho expresia s progresiou aterosklerózy klesá [26, 34]. Expresia membránového Eng bola navyše znížená, keď ľudské endotelové bunky pupočnej žily boli vystavené zápalovému faktoru TNF- α po dobu 24 hodín [32]. Na druhej strane sa ale ukázalo, že membránový Eng sa podieľa na zápalovej infiltrácii leukocytov *in vivo* aj *in vitro* [30, 78], čo svedčí o jeho podpornej úlohe pri zápalových stavoch. Tieto údaje popisujú komplexnú, regulovanú expresiu a funkciu Eng počas endotelovej dysfunkcie/zápalu, čo sú dôležité počiatočné kroky aterogenézy.

Vyššie uvedené údaje jasne ukazujú rozdiely v potencionálnej úlohe Eng v štúdiách *in vivo* (simulujúcich aterogenézu) a štúdiách *in vitro* (zameraných na rôzne krvné cievy). Presná úloha Eng pri vývoji alebo ochrane pred endotelovou dysfunkciou preto nie je známa.

Metabolický syndróm zahrňuje stavy/príznaky, ktoré sa zvyčajne vyskytujú súčasne (endotelová dysfunkcia, arteriálna hypertenzia, hyperglykémia, obezita súvisiaca s inzulínovou rezistenciou a hypercholesterolémia alebo hypertriglycerolémia) a považujú sa za rizikové faktory pre kardiometabolické poruchy ako je ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu a poruchy pečene [79].

Novým prístupom v liečbe určitých ochorení je použitie monoklonálnych protilátok presnejšie zameraných na zmenené alebo toxické proteíny. Carotuximab je terapeutická monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na ľudský a na myšiu endoglin (s vyššou afinitou k ľudskému Eng) [80]. V súčasnosti neexistujú žiadne štúdie zaoberajúce sa účinkami carotuximabu na vývoj endotelovej dysfunkcie.

V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na popisovanie účinkov carotuximabu pri vysokej expozícii glukózy (simulácia hyperglykémie u diabetu mellitus typu II

a metabolického syndrómu v podmienkach *in vivo*) na expresiu Eng, ako aj na expresiu bunkových adhézných molekúl ako ICAM-1, VCAM-1, E-selektín a enzýmu eNOS.

Expozícia vysokým hladinám glukózy významne zvýšila génovú expresiu Eng, VCAM-1, ICAM-1, E-selektínu a eNOS v porovnaní s kontrolnou skupinou. To naznačuje úspešnú indukciu endotelovej dysfunkcie u použitých aortálnych endotelových buniek. Tieto výsledky sú v zhode s predchádzajúcim výskumom, ktorý dokazuje, že 7-ketocholesterol (simulujúci hypercholesterolémiu) zvýšil expresiu Eng a biomarkerov endotelovej dysfunkcie a zápalu ICAM-1 a P/E-selektíny u aortálnych endotelových buniek [27]. Tieto údaje naznačujú, že vystavenie endotelových buniek rizikovým faktorom pre rozvoj endotelovej dysfunkcie zvyšuje expresiu Eng. Ďalej bolo tiež dokázané, že toto zvýšenie expresie Eng zvyšuje adhéziu a transmigráciu monocytov cez endotel, čo naznačuje rozhodujúcu úlohu Eng v tomto procese [27].

Pre účely tejto diplomovej práce sme sa rozhodli použiť carotuximab, aby sme objasnili, či má vplyv na expresiu Eng a bunkových adhézných molekúl za hyperglykemických podmienok. qRT-PCR preukázala, že carotuximab neovplyvňuje vysokou glukózou stimulovanú génovú expresiu Eng, čo naznačuje, že carotuximab neovplyvňuje expresiu/produkciu Eng u aortálnych endotelových buniek. Rovnaký efekt bol zaznamenaný u génovej expresie ICAM-1, VCAM-1 a E-selektínu, čo znamená, že carotuximab neovplyvňuje ani expresiu bunkových adhézných molekúl za hyperglykemických podmienok. Na vyhodnotenie proteínových hladín Eng a ICAM-1 za hyperglykemických podmienok bola použitá prietoková cytometria. Táto analýza odhalila, že carotuximab blokuje expresiu Eng, ako bolo popísané v literatúre [81]. Ďalej sme dokázali, že po vystavení buniek vysokým hladinám glukózy došlo aj k zvýšeniu proteínovej expresie membránového Eng u aortálnych endotelových buniek. Prvýkrát sme v tejto diplomovej práci ukázali, že carotuximab blokuje aj proteínovú expresiu Eng po vystavení vysokým hladinám glukózy v porovnaní s bunkami vystavenými iba vysokej glukóze. To znamená, že môžeme očakávať podobné efekty ako už boli popísané v minulosti pri blokácií/inhibícií Eng [27].

