

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vplyv glukózy na expresiu biomarkerov endotelové dysfunkcie u endotelových buniek

Kristína Schmidtová

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

Konzultant: Mgr. Katarína Tripská

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa rada pod'akovala prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, cenné poznatky, rady, pripomienky a v neposlednom rade za jeho trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval pri písaní diplomovej práce. Taktiež by som sa chcela pod'akovať Mgr. Kataríne Tripskej za jej rady a pomoc pri experimentálnej časti, za jej trpezlivosť a priateľský prístup.

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

V Hradci Králové, 2021

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Názov diplomovej práce: Vplyv glukózy na expresiu biomarkerov endotelové dysfunkcie u endotelových buniek

Autor: Kristína Schmidtová

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 jeho transkripčných faktorov (KLF6 a RELA) a taktiež expresiu enzýmu MMP-14 a hladinu solubilného endoglínu, u ľudských aortálnych endotelových buniek, ktoré boli po dobu 3 dní vystavené pôsobeniu vysokej hladiny glukózy.

Metódy: V tejto diplomovej práci boli použité ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC), ktoré boli po dobu 3 dní vystavené pôsobeniu vysokej hladiny glukózy (45 mmol) a po dobu 12 hodín vystavené pôsobeniu carotuximabu (300 µg/ml). Výsledky boli porovnávané s kontrolnou skupinou, ktorá bola vystavená normálnym hladinám glukózy (5 mmol). Metódou real-time PCR sme zmerali mRNA expresiu endoglínu, KLF6, RELA a MMP-14. Pomocou prietokovej cytometrie sme vyhodnotili proteínové hladiny endoglínu a enzýmu MMP-14. Pre meranie hladiny sEng sme použili metódu ELISA.

Výsledky: Génová expresia endoglínu, transkripčných faktorov a enzýmu MMP-14 bola signifikantne zvýšená po pôsobení vysokých hladín glukózy. Po pridaní carotuximabu ku skupine s vysokou hladinou glukózy nastalo signifikantné zníženie mRNA expresie KLF6. V prípade mRNA expresie endoglínu, RELA a MMP-14 nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel. Metódou prietokovej cytometrie sme zaznamenali signifikantné zvýšenie proteínovej hladiny endoglínu a po pridaní carotuximabu nastal signifikantný pokles v proteínovej hladine endoglínu. Proteínová hladina MMP-14 sa po vystavení vysokej hladine glukózy signifikantne znížila, avšak po pridaní carotuximabu sa

zvýšila. Hladiny solubilného endoglínu v médiu sa po vystavení vysokej glukóze zvýšili.

Záver: Výsledky preukázali, že carotuximab má vplyv na expresiu endoglínu a transkripčných faktorov, predovšetkým KLF6, ale aj na enzým MMP-14 u glukózou vyvolanej endotelovej dysfunkcie. Mechanizmus, ktorým carotuximab tieto zmeny spôsobuje, musí byť predmetom ďalších štúdií.

Kľúčové slová: carotuximab, endoglín, endotelová dysfunkcia, hyperglykémia, MMP-14, solubilný endoglín

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Glucose effects on the expression of biomarkers of endothelial dysfunction in endothelial cells

Author: Kristína Schmidtová

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 its transcription factors (KLF6 and RELA), as well as the expression of enzyme MMP-14 and soluble endoglin, in human aortic endothelial cells that were exposed to high glucose levels over the period of 3 days.

Methods: We used human aortic endothelial cells (HAEC), passage 5, and we exposed them to high glucose levels (45 mmol) for the period of 3 days and to carotuximab (300 µg/ml) for 12 hours. The results were compared with a control group which was exposed to normal glucose levels (5 mmol). Real-time PCR was used to measure the mRNA expression of endoglin, KLF6, RELA and MMP-14. Protein levels of endoglin and the enzyme MMP-14 were measured by flow cytometry. ELISA method was used to measure the level of soluble endoglin.

Results: Gene expression of endoglin, transcription factors and the enzyme MMP-14 was significantly increased after exposure to high glucose levels. Following the addition of carotuximab to the high glucose group, there was a significant decrease in KLF6 mRNA expression. No significant difference was observed for endoglin, RELA and MMP-14 mRNA expression. Significant increase in endoglin protein level was observed in high glucose group but after addition of carotuximab there was a significant decrease in endoglin protein level. The protein level of MMP-14 decreased significantly after exposure to high glucose, however the addition of carotuximab led to increase in

MMP-14 protein level. Soluble endoglin levels in the medium were increased in high glucose group.

Conclusions: The results showed that carotuximab has an effect on the expression of endoglin and its transcription factors, especially KLF6, but also on the enzyme MMP-14 in high glucose-induced endothelial dysfunction. The mechanism by which the TRC causes these changes needs to be the subject of further studies.

Keywords: carotuximab, endoglin, endothelial dysfunction, hyperglycemia, MMP-14, soluble endoglin

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	12
2.1	Endotel a jeho fyziologická funkcia.....	12
2.1.1	Funkcie endotelu	13
2.2	Endotelová dysfunkcia	15
2.2.1	Príčiny endotelovej dysfunkcie	16
2.2.2	Prejavy endotelovej dysfunkcie	17
2.3	Endoglin	19
2.3.1	Štruktúra endoglínu	19
2.3.2	Expresia endoglínu	21
2.3.3	Funkcia endoglínu	21
2.3.4	Endoglin a endotelová dysfunkcia	23
2.3.5	Solubilný endoglin	25
2.4	Transkripčné faktory regulujúce expresiu endoglínu.....	26
2.4.1	Krüppel-like Factor 6	27
2.4.2	Nukleárny faktor kappa B	27
2.5	Diabetes mellitus	28
2.5.1	Definícia	28
2.5.2	Typy DM	32
2.5.3	Hyperglykémia a jej vplyv na patogenézu diabetu mellitus a vzťah k endotelovej dysfunkcií.....	36
2.6	Carotuximab	38
2.6.1	Mechanizmus účinku	38
2.6.2	Klinické použitie	39
2.7	PCR – základné princípy.....	40

2.8	Prietoková cytometria – základné princípy	46
2.9	ELISA – základné princípy	53
3	Zadanie a cieľ práce	59
4	Experimentálna časť	60
4.1	HAEC	60
4.2	Príprava vzoriek	61
4.2.1	Rozmrazovanie	61
4.2.2	Pasážovanie	62
4.2.3	Premedikácia	63
4.3	PCR	67
4.4	Prietoková cytometria	73
4.5	ELISA	74
5	Výsledky.....	79
5.1	qRT-PCR:.....	79
5.1.1	mRNA expresia Eng	80
5.1.2	mRNA expresia KLF6	81
5.1.3	mRNA expresia RELA	82
5.1.4	mRNA expresia MMP-14	83
5.2	Prietoková cytometria	84
5.2.1	Proteínová hladina Eng	85
5.2.2	Proteínová hladina MMP-14	86
5.3	ELISA	87
5.3.1	hladiny sEng v médiu.....	87
6	Diskusia.....	88
7	Záver	91

8	Použité skratky.....	92
9	Zoznam tabuliek	96
10	Zoznam obrázkov	97
11	Zoznam grafov	98
12	Použitá literatúra	99

1 ÚVOD

Diabetes mellitus je chronické metabolické ochorenie, ktoré sa v Českej republike objavuje asi u 9% populácie. Diabetes mellitus vzniká v dôsledku absolútneho (diabetes mellitus 1. typu) alebo relatívneho (diabetes mellitus 2. typu) nedostatku inzulínu. Častejšie vyskytujúcou sa formou je diabetes mellitus 2. typu, pre ktorý je okrem poškodenej sekrécie inzulínu typická aj inzulínová rezistencia [1, 2]. Hlavným prejavom diabetu mellitus je hyperglakémia, ktorej častým dôsledkom je poškodenie cievneho endotelu a následne spôsobená endotelová dysfunkcia [1].

Cievy majú vnútorný povrch vystlaný endotelom [3]. Endotel je dôležitý pre udržiavanie homeostázy v organizme prostredníctvom produkcie signalizačných molekúl [4]. Endotelové bunky produkujú vazodilatačne aj vazokonstrikčne pôsobiace látky a pri nerovnováhe v ich tvorbe dochádza k endotelovej dysfunkcii [5]. Na rozvoji endotelovej dysfunkcie sa podieľa napríklad oxidatívny stres, ktorý spôsobuje rozklad tetrahydrobiopterínu. Ten je potrebným kofaktorom pre tvorbu oxidu dusnatého, ktorý je najdôležitejším vazodilatátorom [6]. Na vzniku endotelovej dysfunkcie sa ďalej podieľajú aj zápalové procesy, ktoré zahŕňajú tvorbu cytokínov a expresiu adhézných molekúl, pomocou ktorých prestupujú leukocyty a monocyty do subendotelovej vrstvy a tým poškodzujú endotel [6, 7].

Endoglin je transmembránový glykoproteín, ktorý má významnú úlohu ako koreceptor receptorového systému transformačného rastového faktoru β [8]. Zmeny v jeho expresii sú vyvolané nie len hypoxiou, ale aj poranením ciev, zápalom alebo nádormi [9, 10]. Pri znížených hladinách endoglinu dochádza k nedostatočnej produkcii oxidu dusnatého prostredníctvom TGF- β signalizačnej dráhy a to vedie k rozvoju endotelovej dysfunkcie *in vivo* [11]. Na druhej strane bolo dokázané, že Eng sa zúčastňuje zápalovej infiltrácie leukocytov *in vitro* a teda môže potencionálne zohrávať aj negatívnu úlohu pri endotelovej dysfunkcii [12].

Carotuximab je monoklonálna protilátka viažuca sa na endoglin [13]. Carotuximab niekoľkými mechanizmami inhibuje angiogézu a pôvodne bol vyvíjaný za účelom použitia v onkologických indikáciach [14, 15].

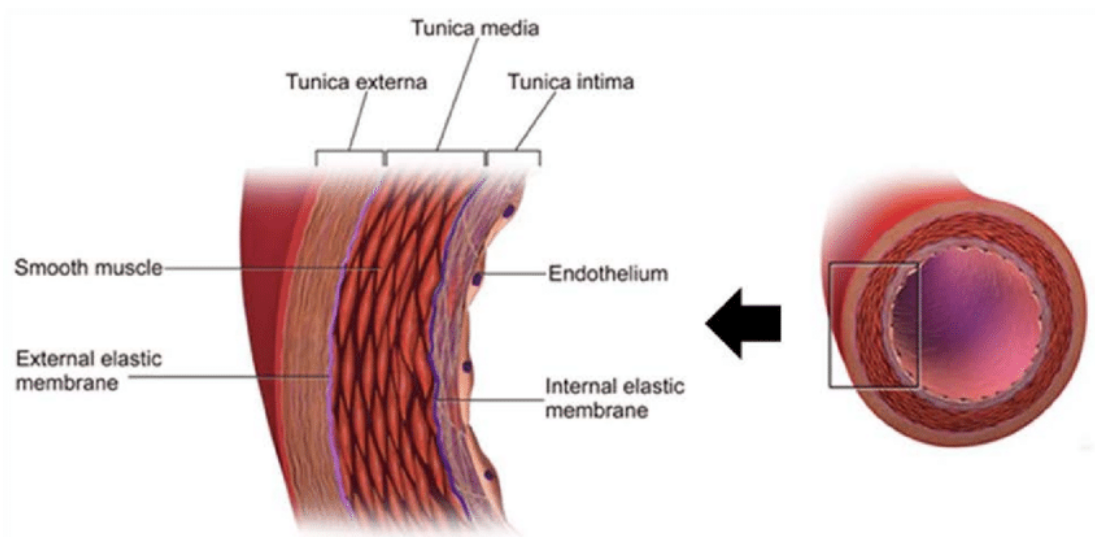
Táto diplomová práca sa zameriava na vplyv carotuximabu na expresiu endoglínu, jeho transkripčných faktorov a enzýmu MMP-14 u endotelových buniek vystavených vysokým dávkam glukózy.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Endotel a jeho fyziologická funkcia

Endotel je tvorený tenkou súvislou vrstvou buniek podlhovastého tvaru, ktoré vystielajú vnútorný povrch kardiovaskulárnej sústavy a lymfatických ciev (viď obrázok 1) [3]. Endotel nie je len bariérou, ale je veľmi významným metabolickým orgánom [16]. Nepretržite reaguje na mechanické a biochemické stimuly produkciou rôznych signalizačných molekúl, aby udržiaval stále vnútorné prostredie [3, 4].

Obrázok 1: Endotel



Obrázok zobrazuje prierez artérie. Stena artéria sa skladá z 3 vrstiev: tunica intima, tunica media a tunica externa. Tunicu intimu tvorí endotel (Endothelium), ktorý vystieľa vnútro cievy. Endotel je tvorený jednou vrstvou endotelových buniek, spojených tesnými spojmi. Pod endotelom sa nachádza ešte tenká vrstva subendotelového väziva. Tunica media je tvorená predovšetkým hladkými svalmi (Smooth muscle), ktoré sú ohraničené vnútornou elastickou membránou (Internal elastic membrane) a vonkajšou elastickou membránou (External elastic membrane). Tunica externa je tvorená predovšetkým väzivom a má funkciu upevnenia cievy do okolia.

Prevzatý z: Artery [online] Dostupný na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Artery> [2021-03-10].

2.1.1 Funkcie endotelu

2.1.1.1 *Permeabilita*

Jednou z hlavných funkcií endotelu je regulácia transportu látok cez semipermeabilnú membránu [5]. Táto membrána oddeľuje krv a krvné elementy od príľahlých tkanív [3]. Bunky majú medzi sebou tesné spoje, vďaka čomu regulujú transport látok [17]. Kvapaliny a elektrolyty prechádzajú cez membránu pomocou pasívnej difúzie, ale transport väčších molekúl musí byť sprostredkovaný pomocou membránovo viazaných receptorov [5, 18]. Takýto transport sa využíva pre proteíny, ako napríklad koagulačné a antikoagulačné faktory, lipidové častice (LDL), hormóny (endothelin-1) a iné metabolity (serotonín, oxid dusnatý) [5].

Krvné bunky pre svoj prestup cez membránu využívajú tzv. adhézne molekuly, ktoré sa nachádzajú na povrchu endotelových buniek. Medzi adhézne molekuly patrí napríklad cievná adhézna bunková molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), medzibunková adhézna molekula-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), P-selektín alebo E-selektín. Adhézne molekuly umožňujú leukocytom dostať sa z krvného riečiska cez endotelovú membránu na miesto zápalu, kde sa následne hromadia. Okrem kumulácie leukocytov dochádza v cievnej stene aj k hromadeniu monocytov, ktoré sa následne premieňajú na makrofágy [19].

2.1.1.2 *Regulácia cievneho tonusu*

Ďalšou funkciou endotelu je regulácia cievneho tonusu pomocou vazoaktívnych mediátorov. Medzi hlavné vazodilatátory patrí oxid dusnatý (nitric oxide, NO), prostacyklín (PGI₂) a endotelový hyperpolarizačný faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF), ktoré spôsobujú nie len relaxáciu cievnej svaloviny, ale zároveň aj inhibujú činnosť krvných doštičiek [5].

NO je tvorený v endotelových bunkách oxidáciou L-arginínu enzýmom NO syntáza (NOS) [5]. Existujú 3 druhy NOS a to endoteliálna NOS (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), neuronálna NOS (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) a indukovateľná (inducible nitric oxide synthase, iNOS) [20]. K syntéze NO sú potrebné kofaktory nikotínamid adenín dinukleotid fosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), flavínmononukleotid (flavin mononukleotide, FMN),

flavínadenínukleotid (flavin adenine dinucleotide, FAD), tetrahydrobiopterín (tetrahydrobiopterín, BH₄) a kalmodulín. Vytvorený NO prechádza cez endotelovú membránu k hladkým svalovým bunkám, kde aktivuje guanylát cyklázu (guanylate cyclase, GC). GC vedie k tvorbe druhého posla, cyklického 3',5'-guanozín monofosfátu (cyclic guanosine monophosphate, cGMP), ktorý sprostredkováva pôsobenie NO. eNOS je aktivovaná signálnymi molekulami ako je bradykinín, serotonín či vaskulárny endotelový rastový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) [21]. NO má tiež schopnosť znižovať expresiu adhézných molekúl, a inhibovať adhéziu a agregáciu trombocytov [22].

Prostacyklín spôsobuje relaxáciu hladkej svaloviny a uvoľňuje sa pri hypoxii a zvýšenom krvnom prietoku. Pôsobí prostredníctvom zvyšovania cyklického 3'5'-adenozín monofosfátu (cyclic 3'5'-adenosine monophosphate, cAMP) [23].

EDHF spôsobuje vazodilatáciu hyperpolarizáciou cievnych hladkosvalových buniek prostredníctvom stimulácie ATP senzitívnych K⁺ kanálov alebo Na⁺/K⁺ ATPázy [5].

Okrem vazodilatačne pôsobiacich substancií, endotelové bunky uvoľňujú aj látky vyvolávajúce vazokonstrikciu. Najvýznamnejšími látkami z tejto skupiny sú endotelín-1 (endothelin-1, ET-1), tromboxan A₂ (thromboxane A₂, TXA₂), prostaglandín H₂ (prostaglandin H₂, PGH₂) a angiotenzín II.

ET-1 je peptid, zložený z 21 aminokyselín a je produkovaný len endotelovými bunkami pri hypoxii [5, 24]. ET-1 sa vo vyššej miere viaže na receptor endotelín-A (endothelin-A, ET-A) umiestnený v cievnej hladkej svalovine, prostredníctvom ktorého pôsobí vazokonstrikčne. Okrem vazokonstrikčného pôsobenia má ET-1 aj prezápalové a premitogénne vlastnosti [24].

TXA₂ a PGH₂ aktivujú tromboxanové receptory krvných doštičiek a hladkých svalov ciev a teda pôsobia ako antagonisti NO [21].

Na povrchu endotelu sa nachádza angiotenzín-konvertujúci enzým (angiotensin-converting enzyme, ACE), ktorý pôsobí vazokonstrikčne dvoma mechanizmami účinku. Prvým je jeho schopnosť premieňať angiotenzín I na vazokonstrikčne pôsobiaci angiotenzín II. Druhým mechanizmom je, že ACE rozkladá vazodilatačne pôsobiaci bradykinín a tým potenciuje vazokonstrikčné pôsobenie [22].

2.1.1.3 Hemostáza

Hemostáza je jeden z mechanizmov, ktoré zabezpečujú celistvosť a stálosť vnútorného prostredia [5]. Významnou úlohou endotelu je zabezpečenie antikoagulačného a antitrombogénneho prostredia a tým zaistenie optimálneho krvného toku [25]. Antitrombotické a antikoagulačné účinky majú TXA₂, trombomodulín, aktivátor plasminogénu alebo molekuly podobné heparínu. Endotel produkuje trombomodulín, ktorý pri vytvorení komplexu s trombínom stráca schopnosť štiepiť fibrinogén, a tým inhibuje koaguláciu. Pri štiepení fibrínu sa taktiež uplatňuje plazmín, ktorý vzniká z plasminogénu pôsobením tkanivového aktivátoru plasminogénu (tissue plasminogen activator, t-PA). Jeho aktivita môže byť znížená inhibítorom aktivátoru plasminogénu, ktorý je taktiež syntetizovaný endotelom [19].

2.1.1.4 Angiogenéza

Angiogenéza je tvorba nových ciev vyvolaná stavom hypoxie, ktorá vzniká napríklad pri nádorových ochoreniach a ich metastázach alebo pri reparácii poškodených ciev [5]. Tvorba ciev je sprostredkovaná pomocou rastových faktov, ako je VEGF. Spolu s transformujúcim rastovým faktorom beta (transforming growth factor beta, TGF- β) stimulujú rast buniek hladkej svaloviny a tým dochádza k hypertrofii cievnej steny [19, 24].

2.2 Endotelová dysfunkcia

Pri endotelovej dysfunkcii (endothelial dysfunction, ED) dochádza k funkčnému poškodeniu samotného endotelu, sprevádzaného nadmernou permeabilitou cievnej steny a dysbalanciou medzi vazokonstričnými a vazodilačnými činiteľmi, protrombogénnymi a antitrombotickými faktormi a proliferáciou buniek [19, 25]. V miestach poškodenia cievneho endotelu dochádza k adherencii doštičiek k subendotelovému spojivu, ktorá je potrebná k obnoveniu cievnej integrity [26]. Tejto adhézii sa zúčastňuje aj von Willebrandov faktor (von Willebrand factor, vWF), ktorý je skladovaný vo Weibel-Paladeho telieskach [27]. Adhézia doštičiek je vyvolávaná kolagénom, trombínom, ale aj hypoxiou. Zvýšené expresia vWF, tkanivového faktoru a

inhibítora aktivátora plazminogénu, vyvoláva zvýšené riziko vzniku trombov [26]. ED sa podieľa na vzniku raných aj pokročilých fáz aterosklerózy a podnecuje arteriálnu hypertenziu, chronické srdčné zlyhanie, renálne zlyhanie a komplikácie diabetu mellitus (DM) [28].

Príčin ED môže byť mnoho. Za systémové príčiny sa považujú napríklad arteriálna hypertenzia, zvýšené hladiny LDL, DM, obezita, hypoxia, fajčenie, ionizačné žiarenie, cytostatiká, starnutie či rôzne infekcie (vid' obrázok 2). Medzi lokálne príčiny patrí napríklad šmykové napätie krvného prúdu (shear stress), turbulencia krvného toku, anomálie ciev a angioplastiky [19]. Najvýznamnejšie príčiny sú ďalej popísané detailnejšie.

2.2.1 Príčiny endotelovej dysfunkcie

2.2.1.1 Oxidatívny stres

Oxidatívny stres je jeden z najvýznamnejších vyvolávajúcich faktorov ED. Za fyziologického stavu sa v tele nachádzajú antioxidanty, ktoré neutralizujú voľné radikály. V prípade, že telo vykazuje nedostatok antioxidantov, dochádza k narušeniu funkcie NO, zvýšenej tvorbe peroxynitritu (ONOO-) prostredníctvom reaktívnych foriem kyslíku (reactive oxygen species, ROS). Taktiež sa zvyšuje expresia ET-1, čo má za následok poškodenie endotelu [25, 29]. Peroxynitrit inhibuje syntézu NO degradáciou BH₄, ktorý sa ako kofaktor podieľa na syntéze NO. Pri nedostatku NO dochádza k poškodeniu vazodilatačnej funkcie endotelu, čo môže následne viesť ku zvýšenému riziku vzniku vazospazmov [6].

2.2.1.2 Zápal

Pri akútnom alebo chronickom zápale dochádza k produkcii cytokínov, rastových faktorov a histamínu. Ich pôsobením sa uvoľňujú tesné spoje medzi bunkami a zvyšuje sa permeabilita membrány [30, 31]. ROS zvyšujú permeabilitu endotelovej membrány, zvyšujú aktivitu cytokínov ako sú tumor nekrotizujúci faktor-alfa (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) a interleukín-1 (interleukin-1, IL-1). Cytokíny vyvolávajú zvýšenú expresiu adhézných molekúl (ICAM-1, VCAM-1, P-selektín, E-selektín) na povrchu endotelových buniek [6]. To zapríčiňuje prestup monocytov a lipidov (LDL častíc oxidovaných ROS), podieľajúcich sa na vzniku aterosklerózy, cez endotelovú

vrstvu. Z dôvodu nedostatku NO a EDHF, ktoré majú antiproliferatívne účinky dochádza k proliferácii hladkosvalových buniek a tým k zvýšeniu extracelulárneho väziva. Takéto poškodenie endotelu vedie k vzniku zápalu [7].