Taktiež sme potvrdili výsledky získané qRT-PCR a preukázali zvýšenú proteínovú expresiu ICAM-1 po vystavení vysokým hladinám glukózy. Prekvapivo, stimulácia buniek

carotuximabom viedla k zvýšenej proteínovej expresii ICAM-1. V súčasnosti nie sú k dispozícii žiadne informácie o carotuximabe a jeho vplyve na bunkové adhézne molekuly, takže tento účinok zatiaľ nemôžeme vysvetliť. Okrem toho sa proteínová expresia ICAM-1 zvýšila aj v kombinácii vysokej glukózy a carotuximabu, čo ukazuje, že carotuximab potencióálne môže vyvolať zápal a endotelovú dysfunkciu u aortálnych endotelových buniek.

V súhrne, carotuximab blokuje expresiu Eng a zvyšuje expresiu ICAM-1. Vyvoláva to otázku, aký bude účinok carotuximabu na rozvoj endotelovej dysfunkcie za hyperglykemických podmienok. Analýze funkčných dôsledkov týchto výsledkov sa budeme venovať v budúcich experimentoch.

7. ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či nová monoklonálna protilátka carotuximab ovplyvňuje expresiu endoglínu a ďalších biomarkerov endotelovej dysfunkcie ako sú eNOS, ICAM-1, VCAM-1, E-selektín, u ľudských aortálnych endotelových buniek, ktoré boli vystavené pôsobeniu vysokej glukózy po dobu 72 hodín. Výsledky potvrdili, že po navodení hyperglykémie, došlo k rozvoju endotelovej dysfunkcie u HAEC. U Eng a ostatných biomarkerov endotelovej dysfunkcie nebol preukázaný vplyv carotuximabu na ich génovú expresiu. Prvýkrát sme dokázali, že carotuximab znižuje proteínové hladiny Eng po vystavení vysokým hladinám glukózy. Takže môžeme očakávať inhibíciu Eng a jeho dráhy. Avšak u adhéznej molekuly ICAM-1 viedol carotuximab k zvýšeniu proteínových hladín. Tento jav zatiaľ nemôžeme vysvetliť, ale je pravdepodobné, že carotuximab môže vyvolať zápal a endotelovú dysfunkciu u endotelových buniek. Funkčný dopad týchto výsledkov musí byť ďalej preskúmaný.

8. POUŽITÉ SKRATKY

Skratka	Význam skratky	Slovenský význam skratky
AC	adenylate cyclase	adenylátcykláza
AGEs	advanced glycation end products	konečné produkty pokročilej glykácie
AH	arterial hypertension	arteriálna hypertenzia
ALK-1	activin receptor like kinase 1	kináza 1 podobná aktivínovému receptoru
ALK-5	Activin receptor like kinase 5	kináza 5 podobná aktivínovému receptoru
API	aqua pro injectione	voda pre injekcie
AS	angiosarcoma	angiosarkóm
ATP	adenosine triphosphate	adenozín trifosfát
ATS	atherosclerosis	ateroskleróza
BMP-2	bone morphogenetic protein 2	kostný morfogenetický proteín 2
BMP-7	bone morphogenetic protein 5	kostný morfogenetický proteín 7
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosín monofosfát
CAMs	cellular adhesion molecules	bunkové adhézne molekuly
CD 105	cluster of differentiation 105	zhluk diferenciácie 105
cDNA	complementary DNA	komplementárna DNA
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	cyklický guanozín monofosfát
CRP	c-reactive protein	c-reaktívny proteín
CT	threshold cycle	prahový cyklus
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus type 1	diabetes mellitus typu 1
DM2	diabetes mellitus type 2	diabetes mellitus typu 2
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	deoxynukleotidtrifosfát
EC	endothelial cells	endotelové bunky
ED	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkcia
EGR-1	early growth response	proteín skorej rastovej odpovede