Medzi ďalšie zápalové markery, ktoré sa uplatňujú pri vzniku ED, patrí aj C-reaktívny proteín (C-reactive protein, CRP), ktorý má priamy vplyv na biologickú dostupnosť NO a znižuje aktivitu eNOS [6, 32].

2.2.1.3 Infekcie

K ED môžu tiež prispievať infekcie spôsobené baktériami rodu *Chlamydia pneumoniae* či *Helicobacter pylori* a z vírusov to sú hlavne cytomegalovírus a herpes simplex virus-1. Tieto patogény vyvolávajú tvorbu imunoglobulínov, ktoré narušujú integritu endotelu [32]. Tým vedú k vzniku zápalu a tvorbe cytokínov, ako už bolo popísané vyššie [6].

2.2.2 Prejavy endotelovej dysfunkcie

2.2.2.1 Ateroskleróza

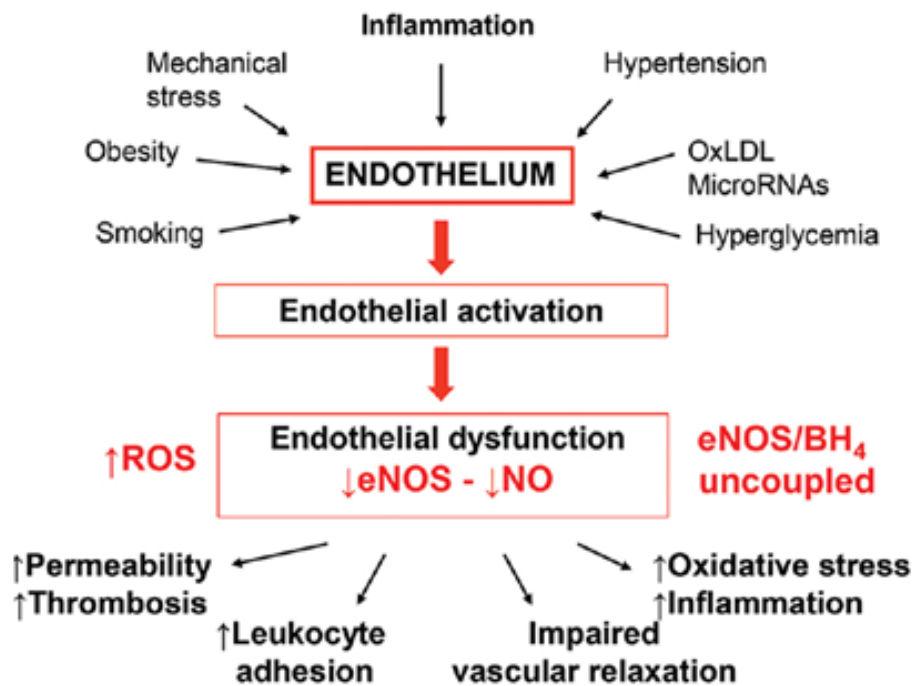
Zhoršená funkcia endotelových buniek môže viesť k vzniku kardiovaskulárnych ochorení. ED je prvým stupňom ateroskleroticky poškodených ciev, ktorý postupne prechádza do klinicky manifestujúcej sa aterosklerózy. Ako už bolo spomínané, po poškodení endotelu dochádza k zvýšenej expresii adhézných molekúl a tvorbe cytokínov, čo následne spôsobuje zvýšený prechod monocytov cez endotel [33]. V cievnej stene sa monocyty menia na makrofágy, ktoré pohlcujú oxidovaný LDL za vzniku tzv. penových buniek. Kumuláciou týchto penových buniek sa vytvárajú prvé makroskopické prejavy aterosklerózy vo forme tzv. tukových prúžkov [19]. Pri ateroskleróze sa zvyšuje migrácia hladkosvalových buniek do subendotelovej vrstvy, a to vedie k vzniku tzv. fibrínových plátov [34]. V pokročilých fázach aterosklerózy môže dôjsť až k ruptúre aterosklerotických plátov, čo môže spôsobiť vznik ďalších kardiovaskulárnych ochorení [19].

2.2.2.2 Arteriálna hypertenzia

Súvislosť medzi ED a arteriálnou hypertenziou je významná. Na základe dostupných štúdií však v súčasnosti nie je jasné, či je hypertenzia rizikovým faktorom

ED alebo ED vyvoláva hypertenziu [25]. Hypertenzia, ako rizikový faktor pre vznik ED, súvisí s mechanickým poškodením endotelu, zníženou dostupnosťou NO, ale aj zvýšenou produkciou ROS. Tieto účinky vedú k rozvoju zápalu a vazokonstrikcii [32].

Obrázok 2: Rizikové faktory vzniku endotelovej dysfunkcie



Na obrázku sú znázornené rizikové faktory, ktoré vedú k rozvoju endotelovej dysfunkcie: fajčenie (smoking), obezita (obesity), mechanické poškodenie (mechanical stress), zápal (inflammation), hypertenzia (hypertension), oxidovaný LDL (oxLDL), hyperglykémia (hyperglycemia). Pri endotelovej dysfunkcii (endothelial dysfunction) je znížená dostupnosť NO, spôsobená nárastom počtu reaktívnych foriem kyslíku (ROS) a zníženou činnosťou endotelovej NO syntázy (eNOS). Porušená endotelová funkcia vedie k zvýšenej permeabilite membrány (↑ permeability), trombóze (↑ thrombosis), zvýšenej adhézii leukocytov (↑ leukocyte adhesion), k poškodeniu vazodilatácie (impaired vascular relaxation). Ďalej sa zvyšuje aj oxidatívny stres (↑ oxidative stress), čo vedie k rozvoju zápalu (↑ inflammation).

Prevzatý z: *Vascular cytoprotein, autoimmune disease, and premature atherosclerosis* [35].

2.3 Endoglin

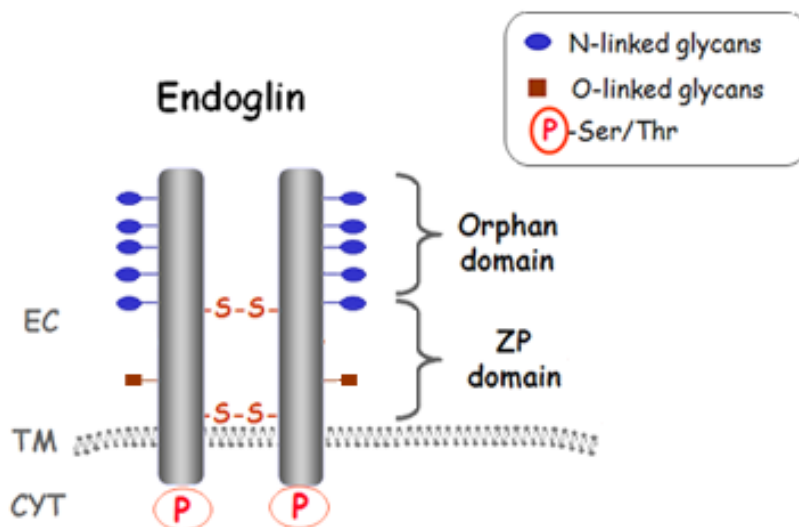
Endoglin (Eng) je transmembránový glykoproteín známy aj ako cluster of differentiation 105 (CD 105) alebo ako receptor transformujúceho rastového faktoru β typu III (TGF- β RIII) [8]. Pôvodne bol objavený v druhej polovici 80. rokov 20. storočia pomocou monoklonálnej protilátky 44G4 vytvorenej na liečbu leukémie [36, 37].

2.3.1 Štruktúra endoglinu

Eng je 180 kDa homodimérny, transmembránový receptor [37]. Disulfidové mostíky tvoria spojenie medzi dvomi 95 kDa monomérmi a tým stabilizujú štruktúru Eng (viď obrázok 3) [38, 39].

Eng pozostáva z troch častí. Najväčšou časťou je extracelulárna doména, ktorá sa skladá z 561 aminokyselín. Rozdeľuje sa na orphan doménu (OD) a zonu pellucidu (ZP). Názov orphan (sirota) vyjadruje, že táto časť nejaví žiadnu podobnosť s inou proteínovou rodinou [40]. ZP je zložená z 260 aminokyselín a obsahuje tripeptid zložený z arginínu, glycínu a kyseliny asparágovej [12, 40]. Tento tripeptid môže vytvárať väzbu s integrínmi, ktoré sa nachádzajú na povrchu proteínov, ako napríklad fibronektín, vWF, fibrinogén, protrombín a ďalšie. Táto integrínmi sprostredkovaná adhézia sa podieľa na zápale, hemostáze a trombóze [12]. Najmenšou časťou Eng je transmembránova hydrofóbna časť, ktorá je zložená z 25 aminokyselín [41, 42]. Poslednou časťou Eng je krátka cytoplazmatická doména (C-koniec) zložená zo 47 aminokyselín [43]. Obsahuje serínové a treonínové zvyšky, ktoré sú fosforylované prostredníctvom serín/treonínovej kinázy pri TGF- β signalizácii [10].

Obrázok 3: Štruktúra endoglínu



Na obrázku je vidieť štruktúru Eng. Dve podjednotky endoglínu sú spojené disulfidovými väzbami (-S-S-) vďaka, ktorým tvoria dimérnu štruktúru. Cytoplazmatická doména (CYT) je v miestach serínových a treonínových zvyškov fosforylovaná (P). Časť Eng, ktorá prechádza membránou sa nazýva transmembránová doména (TM). Extracelulárna doména (EC) sa skladá z orphan časti (orphan domain) a časti zona pellucida (ZP). Na extracelulárnej časti sú zobrazené aj miesta glykozylácie (N-linked glycans a O-linked glycans).

Prevzatý a upravený z: *The physiological role of endoglin in the cardiovascular system* [10].

Existujú 2 formy Eng. Prvou prevládajúcou formou je L-Endoglin (long-endoglin, L-Eng), ktorého cytosolická časť obsahuje 47 aminokyselín. Druhou formou je S-Endoglin (short-endoglin, S-Eng), ktorému chýbajú miesta určené na fosforyláciu a interakčné miesta pre proteíny v dôsledku kratšej cytosolickej domény, pozostávajúcej zo 14 aminokyselín [41]. Tieto rozdiely sú príčinou odlišnosti v pôsobení L-Eng a S-Eng [39].

2.3.2 Expresia endoglínu

Endoglin je predovšetkým exprimovaný v endotelových bunkách, monocytoch a makrofágoch, v hladkosvalových bunkách ciev a je aj súčasťou vrstvy placenty [44]. Endotelová expresia je riadená prostredníctvom TGF- β , kostných morfogenetických proteínov (bone morphogenetic proteins, BMPs) alebo hypoxiou [9]. Zvyšovanie hladín Eng vyvolávajú aj ďalšie patologické stavy, ako sú poranenia ciev, zápal alebo nádory [10]. Na indukciu expresie Eng sú nevyhnutné transkripčné faktory medzi, ktoré patrí napríklad hypoxiou indukovateľný faktor 1 alfa (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1 α), Krüppel-like faktor 6 (KLF6), nukleárny faktor kappa B (NF- κ B) a pečenný X receptor (liver X receptor, LXR) [8].