E-kadherín	epithelial cadherin	epiteliálny kadherín
Eng	endoglin	endoglin
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ET-1	endothelin 1	endotelín 1
ET-A/B	endothelin receptor A/B	endotelínový receptor A/B
FC	flow cytometry	prietoková cytometria
FFA	free faty acids	voľné mastné kyseliny
FSC	forward scatter	priamy rozptyl
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GC	guanylate cyclase	guanylátcykláza
GLUT	glucose transporter	glukózový transportér
GTP	guanosine triphosphate	guanozín trifosfát
HAEC	human aortic endothelial cells	ľudské endotelové bunky aorty
HG	high glucose	vysoká glukóza
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1	hypoxiou indukovaný faktor 1
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	hypoxantín guanín fosforibozyl transferáza
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	mezibunková adhézna molekula 1
Ig	immunoglobulin	imunoglobulín
IL-1	interleukin-1	interleukín-1
IPA	isopropyl alcohol	isopropyl alkohol
KLF-6	Kruppel-like factor 6	Kruppel-like factor 6
LDL	low density lipoproteins	lipoproteíny s nízkou hustotou
L-Eng	long-endoglin	dlhý endoglin
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1	antigén spojený s funkciou lymfocytov 1
LXR	liver X nuclear receptor	pečenoý X jadrový receptor
Mac-1	macrophage-1 antigen	antigén makrofágu 1
MCP-1	monocyte chemoattractant peptide 1	monocytový chemoatraktívny proteín 1

MMP 12	membrane metalloproteinase 12	membránová metaloproteináza 12
MMP 14	matrix metalloproteinase 14	matrixová metaloproteináza 14
MM RT	master mix for reverse transcription	mix na reverznú transkripciu
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamid adenín dinukleotid fosfát
NF-kB	nuclear factor kappa B	nukleárny faktor kappa B
NG	normal glucose	normálna glukóza
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
PBS	phosphate buffered saline	fosfátom pufovaný soľný roztok, fosfátový tlmivý roztok
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová reťazová reakcia
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1	endotelová bunečná adhézna molekula trombocytov
PGH2	prostaglandin H 2	prostaglandín H 2
RELA	nuclear factor kappa-B subunit phosphorylated on carbon 65	podjednotka nukleárneho faktoru kappa-B fosforylovaná na uhlíku 65
qRT-PCR	quantitative real time PCR	kvantitatívna PCR v reálnom čase
RGD	tripeptide arginine-glycine-aspartate	tripeptid arginínu-glycínu-aspartátu
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species	reaktívne formy kyslíku
rpm	revolutions per minute	otáčky za minútu
RT	reverse transcriptase	enzým reverzná transkriptáza
SELE	E-selectin	E-selektín
sEng	soluble endoglin	solubilný endoglín
S-Eng	short-endoglin	krátky endoglín
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule 1	solubilná mezibunková adhézna molekula 1
Sp-1	stimulating protein 1	stimulačný proteín 1
SSC	side scatter	bočný rozptyl

sVCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	solubilná cievna adhézna molekula 1
TF	tissue factor	tkanivový faktor
TGF	transforming growth factor	transformujúci rastový faktor
TGF-β	transforming growth factor beta	transformujúci rastový faktor beta
TNF-α	tumor necrosis factor-alfa	tumor nekrotizujúci faktor-alfa
TXA2	thromboxane A2	tromboxan A2
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	cievna adhézna molekula 1
VE-cadherin	vascular endothelial-cadherin	vaskulárny endotelový kadherín
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulárny endotelový rastový faktor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	receptor vaskulárneho endotelového rastového faktoru
ZP	zona pellucida	zóna pellucida

9. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Kritériá pre syndróm inzulínovej rezistencie	30
Tabuľka 2: Experimentálny dizajn premedikácie buniek na PCR.....	63
Tabuľka 3: Experimentálny dizajn premedikácie buniek na FC	64
Tabuľka 4: Riedenie RNA.....	69
Tabuľka 5: Mix na reverznú transkripciu	70
Tabuľka 6: 96-jamková doštička	71

10. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Stavba steny tepny	12
Obrázok 2: Vazodilatácia a vazokonstrikcia	15
Obrázok 3: Vznik a následky endotelovej dysfunkcie	19
Obrázok 4: Štruktúra endoglínu a solubilný endoglin	21
Obrázok 5: Signálna kaskáda endoglínu	22
Obrázok 6 : Hypotetický model role endoglínu u aterosklerózy	25
Obrázok 7: Biosyntéza inzulínu	27
Obrázok 8: Sekrécia inzulínu	28
Obrázok 9: Príčiny vzniku DM	32
Obrázok 10: Riziková faktory pre rozvoj ED	34
Obrázok 11: Adhúzia a transmigrácia leukocytu cez endotel	37
Obrázok 12: Štruktúra ICAM-1	38
Obrázok 13: Štruktúra a formy VCAM-1	40
Obrázok 14: Carotuximab - mechanizmus účinku	42
Obrázok 15: Prúdenie vzorku cytometrom	45
Obrázok 16: Rozptylové parametre u FC	46
Obrázok 17: Histogram	47
Obrázok 18: Bodový graf- dot plot	48
Obrázok 19: Typy prietokovej cytometrie	49
Obrázok 20: Intracelulárna prietoková cytometria	50
Obrázok 21: Extracelulárna prietoková cytometria	51
Obrázok 22: Prevedenie PCR	53
Obrázok 23: Real-time PCR, CT hodnota	54
Obrázok 24: Taqman fluorescenčná sonda	56
Obrázok 25: HEAC bunky	60
Obrázok 26: Postup pasážovania buniek	62
Obrázok 27: Oddelenie vodnej a organickej vrstvy a precipitácia RNA v isopropanole	67
Obrázok 28: RNA izolácia	68

11. ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: mRNA expresia Eng.....	75
Graf 2: mRNA expresia eNOS.....	76
Graf 3: mRNA expresia ICAM-1.....	77
Graf 4: mRNA expresia VCAM-1	78
Graf 5: mRNA expresia SELE	79
Graf 6: Proteínová hladina Eng	81
Graf 7: Proteínová hladina ICAM-1.....	82

12. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Endemann, D.H., et al., *Endothelial dysfunction*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 1983-92.
2. Ghosh, A., et al., *Role of free fatty acids in endothelial dysfunction*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 50.
3. Karetová, D. *Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárných chorob*. Internal Medicine for practice, 2002.
4. Golias, C., et al., *Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease*. In Vivo, 2007. **21**(5): p. 757-69.
5. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 1**(Suppl 1): p. S62-9.
6. Kaur, R., et al., *Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies*. Cardiovasc Diabetol, 2018. **17**(1): p. 121.
7. Meurer, S.K., et al., *Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(23).
8. Vicen, M., et al., *Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020.
9. Nachtigal, P., et al., *The role of endoglin in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2012. **224**(1): p. 4-11.
10. Bilusic, M., et al., *Anti-angiogenesis in prostate cancer: knocked down but not out*. Asian J Androl, 2014. **16**(3): p. 372-7.
11. Liu, Y., et al., *Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain*. Int J Mol Sci, 2020. **22**(1).
12. Kaplon, H., et al., *Antibodies to watch in 2018*. MAbs, 2018. **10**(2): p. 183-203.
13. Aman, J., et al., *Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **311**(2): p. L453-66.

14. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. Int J Biol Sci, 2013. **9**(10): p. 1057-69.
15. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
16. Lee, M.J., et al., *Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate*. Cell, 1999. **99**(3): p. 301-12.
17. Packer, C.F., et al., *Vein Obstruction*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing-Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
18. Sturtzel, C., *Endothelial Cells*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1003**: p. 71-91.
19. Claesson-Welsh, L., *Vascular permeability--the essentials*. Ups J Med Sci, 2015. **120**(3): p. 135-43.
20. Nagy, J.A., et al., *Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis*. Angiogenesis, 2008. **11**(2): p. 109-19.
21. Burton, G.J., et al., *Oxidative stress*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011. **25**(3): p. 287-99.
22. Dufek, M., *Aterosleróza v neurologii*. Neurologické symptomy u některých interních onemocnění, 2003: p. 16-21.
23. Vrablík, M., et al., *Endoteliální dysfunkce-první stadium aterosklerózy*. Medicína pro praxi, 2011. **8**(3): p. 119-122.
24. Murín, J., et al., *Diabetes a vaskulárne poškodenie*. Vnitřné lékařství 2009. **55**(9): p. 788-791.
25. Tual-Chalot, S., et al., *Loss of Endothelial Endoglin Promotes High-Output Heart Failure Through Peripheral Arteriovenous Shunting Driven by VEGF Signaling*. Circ Res, 2020. **126**(2): p. 243-257.
26. Strasky, Z., et al., *Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice*. Circ J, 2011. **75**(7): p. 1747-55.
27. Vicen, M., et al., *Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro*. Faseb j, 2019. **33**(5): p. 6099-6114.
28. Llorca, O., et al., *Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia*. J Mol Biol, 2007. **365**(3): p. 694-705.

29. Igreja Sá, I.C., et al., *Soluble Endoglin as a Potential Biomarker of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Development, Participating in Aggravation of NASH-Related Changes in Mouse Liver*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(23).
30. Ruiz-Remolina, L., et al., *Circulating soluble endoglin modifies the inflammatory response in mice*. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0188204.
31. Toporsian, M., et al., *A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia*. *Circ Res*, 2005. **96**(6): p. 684-92.
32. Zemankova, L., et al., *Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin*. *J Physiol Pharmacol*, 2015. **66**(3): p. 403-13.
33. Vicen, M., et al., *Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021. **78**(6): p. 2405-2418.
34. Rathouska, J., et al., *Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction*. *Atherosclerosis*, 2015. **243**(2): p. 383-8.
35. Anděl, M., et al., *Diabetes mellitus: současný pohled na patogenezi, klasifikaci a léčbu*. *Neurologie pro praxi*, 2007. **1**: p. 49-54.
36. Liu, M., et al., *Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein*. *Diabetes Obes Metab*, 2018. **20 Suppl 2**(Suppl 2): p. 28-50.
37. Bluestone, J.A., et al., *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. *Nature*, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
38. Kalwat, M.A., et al., *Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell*. *Pharmacol Ther*, 2017. **179**: p. 17-30.
39. Piřhová, P., *Inzulinové režimy z klinického pohledu*. *Interní medicína Vol. 12 (11)*. 2010, Praha. 531-534.
40. Ramachandran, A., *Know the signs and symptoms of diabetes*. *Indian J Med Res*, 2014. **140**(5): p. 579-81.
41. Skyler, J.S., et al., *Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis*. *Diabetes*, 2017. **66**(2): p. 241-255.
42. Knapp, M., et al., *Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy*. *Acta Pharmacol Sin*, 2019. **40**(1): p. 1-8.