2.3.3 Funkcia endoglínu

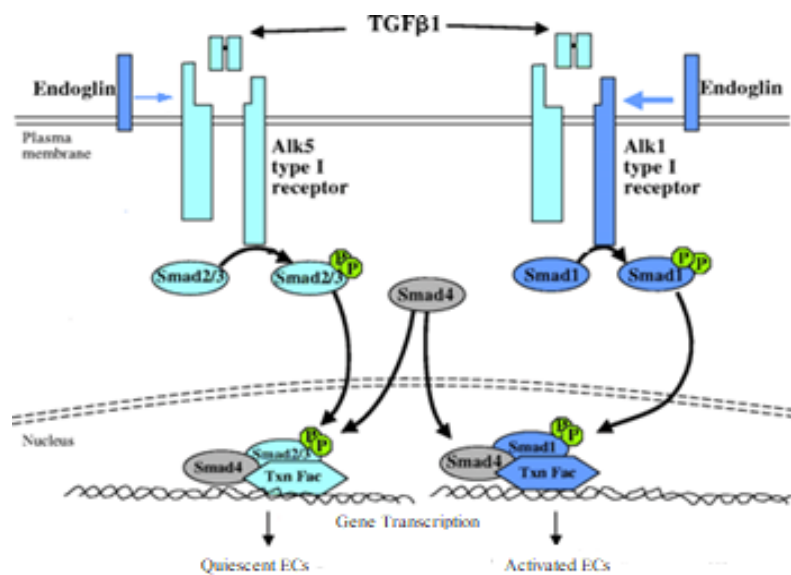
Eng hrá dôležitú úlohu pri tvorbe ciev, ich reparácii a taktiež zabezpečuje udržiavanie homeostázy v organizme [43]. Zmeny v expresii Eng môžu viesť k rozvoju ED a podnecujú rozvoj ochorení, ako sú napríklad, hereditárna hemoragická teleangiektázia či nádorové ochorenia [45, 46]. Eng je aj významným činiteľom pri kardiovaskulárnych ochoreniach, konkrétne preeklampsii, metabolickom syndróme a diabete mellitus [41, 45].

Eng je pomocný receptor, ktorý je súčasťou TGF- β signalizačnej kaskády, kde sa podieľa na úprave väzby ligandov na TGF- β receptory (viď obrázok 4) [47]. Eng pomáha viazať rôzne cytokíny z nadrodiny TGF- β , medzi ktoré patria napríklad: TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-9 alebo BMP-10 [39]. Tieto cytokíny sa viažu na transmembránové receptory TGF- β (TGF β RI a TGF β RII), ktoré vykazujú serin/threonín kinázovú aktivitu. Existuje 7 typov TGF β RI, označované ako aktivínu podobné kinázy (activin-like kinase, ALK), z ktorých v endotelových bunkách sú prítomné ALK-1 a ALK-5 [10]. TGF- β receptor typu III, Eng, nevykazuje vnútornú kinázovú aktivitu a preto slúži len ako pomocný receptor prezentujúci TGF- β cytokíny ostatným receptorom [39]. Po naviazaní TGF- β cytokínov na dané receptory dôjde k aktivácii transkripčných faktorov Smad [48]. Existujú 3 skupiny týchto proteínov a to regulačné - Smad 1, 2, 3, 5, 8, mediátorové - Smad 4 a inhibičné - Smad 6 a 7 [49]. Po naviazaní TGF- β na jednotlivé receptory, dôjde k fosforylácii Smad proteínov. Na fosforylovaný heterodimer sa

naviaže mediátorový Smad 4. Tento vzniknutý komplex prechádza do jadra, kde priamo reguluje transkripciu cieľového génu [48].

Pokiaľ dôjde k aktivácii TGF β RI typu ALK-1, aktivuje sa signálna kaskáda Eng/ALK-1/Smad1/5, ktorá podnecuje migráciu a proliferáciu endotelových buniek. Druhou možnosťou je aktivácia kaskády Eng/ALK-5/Smad2/3, ktorá inhibuje tvorbu ciev a bráni migrácii a proliferácii endotelových buniek [10, 41].

Obrázok 4: TGF β signalizačná kaskáda



Na obrázku je znázornená TGF- β signalizačná kaskáda. TGF- β sa viaže na komplex receptorov Eng/TGF β RII/ALK-5 alebo na Eng/TGF β RII/ALK-1. Aktivácia ALK vedie k fosforylácii transkripčných faktorov Smad1 (u ALK-1) a Smad2/3 (u ALK-5). Následne fosforylované proteíny vytvárajú komplex s mediátorovým Smad4. Tento komplex vstupuje do jadra, kde riadi transkripciu konkrétnych génov. Signalizačná kaskáda ALK-1/Smad1/5 vedie k aktivácii endotelových buniek (activated ECs), zatiaľ čo aktivácia ALK-5/Smad2/3 utlmuje činnosť endotelových buniek (Quiescent ECs).

Prevzatý a upravený z: TGF beta signaling at the summit [50].

2.3.4 Endoglín a endotelová dysfunkcia

Ako už bolo popísané vyššie, NO je dôležitým vazodilatátorom a je syntetizovaný enzýmom eNOS. Viaceré *in vivo* a *in vitro* štúdie dokazujú spojitosť medzi Eng a eNOS [41]. Eng prostredníctvom vplyvu na proteínové hladiny Smad2/3 ovplyvňuje aj expresiu a stabilitu eNOS [45]. Pri zníženej hladine Eng, teda dochádza k nedostatočnej produkcii NO, čo môže viesť k ED [11]. Naopak, pri aktivácii signálnej dráhy Eng/ALK-5/Smad2/3 dochádza k syntéze eNOS a následnej ochrane endotelu, protizápalovému pôsobeniu spôsobenému inhibíciou NF- κ B a tvorbe kolagénu, ktorá vedie k stabilizácii aterosklerotického plátu (viď obrázok 5) [41, 51].

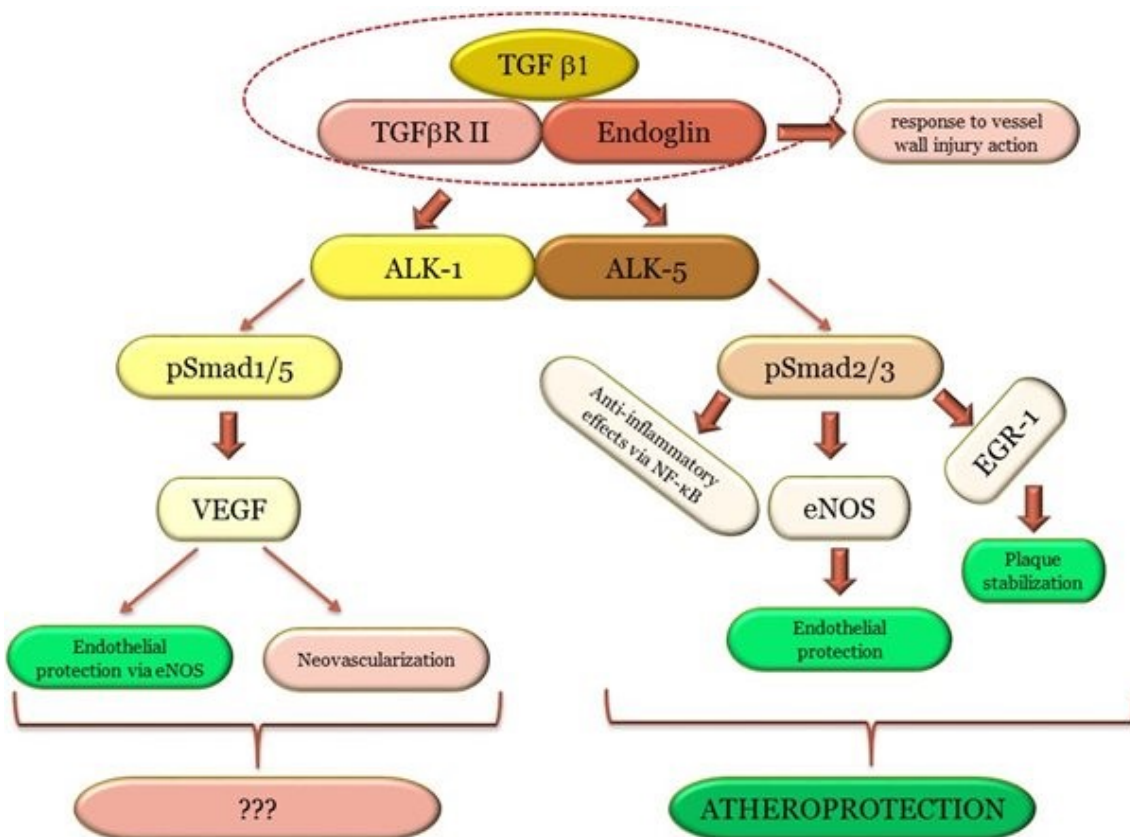
V súčasnosti stále nie je úplne jasné, či Eng pôsobí aterogénne alebo antiaterogénne. Piao et al. zistili, že v normálnych artériách bola expresia Eng znížená, zatiaľ čo v ateroskleroticky poškodených cievach bola expresia Eng zvýšená. Taktiež preukázali zvýšenú expresiu Eng v makrofágoch, hladkosvalových bunkách a endotelových bunkách v skorých štádiách aterosklerózy [41]. Podobne, Vicen et al. ukázali, že pri premedikácii ľudských aortálnych endotelových buniek 7-ketocholesterolom, ktorý simuluje efekt oxLDL, dochádza k zvýšenej expresii Eng, eNOS a ďalších biomarkerov ED (ICAM-1, P/E-selektín). Na druhej strane, chronická hypercholesterolémia *in vivo* vyvolala zníženie expresie Eng a eNOS. Súčasne dochádzalo k zníženiu produkcie NO, indukcií zápalu, a zvýšeniu plazmatických hladín sEng [8].

Endoglín zohráva významnú úlohu pri prestupe leukocytov z krvi do subendotelovej vrstvy. Integríny na povrchu krvných buniek sa viažu na tripeptid prítomný na extracelulárnej časti Eng a tak dochádza k transmigrácii leukocytov cez endotel pri akútnej fáze zápalu [8, 12].

Vzťah medzi Eng a hyperglykémiou zatiaľ nebol dopodrobna preštudovaný. Existuje niekoľko štúdií, ktoré poukazujú na určitú súvislosť. Alvarez-Munoz et al. pozorovali expresiu Eng u pacientov s ochorením diabetes mellitus 1. typu s diabetickou nefropatiou a bez nej. Táto štúdia ukázala zvýšené hladiny expresie Eng u pacientov s nižším rizikom nefropatie, v porovnaní s pacientmi s vysokým rizikom rozvoja nefropatie. V štúdií *in vitro* kde boli bunky vystavené vysokým hladinám glukózy (25 mmol/l) alebo oscilujúcim hladinám glukózy sa preukázala zvýšená mRNA expresia Eng, HIF-1 α a KLF-6. Obezita vyvoláva rozvoj inzulínovej rezistencie, ktorá sa podieľa

na vzniku diabetu mellitus 2. typu (diabetes mellitus type 2, DM2). Štúdie poukázali na signifikantný nárast v expresii Eng v tukovom tkanive u obéznych myší v porovnaní s chudými myšami [45].

Obrázok 5: Funkcia endoglinu pri ateroskleróze



Obrázok zobrazuje dve TGF- β signalizačné dráhy. Pri aktivácii ALK-1/Smad1/5, dochádza k zvýšenej tvorbe VEGF. Ten sa podieľa na neovaskularizácii (neovascularization) a ochrane endotelu prostredníctvom eNOS (endothelial protection via eNOS). V druhom prípade sa aktivuje signalizačná kaskáda ALK-5/Smad2/3, ktorá má viaceré účinky. Jednak má protizápalový účinok sprostredkovaný NF- κ B (anti-inflammatory effects via NF- κ B), zvyšuje produkciu eNOS, ktorý sa posieľa na ochrane endotelu (endothelial protection) a proteínu skoršej rastovej odozvy (early growth response protein 1, EGR-1), ktorý stabilizuje aterosklerotický plát (plaque stabilization). Predpokladá sa, že aktivácia ALK-5/Smad2/3 signálne kaskády má ateroprotektívny charakter (atheroprotection).

Prevzatý z : *The role of endoglin in atherosclerosis* [41].

2.3.5 Solubilný endoglin

Solubilný endoglin (sEng) vzniká odštiepením NH₂-konca extracelulárnej časti membránového Eng. Väzba je proteolyticky štiepená matrixovou metaloproteinázou 12 alebo 14 (matrix metalloproteinase, MMP-12, MMP-14) a po odštiepení dochádza k uvoľneniu sEng do krvného riečiska (viď obrázok 6) [44].

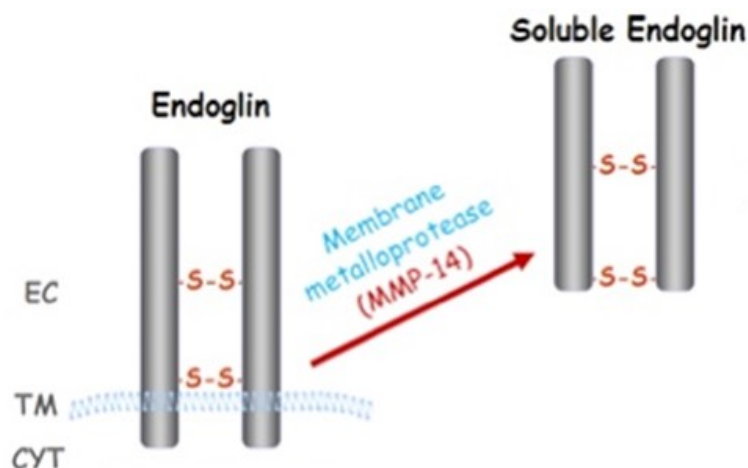
sEng sa používa ako biomarker kardiometabolických ochorení, ako napríklad DM2, preeklampsia, hypercholesterolémia, arteriálna hypertenzia a ďalšie [44, 52].

sEng má v TGF- β signalizácii opačné účinky ako membránový Eng. sEng viaže molekuly TGF- β 1, BMP-9 a BMP-10 v plazme, čím znemožňuje ich väzbu na príslušný TGF- β receptor [53, 54]. Keďže nedochádza k naviazaniu ligandov na receptor, nedochádza ani k aktivácii signalizačnej kaskády vedúcej k tvorbe eNOS a následnej produkcii NO, čo môže vyústiť v rozvoj ED [55].

Pri DM2, ktorý je významným rizikovým faktorom kardiovaskulárnych ochorení, boli pozorované zvýšené hladiny sEng v plazme. Hladiny sEng boli zvýšené nie len pri hyperglykémii ale aj pri hypoglykémii. Nárast týchto hladín je vysvetľovaný tým, že v oboch prípadoch dochádza k tvorbe oxidatívneho stresu [56].

sEng sa uplatňuje aj pri rozvoji arteriálnej hypertenzie. Zistilo sa, že hladiny sEng odpovedajú systolickému tlaku krvi a hypertrofii ľavej komory. Nakoľko sEng znižuje množstvo NO, nedochádza k dostatočnej vazodilatácii ciev a teda prevláda zvýšená cievna rezistencia. To má za následok vznik a progresiu arteriálnej hypertenzie [45].

Obrázok 6: Vznik solubilného endoglinu



Obrázok zobrazuje vznik sEng. Na ľavej strane je zobrazený membránový Eng, ktorý je štiepený matrixovou metaloproteinázou 14 (MMP-14). Po rozštípení väzby dochádza k uvoľneniu sEng (soluble endoglin), ktorý sa používa ako biomarker pri rôznych kardiometabolických ochoreniach.

Prevzatý a upravený z: *Atlas of Geneticss and Cytogenetics in Oncology and Haematology- Endoglin [online]*

Dostupný na: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ENG.html [2021-13-03].

2.4 Transkripčné faktory regulujúce expresiu endoglinu

Úlohou transkripčných faktorov je kontrola génovej expresie. Ich aktivita určuje funkciu buniek a ich reakciu na vnútorné a vonkajšie stimuly [57]. Jedná sa o proteíny, schopné viazať sa na špecifické sekvencie DNA a tým regulovať transkripciu určitých génov [58].

2.4.1 Krüppel-like Factor 6

Krüppel-like Factor 6 (KLF6), tiež známy aj ako Zinc-finger transcription factor-9 (ZF9), je transkripčný faktor, ktorý má vo svojej štruktúre naviazaný zinok na dva cysteínové a dva histidínové zvyšky a tak vytvára tzv. zinc finger (zinkový prst) [59]. KLF6 obsahuje 3 zinc fingers na C-konci svojej štruktúry, ktorými sa špecificky viaže na GC-box promotora cieľového génu [60].

KLF6 je primárne exprimovaný v placente, srdci, pľúcach, obličkách, ale aj v endotelových bunkách a v pečeni [59]. Riadi dôležité procesy buniek ako je vývoj, proliferácia, diferenciácia a programovaná bunková smrť [61].

Vďaka spolupráci medzi KLF6 a špecifickým proteínom 1 (specific protein 1, Sp1) dochádza k aktivácii génov ako sú: TGF- β , receptory pre TGF- β (T β RI, T β RII, Eng), urokinázový typ plazminogénového aktivátora (urokinase plasminogen activator, uPA) a kolagén I. K aktivácii týchto génov dochádza najmä pri poškodení tkanív a ciev [62].

KLF6 ďalej prispieva k rozvoju zápalových procesov prostredníctvom aktivácie NF- κ B a zároveň riadi expresiu a funkciu HIF-1 α v makrofágoch [63].

2.4.2 Nukleárny faktor kappa B

Nukleárny faktor kappa B (NF- κ B) je skupina štruktúrne podobných transkripčných faktorov, ktoré sa významne uplatňujú v biologických procesoch vrátane vývoja, zápalu a imunity [63]. Rodina NF- κ B sa skladá z proteínov: p65(RelA), RelB, c-Rel, p50 a p52 [64]. Všetky tieto proteíny obsahujú vo svojej štruktúre Rel-homológnu doménu na N-terminálnom konci, pomocou ktorej sa viažu na DNA. Avšak len p65, RelB a c-Rel obsahujú na C-terminálnom konci aj transkripčnú aktivačnú doménu. Ako už bolo spomínané, zvýšená expresia KLF6 podporuje aktiváciu NF- κ B, a to tak že KLF6 v jadre interaguje s p65 a tento komplex sa potom viaže na promotor génu [63].

NF- κ B proteíny sa v cytoplazme nachádzajú ako neaktívne dimery, nakoľko sú spojené s inhibítorom kappa B (I κ B). Po aktivácii bunky dôjde k oddeleniu I κ B od NF- κ B diméru a následne NF- κ B môže prechádzať do jadra bunky, kde sa viaže na

promotor génov [65]. NF- κ B priamo ovplyvňuje expresiu HIF-1 α naviazaním sa na podjednotky jeho promotora [66].

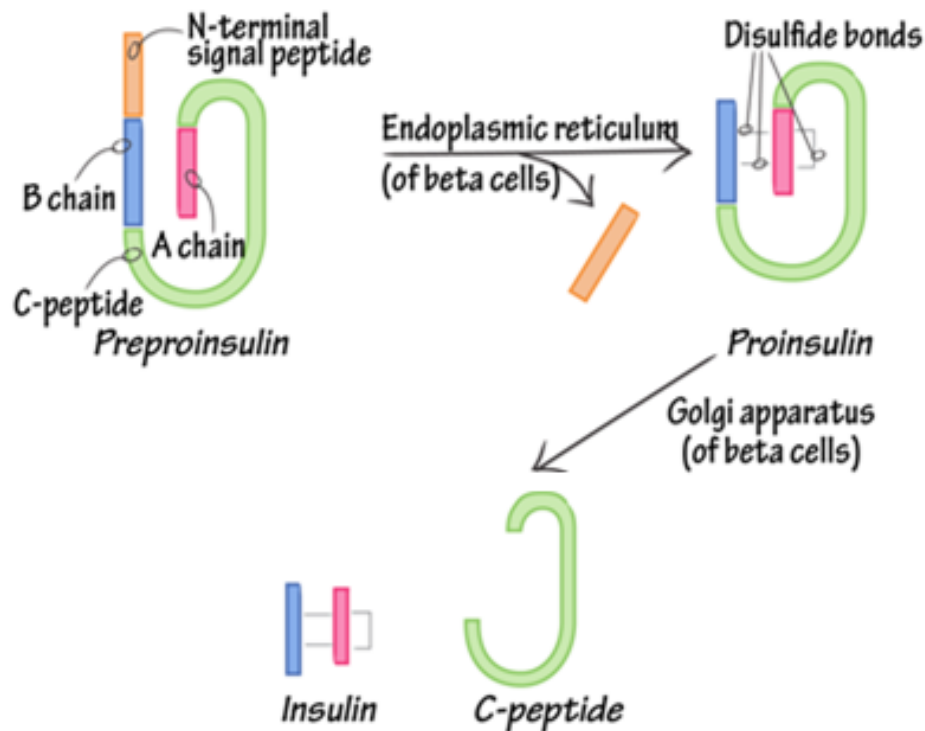
2.5 Diabetes mellitus

2.5.1 Definícia

Diabetes mellitus (DM) je metabolické a endokrinné ochorenie spojené s chronickou hyperglykémiou a glykosúriou. Zvýšené hladiny cukru v krvi sú spôsobené buď absolútnym alebo relatívnym nedostatkom inzulínu [67]. Absolútny nedostatok inzulínu je charakteristický pre diabetes mellitus 1. typu (DM1), vyvolaný deštrukciou β -buniek Langerhansových ostrovčekov pankreasu. Relatívny nedostatok inzulínu je zapríčinený inzulínovou rezistenciou typickou pre diabetes mellitus 2. typu (DM2) [68].

Inzulín je polypeptid, ktorý je syntetizovaný v pankreatických bunkách ako preproinzulín. Po odštiepení 24 aminokyselín vznikne proinzulín, ktorý v endoplazmatickom retikule vytvorí konformáciu spojenú tromi disulfidickými mostíkmi (viď obrázok 7). Pomocou endopeptidázy je proinzulín štiepený na dvoch miestach. Dôjde k uvoľneniu C-peptidu a aktívneho inzulínu, zloženého z dvoch reťazcov spojených disulfidickými mostíkmi. Reťazec A má 21 aminokyselín a reťazec B je zložený z 30 aminokyselín. Takto vytvorený inzulín je skladovaný v β -bunkách pankreasu [69].

Obrázok 7: Syntéza inzulínu



Obrázok popisuje vznik inzulínu. Preproinzulín sa skladá zo 4 častí. N-terminálny signálny peptid (*N-terminal signal peptide*), B-reťazec (*B-chain*), C-peptid (*C-peptide*) a A-reťazec (*A-chain*). V endoplazmatickom retikule β -buniek pankreasu (*endoplasmatickum of beta cells*) nastane odštiepenie N-terminálneho signálneho peptidu. Vytvorením disulfidických väzieb sa vytvorí proinzulín. V Golgiho aparáte β -buniek pankreasu (*Golgi apparatus of beta cells*) sa proinzulín štiepi na 2 miestach za vzniku C-peptidu a inzulínu.

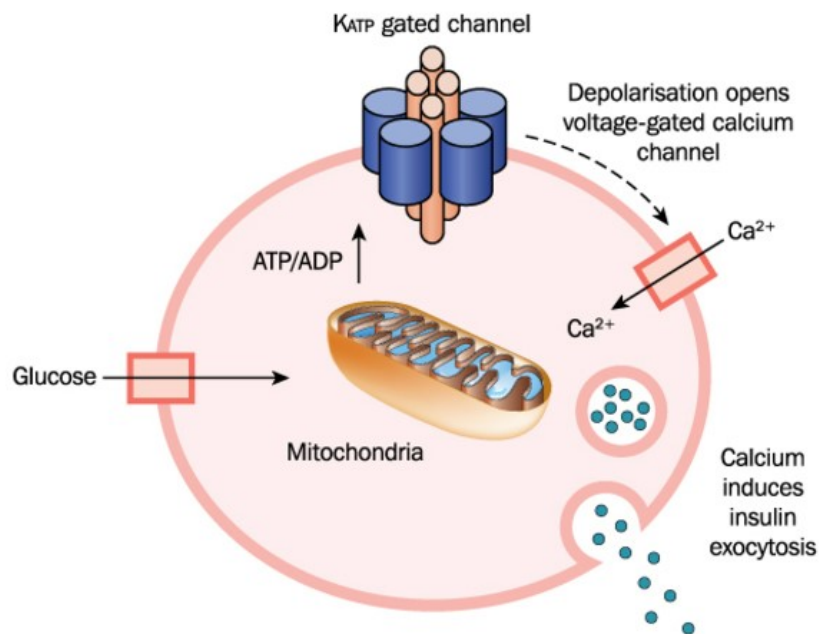
Prevzatý a upravený z: *MICROSCOPIA IWM – Human insulin production [online]*

Dostupný na: <https://microscopiaiwm.com/2020/11/17/human-insulin-production/> [2021-20-03].