43. Kibel, A., et al., *Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus*. J Int Med Res, 2017. **45**(6): p. 1901-1929.
44. Sena, C., et al., *Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes: Targeting Inflammation*. 2018.
45. Hillis, G.S., et al., *Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective*. Heart, 1998. **79**(5): p. 429-31.
46. Koh, Y., et al., *Cell adhesion molecules and exercise*. J Inflamm Res, 2018. **11**: p. 297-306.
47. Hua, S., *Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 127.
48. Krieglstein, C.F., et al., *Adhesion molecules and their role in vascular disease*. Am J Hypertens, 2001. **14**(6 Pt 2): p. 44s-54s.
49. Janssen, A.P., et al., *Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy*. Int J Pharm, 2003. **254**(1): p. 55-8.
50. Schmidt, E.P., et al., *Adhesion Molecules: Master Controllers of the Circulatory System*. Compr Physiol, 2016. **6**(2): p. 945-73.
51. Lawson, C., et al., *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
52. van de Stolpe, A., et al., *Intercellular adhesion molecule-1*. J Mol Med (Berl), 1996. **74**(1): p. 13-33.
53. Cook-Mills, J.M., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1607-38.
54. Kong, D.H., et al., *Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
55. Campbell, D.J., et al., *Soluble vascular cell adhesion molecule 1 and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in predicting ischemic stroke in patients with cerebrovascular disease*. Arch Neurol, 2006. **63**(1): p. 60-5.
56. Quagliaro, L., et al., *Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production*. Atherosclerosis, 2005. **183**(2): p. 259-67.

57. Mehta, C.R., et al., *An adaptive population enrichment phase III trial of TRC105 and pazopanib versus pazopanib alone in patients with advanced angiosarcoma (TAPPAS trial)*. *Ann Oncol*, 2019. **30**(1): p. 103-108.
58. TRACON Pharmaceuticals. *TRACON Pharmaceuticals Announces Termination Of Phase 3 TAPPAS Trial Based On The Recommendation Of The Independent Data Monitoring Committee*. 2019; Available from: <https://traconpharma.gcs-web.com/news-releases/news-release-details/tracon-pharmaceuticals-announces-termination-phase-3-tappas>.
59. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. *Curr Protoc Immunol*, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
60. Šinkorová, Z., et al., *Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I.část*. *Vojenské zdravotnické listy*, 2008. **3**: p. 98-103.
61. Im, K., et al., *An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1897**: p. 299-311.
62. Nüsse, M., et al., *Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages*. *Mutat Res*, 1997. **392**(1-2): p. 109-15.
63. Givan, A.L., *Flow cytometry: an introduction*. *Methods Mol Biol*, 2011. **699**: p. 1-29.
64. Adan, A., *Flow cytometry: basic principles and applications*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017. **37**(2): p. 163-176.
65. Traganos, F., *Flow cytometry: principles and applications. II*. *Cancer Invest*, 1984. **2**(3): p. 239-58.
66. Menon, V., et al., *Flow cytometry protocols for surface and intracellular antigen analyses of neural cell types*. *J Vis Exp*, 2014(94).
67. Ramesh, R., et al., *Polymerase chain reaction*. *Natl Med J India*, 1992. **5**(3): p. 115-9.
68. Powledge, T.M., *The polymerase chain reaction*. *Adv Physiol Educ*, 2004. **28**(1-4): p. 44-50.
69. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. *J Vis Exp*, 2012(63): p. e3998.

70. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
71. Garibyan, L., et al., *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
72. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
73. Löfström, C., et al., *Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens*. High Throughput Screening for Food Safety Assessment, 2015: p. 219-248.
74. Nygren, J., et al., *The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA*. Biopolymers, 1998. **46**(1): p. 39-51.
75. Donnini, D., et al., *A new model of human aortic endothelial cells in vitro*. Biochimie, 2000. **82**(12): p. 1107-1114.
76. Čedíková, M., et al., *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů*. 2012, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova Praha. p. 37.
77. Rao, X., et al., *An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. Biostat Bioinforma Biomath, 2013. **3**(3): p. 71-85.
78. Rossi, E., et al., *Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration*. Blood, 2013. **121**(2): p. 403-15.
79. Stols-Gonçalves, D., et al., *NAFLD and Atherosclerosis: Two Sides of the Same Dysmetabolic Coin?* Trends Endocrinol Metab, 2019. **30**(12): p. 891-902.
80. Uneda, S., et al., *Anti-endoglin monoclonal antibodies are effective for suppressing metastasis and the primary tumors by targeting tumor vasculature*. Int J Cancer, 2009. **125**(6): p. 1446-53.
81. Liu, Y., et al., *Effects of the combination of TRC105 and bevacizumab on endothelial cell biology*. Invest New Drugs, 2014. **32**(5): p. 851-9.