Pankreas vylučuje inzulín kontinuálne v malých množstvách, čím udržiava bazálne hladiny cukru v krvi. Avšak po príjme potravy je nutné náhle zníženie hladín glukózy v krvi a vtedy sa uplatňuje stimulovaná sekrécia inzulínu [67]. Na membráne pankreatických β -buniek sa nachádzajú transportéry pre glukózu GLUT-1 [70, 71]. Prostredníctvom transportérov sa dostane glukóza do bunky, kde je fosforylovaná

glukokinázou na glukózu-6-fosfát (vid' obrázok 8). Po metabolizme glukózy sa zvýši koncentrácia ATP, ktorá vyvolá uzatvorenie ATP-senzitívneho K^+ kanálu. Tým sa zníži eflux K^+ a dochádza k depolarizácii membrány [71]. Depolarizáciou sa otvárajú Ca^{2+} kanály, ktorými prúdi Ca^{2+} do buniek a ten spôsobí uvoľnenie inzulínu do plazmy exocytózou [72].

Obrázok 8: Uvoľnenie inzulínu z pankreasu



Obrázok zobrazuje uvoľnenie inzulínu z pankreatických buniek. Po vstupe glukózy (glucose) do bunky dochádza k jej metabolizmu v mitochondrii za vzniku ATP. Zvýšenie ATP vedie k zablokovaniu K^+ kanálu závislého na ATP (K_{ATP} gated channel), čo povedie k nárastu K^+ vo vnútri bunky. To vyvolá depolarizáciu membrány, ktorou sa otvoria napäťovo riadené Ca^{2+} kanály. Vápnik sa dostane do bunky a spôsobí uvoľnenie inzulínu z buniek exocytózou (Calcium induces insulin exocytosis).

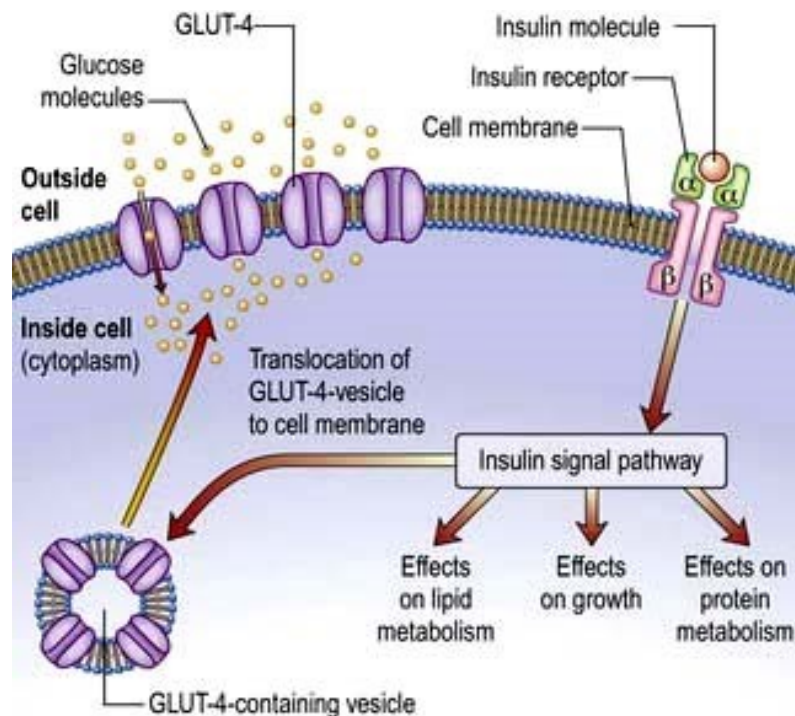
Prevzatý z: Medline Plus- Type 2 diabetes [online] Dostupný na:

<https://medlineplus.gov/genetics/condition/type-2-diabetes/#causes> [2021-01-04].

Účinok inzulínu v bunkách je sprostredkovaný prostredníctvom väzby na inzulínový receptor. Receptor sa skladá z dvoch α a dvoch β podjednotiek. Inzulín sa viaže na α podjednotky a vyvolá autofosforyláciu β podjednotiek [73]. To umožní

aktiváciu fosforylácie intracelulárnych druhých poslov, známych ako substráty inzulínového receptora (insulin receptor substrate, IRS). IRS sa viažu na ďalšie signálne molekuly, ktoré sprostredkovávajú účinky inzulínu v bunkách. Enzým fosfatidylinositol-3-kináza (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) podporuje translokáciu glukózových transportérov do membrány bunky, kde následne zabezpečujú vstup glukózy do bunky, napríklad GLUT-4 v adipocytoch a bunkách hladkého svalstva (viď obrázok 9) [74].

Obrázok 9: Inzulínová signalizácia



Obrázok popisuje inzulínovú signalizáciu. Po naviazaní inzulínu (insulin molecule) na inzulínový receptor (insulin receptor) zložený z α a β podjednotiek sa spustí inzulínová signalizácia, ktorá pôsobí na metabolizmus proteínov (effects on protein metabolism), lipidov (effects on lipid metabolism) a na rast buniek (effects on growth). Taktiež aktivuje translokáciu GLUT-4 transportérov do bunkovej membrány (translocation of GLUT-4 vesicle to cell membrane) a tým sa zvýši množstvo glukózy (glucose molecule) prechádzajúcej do bunky.

Prevzatý z: *Diabetes mellitus and other disorders of metabolism [online]* Dostupný na: <https://clinicalgate.com/diabetes-mellitus-and-other-disorders-of-metabolism/> [2021-04-03].

Stanovenie diagnózy DM je založené na stanovení hodnôt glykémie zo žilnej plazmy u pacientov po minimálne 8 hodinovom lačnení, alebo pomocou orálneho glukózového tolerančného testu (oGTT). Pri oGTT je podaných pacientovi 75g glukózy rozpustených v 250 ml vody po nočnom lačnení. Krv sa odoberá tesne pred vypitím glukózového roztoku a následne v 120. minúte po jeho vypití [67]. Normálne hodnoty glykémie stanovenej nalačno minimálne po 8 hodinovom lačnení, by mali byť v rozpätí 3,9-5,5 mmol/l a v prípade orálneho glukózového tolerančného testu (oGTT) by mali byť hodnoty glykémie v 120. minúte oGTT menšie ako 7,8 mmol/l. V prípade DM sú hodnoty glykémie nalačno rovné alebo väčšie ako 7,0 mmol/l, v 120. minúte oGTT rovné alebo väčšie ako 11,1 mmol/l. Stanovenie diagnózy môže byť založené aj na manifestácii typických príznakov DM a náhodne zmeranej glykémii, ktorej hodnota je rovná alebo väčšia ako 11,1 mmol/l. Stav mierne zvýšených hodnôt glykémie sa nazýva prediabetes. Hodnoty glykémie nalačno sa pohybujú v rozmedzí 5,6-6,9 mmol/l a v 120. minúte oGTT sú hodnoty medzi 7,8-11,0 mmol/l [75] (viď tabuľka 1).

Tabuľka 1: Hodnoty glykémie

Glykémia (mmol/l)	nalačno	V 120. minúte oGTT
Norma	3,9-5,5	< 7,8
Prediabetes	5,6-6,9	7,8-11,0
DM	≥ 7,0	≥ 11,1

2.5.2 Typy DM

Medzi základné typy DM patrí DM1, DM2, gestačný DM, DM vyvolaný liečivami ako sú napríklad glukokortikoidy alebo neuroleptiká. Ďalej existujú aj špeciálne formy DM ako napríklad MODY – (Maturity-Onset Diabetes of the Young) a LADA – (Latent Autoimmune Diabetes of Adults) [76].

2.5.2.1 *DM 1. typu*

DM1, nazývaný aj inzulín-dependentný DM, patrí medzi ochorenia s autoimunitnou etiológiou [67, 77]. Prejaviť sa môže v každom veku, avšak najčastejšie dochádza k prejavom už v detstve [76].

Existujú 2 podtypy DM1. Vo väčšine prípadov sa jedná o tzv. imunitne podmienený DM, ktorý vykazuje pozitivitu na autoprotilátky, zatiaľ čo druhý podtyp, idiopatický DM, je na autoprotilátky negatívny [2].

Pri DM1 dochádza k zničeniu β -buniek Langerhansových ostrovčiek pankreasu, ktorých hlavnou funkciou je tvorba inzulínu. Deštrukcia buniek je sprostredkovaná T-bunkami imunitného systému a makrofágmi, ktoré prechádzajú do pankreasu [78]. V krvi diabetikov môžeme detekovať protilátky proti glutamát oxidáze (anti GAD) a protilátky proti tyrozín fosfatáze 1A-2 a 1A-2 β aj mesiace predtým ako dôjde ku klinickej manifestácii ochorenia [2, 68].

DM1 vzniká najčastejšie pri súčinnosti genetických faktorov a faktorov životného prostredia [77]. Z dedičných faktorov vzniku DM1 je významný human leukocyte antigen (HLA) systém, najmä HLA-B8 a HLA-DR3. Avšak jeho prítomnosť nemusí nutne indikovať DM u pacienta, ale zvyšuje jeho pravdepodobnosť výskytu [67]. Medzi faktory životného prostredia (získané faktory) patria predovšetkým vírusy, ako napríklad enterovírusy, rotavírusy a vírus rubeoly [78]. K zvýšenému poškodeniu pankreasu vírusovými infekciami prispievajú niektoré HLA antigény. Vírusové antigény spôsobujú tvorbu protilátok Langerhansovými ostrovčkami, ktoré deštruujú β -bunky [67].

Poškodením týchto buniek sa znižuje schopnosť organizmu regulovať hladiny glukózy v tele, čo sa môže prejavovať jednak ako ketoacidóza alebo ako ťažká hypoglykémia [77]. Nedostatok inzulínu vedie k zvýšenému rozkladu tukov a taktiež narúša metabolizmus proteínov. Hlavným prejavom DM1 je hyperglykémia. Vzniká pri porušenom transporte glukózy do pečenej a hladkosvalových buniek. Pri DM1 je porušená resorpcia glukózy v ľadvinách, ktorá sa prejavuje u pacientov glykosúriou. Glukóza je osmoticky aktívnou molekulou, preto spolu s glykosúriou dochádza aj k zvýšenému močeniu a dehydratácií. Zvýšením katabolizmu tukov dochádza k zvýšenej

oxidácii mastných kyselín a tým sa zvyšuje koncentrácia ketolátok v krvi a v moči [68]. U detí a adolescentov je práve ketoacidóza jedným z prvých príznakov diabetu [2].

2.5.2.2 *DM 2. typu*

DM2, tiež nazývaný aj non-inzulín dependentný, sa prejavuje až u 90% všetkých pacientov s diagnostikovaným DM [67, 79]. Pre typ DM2 je typická inzulínová rezistencia a relatívny nedostatok inzulínu [80].

Pri inzulínovej rezistencii sa produkuje určité množstvo inzulínu, avšak bunky majú zníženú citlivosť na účinky inzulínu. Telo na tento stav reaguje zvýšenou tvorbou inzulínu a vzniká hyperinzulinémia. Zvýšená koncentrácia inzulínu potlačí inzulínovú rezistenciu a tak v organizme nastane normoglykémia [68, 81]. Táto kompenzácia však nie je dlhodobo udržateľná. V určitom bode pankreas už nedokáže syntetizovať dostatočné množstvo inzulínu, čo sa prejaví hyperglykémiou [68].

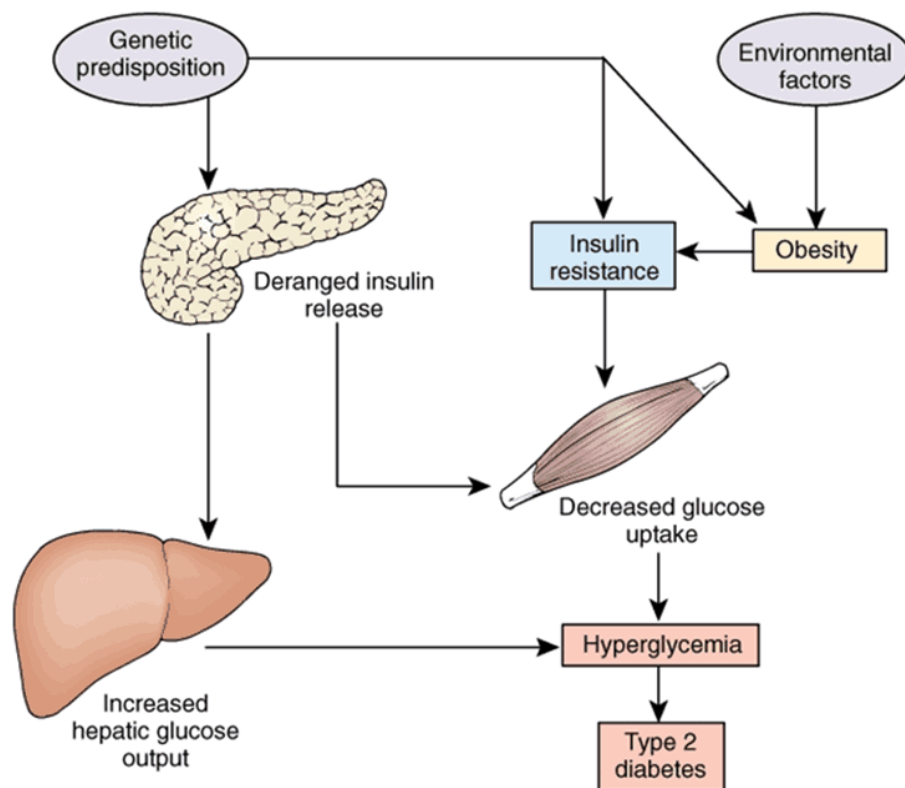
Pre vznik DM2 sú významné nie len dedičné (neovplyvniteľné) rizikové faktory, ako sú vek či pohlavie, ale aj ovplyvniteľné, ako je napríklad obezita, ktorá je príčinou až u 80% prípadov (viď obrázok 10). Ďalšími faktormi sú tiež nízka fyzická aktivita a poruchy výživy [67, 79]. DM2 súvisí aj s ďalšími metabolickými poruchami ako je hypertriacylglycerolémia, inzulínová rezistencia a arteriálna hypertenzia [71]. Spoločne sa tieto metabolické poruchy nazývajú ako metabolický syndróm (syndróm X). Na stanovenie diagnózy metabolického syndrómu pacient musí spĺňať aspoň 3 z 5 príznakov v nasledujúcej tabuľke 2 [74].

Tabuľka 2: Diagnostické kritériá metabolického syndrómu

	muži	ženy
Abdominálna obezita: Obvod pásu	> 102 cm	> 88 cm
Zvýšená glykémia nalačno	$\geq 6,1 < 7$ mmol/l	
Zvýšený krvný tlak	$\geq 130/80$ mmHg	
Zvýšené triacylglyceroly	> 1,7 mmol/l	
Znížený HDL cholesterol	< 1,0 mmol/l	< 1,3 mmol/l

Prvé príznaky DM2 sú často prehliadané a tak je pacient často diagnostikovaný až v pokročilých fázach ochorenia [2]. DM2 sa často prejavuje až mikrovaskulárnymi komplikáciami ako nefropatia či diabetická retinopatia [71]. Podobne ako pri DM1, aj u DM2 sa vyskytujú symptómy ako je polyúria, glykosúria, polydipsia a únava. K diagnóze často dochádza pri preventívnom vyšetří, kde sa zistí prítomnosť glukózy v moči [67].

Obrázok 10: Patofyziológia DM2



Obrázok zobrazuje patofyziológiu DM2. Na vzniku DM2 sa podieľajú genetické predispozície (*genetic predisposition*), ale aj faktory prostredia (*environmental factors*). Faktory prostredia sa podieľajú na vzniku obezity (*obesity*) u pacientov, čo vyvoláva rozvoj inzulinovej rezistencie (*insuline resistance*). Genetická predispozícia, často vedie k narušeniu uvoľňovania inzulínu (*deranged insuline release*) z pankreasu, čím sa znižuje aj vstup glukózy do svalových buniek (*decreased glucose uptake*), na čom sa ale

podieľa aj inzulínová rezistencia. Zvýšené uvoľňovanie glukózy pečeňou spoločne s nedostatočným vstupom glukózy do buniek vyvolá nárast glykémie (hyperglycemia) v krvi a to vedie k vzniku DM2 (type 2 diabetes).

Prevzatý a upravený z: Nurseslabs- Diabetes Mellitus [online] Dostupný na: <https://nurseslabs.com/diabetes-mellitus/> [2021-04-20].

2.5.3 Hyperglykémia a jej vplyv na patogenézu diabetu mellitus a vzťah k endotelovej dysfunkcii

Pri hyperglykémii vznikajú produkty pokročilej glykácie (advanced glycation end products, AGEs) [32]. AGEs sa viažu na špecifické povrchové receptory, nachádzajúce sa na monocytoch, makrofágoch a hladkých svaloch ciev, ktoré iniciujú uvoľnenie IL-1 a TNF [32, 71]. Tieto cytokíny majú účinok na bunky cievneho endotelu a vyvolávajú zvýšenú cievnu priepustnosť, oxidatívny stres a zápal [32]. V endotelových bunkách je zdrojom oxidatívneho stresu predovšetkým NADPH oxidáza a xantín oxidáza, ktorých aktivita je pri DM zvýšená [1]. Vplyv hyperglykémie na rozvoj DM pozorujeme hlavne pri jeho chronických komplikáciách, ktoré súvisia s mikro a makrovaskulárnymi poškodeniami [71].

2.5.3.1 Mikrovaskulárne poškodenia

Charakteristickým rysom pri mikroangiopatii je zhrubnutie bazálnej membrány s ukladaním glykoproteínov v cievnej stene. Výskyt mikroangiopatií sa najmä pri DM1 časom zvyšuje. Môže postihovať všetky kapiláry, ale predovšetkým kapiláry nachádzajúce sa v retine a ľadvinových glomeruloch [67].

Najzávažnejším prejavom očnej mikroangiopatie je diabetická retinopatia. Jej výskyt je častejší u pacientov trpiacich DM1 a je jednou z najčastejších príčin slepoty v dospelosti. Retinopatiu často sprevádza proteínúria, ktorá je znakom diabetickej nefropatie. Pri diabetickej nefropatii (glomeruloskleróze), dochádza predovšetkým k poškodeniu kapilár glomerulov. Okrem zhrubnutia bazálnej membrány kapilár dochádza aj k hyalinizácii interkapilárneho spojiva glomerulov [67].

Ďalším dôsledkom hyperglykémie je tzv. „diabetická noha“. Pri diabetickej nohe sa spájajú mikrovaskulárne, makrovaskulárne a periférne neuropatické zmeny [67]. Na nohe sú poškodené najmä periférne cievy. Klasifikácia diabetickej nohy podľa Wagnera má 5 stupňov. V začiatkoch sa prejavuje len zníženou citlivosťou a suchou kožou, ale v ďalších stupňoch sa problémy zhoršujú, vznikajú abscesy, lokalizované gangrény a môže to viesť až ku gangréne celej nohy [67].

2.5.3.2 Makrovaskulárne poškodenia

Makrovaskulárne poškodenia pri DM môžu vyústiť v aterosklerózu. Avšak na vzniku aterosklerózy sa podieľa viacero mechanizmov ako sú hypertenzia, hypertriglyceridémia, hyperglykémia a ďalšie cievne zmeny.

Hyperglykémia sa viacerými heterogénnymi mechanizmami podieľa aj na vzniku ED. Počas DM dochádza k poškodeniu endotelu zníženou aktivitou eNOS a zvýšenou produkciou ROS, ktoré vedú k zníženiu biologickej dostupnosti NO a vaskulárnym zmenám. Pri DM je prítomný bazálny prozápalový stav, ktorý spája endotelovú dysfunkciu so zvýšenou agregáciou krvných doštičiek. Zvyšuje sa množstvo adhézných molekúl, vWF, CRP a TNF- α , ktoré ďalej podporujú zhukovanie doštičiek [1].

Inzulínová rezistencia je sprevádzaná zníženými hladinami tetrahydrobiopterínu, ktorý je kofaktorom eNOS a taktiež je inhibovaná stimulácia eNOS, prostredníctvom PI3K. Pri inzulínovej rezistencii sa zvyšujú aj hladiny voľných mastných kyselín, ktoré sa podieľajú na zníženej aktivite eNOS a tým zníženej syntéze NO. Pri inzulínovej rezistencii nastáva dočasne hyperinzulinémia, ktorá súvisí so zvýšením hladín prokoagulačných faktorov. Inzulín podporuje tvorbu ET-1, ktorý pôsobí vazokonstrikčne [74].

Pri inzulínovej rezistencii sa zvyšuje aj tok voľných mastných kyselín v pečeni a dochádza k produkcii lipoproteínov o veľmi nízkej hustote (very low density lipoprotein, VLDL). Tukové tkanivo produkuje okrem voľných mastných kyselín (FFA) aj cytokíny, ktoré ovplyvňujú inzulínovú rezistenciu. Medzi tieto cytokíny patria IL-6, TNF- α , inhibítor aktivátoru plazminogénu 1 (PAI-1). Často sú spojované s porušením inzulínovej signalizácie, lipolýzy a endotelovej funkcie [74].

2.6 Carotuximab

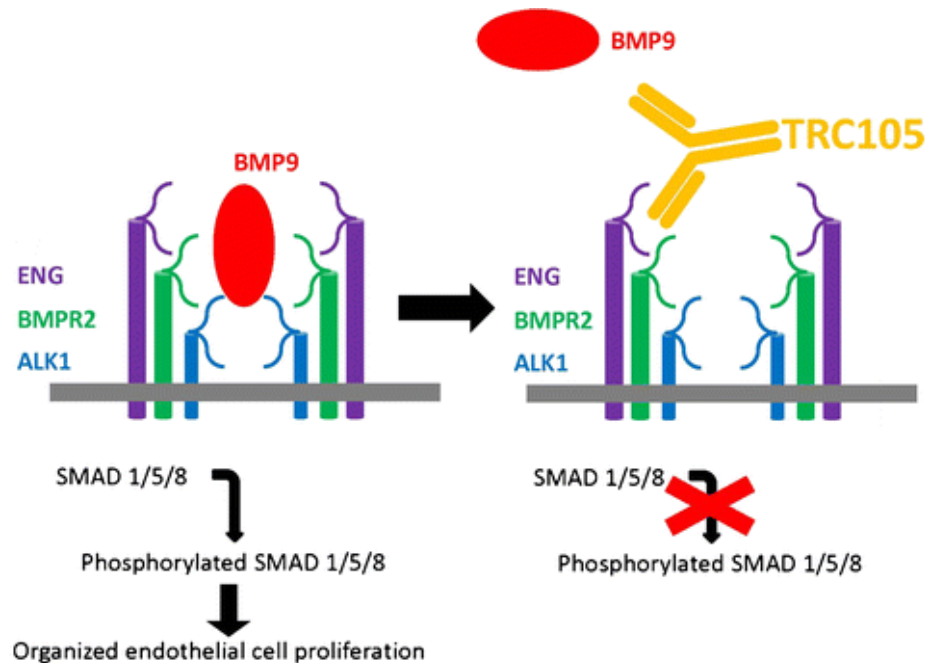
Carotuximab (TRC105) je humanizovaná chimérická IgG1 monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na Eng [13, 82]. Táto monoklonálna protilátka bola vyvinutá spoločnosťou Tracon Pharmaceuticals Inc na použitie v onkológií [83].

2.6.1 Mechanizmus účinku

Eng, ako už bolo vyššie spomínané, je koreceptor TGF- β signalizačnej dráhy. Jeho úlohou je prezentovanie cytokínov ako sú TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-9 či BMP-10 TGF- β receptorom [84, 85].

TRC105 inhibuje viacerými mechanizmami angiogézu, ktorá je nevyhnutná pri fyziologickej, ale aj pri nádorovej tvorbe ciev. Jedným z mechanizmov je priama väzba TRC105 na Eng. Po naviazaní TRC105 na Eng sa zníži možnosť naviazania BMP-9, a tým nedôjde k aktivácii Smad1/5/8 signalizačnej kaskády, ktorá za fyziologických podmienok spôsobuje proliferáciu endotelových buniek (viď obrázok 11). Môže sa ale aktivovať Smad 2/3 signalizačná kaskáda, ktorá bráni angiogéze. Druhou možnosťou pôsobenia je spojenie membránového Eng s enzýmom MMP-14, ktorý štiepi Eng. Vyvolá to zníženie množstva membránového Eng a vznik sEng, ktorý má antiangiogénne účinky [15].

Obrázok 11: Mechanizmus účinku TRC105



Obrázok popisuje pôsobenie TRC105 na receptorový komplex. Na ľavej strane je zobrazená endoglinom (ENG) sprostredkovaná fyziologická kaskáda, ktorá vedie k proliferácii endotelových buniek (organized endothelial cell proliferation). Kostný morfogenetický proteín 9 (bone morphogenic protein, BMP9) sa viaže na receptorový komplex zložený z endoglínu (ENG), BMP receptoru 2 (BMPR2) a aktivínu podobnej receptorovej kinázy 1 (activine like receptor kinase 1, ALK1). Táto väzba vyvolá fosforyláciu SMAD1/5/8 (phosphorylated SMAD1/5/8), ktorá vedie k expresii génov potrebných na proliferáciu endotelových buniek. Avšak ak dôjde k naviazaniu TRC105 na ENG, BMP9 sa už nemôže naviazať na receptorový komplex a tým nedôjde k aktivácii tejto signálizačnej kaskády. Inhibuje sa tvorba a dozrievanie endotelových buniek a angiogéza, ktorá je kľúčová pri raste nádorov a ich metastáz.

Prevzatý a upravený: *Endoglin for Targeted Cancer Treatment* [86].

2.6.2 Klinické použitie

Tracon Pharmaceuticals Inc pôvodne vyvíjala carotuximab (TRC105) na použitie v onkológii, napríklad na liečbu rakoviny pľúc, angiosarkómu alebo karcinómu renálnych buniek. Doteraz prebehlo 24 klinických štúdií, ktoré sledovali bezpečnosť

a účinnosť používania TRC105 v spomínaných indikáciach. Tieto štúdie sledovali účinok TRC105 v monoterapii, ale aj v kombinácii s inhibítormi VEGF alebo chemoterapiou. Avšak po ukončení 3. fázy klinického skúšania v štúdiu TAPPAS sa nepreukázala klinicky významná účinnosť TRC105 u pacientov, a tak sa Tracoon Pharmaceuticals Inc rozhodli v štúdiu ďalej nepokračovať [14, 87].

Farmaceutická firma Santen ale pokračuje pri vývoji carotuximabu (DE-122) na liečbu vlhkej formy vekovom podmienenej degenerácie makuly, v ktorej by mohlo mať použitie carotuximabu väčší prínos ako v onkológii. Aj v tomto prípade sa uplatňujú antiangiogénne a antifibrinogénne účinky spôsobené inhibíciou Eng. Zatiaľ je DE-122 v druhej fáze randomizovanej štúdie AVANTE, kde sa hodnotí jeho účinnosť a bezpečnosť v kombinácii s inhibítormi VEGF [14].

2.7 PCR – základné princípy

Polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction, PCR) je jednoduchá, veľmi citlivá, enzymatická metóda, ktorá umožňuje amplifikáciu nie len jednovláknovej alebo dvojitovláknovej DNA, ale aj RNA. Veľkou výhodou PCR je, že postačujú aj veľmi malé množstvá počiatočnej DNA na vytvorenie veľkého množstva kópií [88, 89].

Jej spektrum využitia je veľmi rozsiahle. Používa sa napríklad pri molekulárnom klonovaní, sekvenovaní DNA, analýze zmien génovej expresie v nádoroch a mikroorganizmoch či stanovovaní infekčného agens [88, 90].

Na PCR sú nevyhnutné nasledujúce zložky:

1. DNA polymeráza - v súčasnosti sa využívajú termostabilné DNA polymerázy, ktoré katalyzujú syntézu DNA. Najviac používaná je tzv. Taq polymeráza, ktorá bola pôvodne získaná z termostabilnej baktérie *Thermus aquaticus*.
2. Primer - je dôležitou zložkou pre špecificitu reakcie. Primery sú krátke, jednoreťazové sekvencie DNA, komplementárne k templátovej DNA. Od nich prebieha syntéza novej DNA pomocou DNA polymerázy
3. Deoxynukleotid trifosfáty (dNTPs) - pridávajú sa v konkrétnych doporučených množstvách, podľa DNA polymerázy.

4. Dvojmocné katióny - najdôležitejšie sú Mg^{2+} katióny pre činnosť termostabilných DNA polymeráz. Mg^{2+} katióny sú významné pre tvorbu komplexov s dNTPs, ktoré sú následne substrátmi pre Taq polymerázu a taktiež stabilizujú komplex primer-templát. Je dôležité zabezpečiť ideálnu koncentráciu katiónov, nakoľko nízke koncentrácie Mg^{2+} vedú k nedostatočnému naviazaniu primeru na templát. Ak sú hladiny Mg^{2+} príliš vysoké dochádza k nedostatočnej denaturácii teplom.
5. Pufry na udržanie stabilnej hodnoty pH.
6. Monovalentné katióny.
7. Templátová DNA - môže vstupovať do reakcie ako jednoreťazcová alebo dvojureťazcová [88, 90].

PCR prebieha v termocykléry v 25-45 cykloch. Termocyklér reguluje čas a teplotu počas PCR. PCR využíva zmenu teplôt na začatie a ukončenie cyklov. Každý cyklus sa skladá z 3 fází (viď obrázok 12):

1. Denaturácia (Denaturation),
2. Hybridizácia alebo nasadenie primeru (Annealing),
3. Elongácia primeru (Extension) [91].

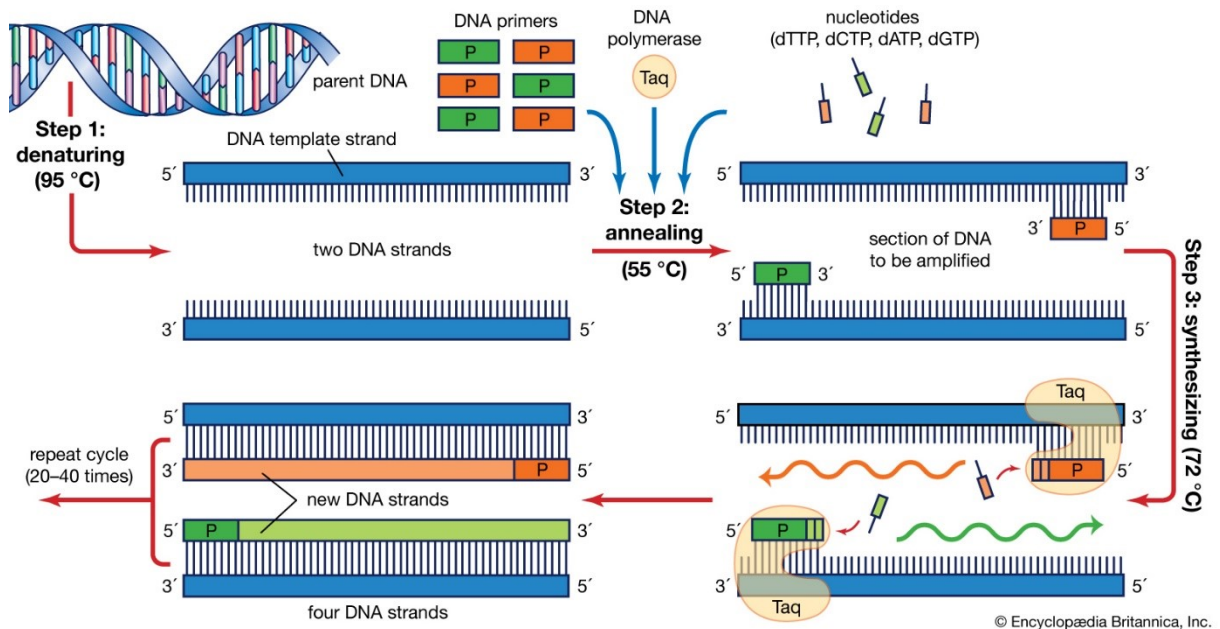
Pri denaturácii dochádza pôsobením vysokej teploty k rozdeleniu vodíkových väzieb v štruktúre DNA medzi komplementárnymi bázami, za vzniku dvoch jednovláknových DNA [89]. Pri používaní termostabilnej Taq polymerázy, prebieha denaturácia maximálne pri 94- 95°C, aby nedošlo k poškodeniu polymerázy počas všetkých cyklov. Čím dlhšia je molekula DNA, tým dlhšie trvá táto fáza [90].

V druhej fáze nasadá oligonukleotidový primer, zložený z 20-25 nukleotidov, na denaturovanú DNA [90]. Teplota v tomto kroku hrá veľmi dôležitú úlohu a je závislá na type použitého primeru [91]. Väčšinou prebieha pri teplote o 3-5°C nižšej, ako je teplota určená na oddelenie primeru od templátu. Ak je teplota nižšia ako optimálna, dochádza k nešpecifickej väzbe primeru na templát, a tak k predĺženiu nesprávnych častí DNA [90].

Pri elongácii predlžuje DNA polymeráza primery od ich 3' konca, postupným pridávaním dNTPs na základe komplementarity. Teplota sa pohybuje medzi 55-75°C pri použití termostabilných DNA polymeráz [90].

Po prvom cykle vzniknú dve dcérske DNA vlákna, ktoré v nasledujúcich cykloch slúžia ako templát. Pri každom ďalšom cykle dochádza k exponenciálnemu rastu templátových DNA [92].

Obrázok 12: Fázy PCR



Na obrázku sú zobrazené jednotlivé fázy cyklu a potrebné elementy pre PCR. V prvom kroku dochádza k denaturácii (Step 1: denaturing) dvojvláknovej DNA (parent DNA) pri 95°C. Vzniknú nám dve DNA templátové vlákna (DNA template strand), ktoré slúžia ako predloha pre syntézu DNA. Pri druhej fáze (Step 2: annealing) sa teplota zníži na 55°C a k zmesi sa pridajú DNA primery (DNA primers), DNA polymeráza (DNA polymerase) a nukleotidy (nucleotides-dTTP,dCTP,dACTP,dGTP). V tejto fáze dôjde k nasadeniu DNA primerov na 3'konce templátovej DNA. Tretím krokom (Step 3: synthesizing) je predlžovanie nových DNA vlákien pomocou Taq polymerázy (Taq), pri teplote 72°C. Vľavo dole môžeme vidieť už kompletne nasyntetizované nové vlákna DNA (new DNA strands). Cyklus sa väčšinou opakuje 20-40krát (repeat cycle 20-40 times).

Prevzatý z: Encyclopædia Britannica-Polymerase chain reaction [online] Dostupný na: <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction> [2021-04-15].

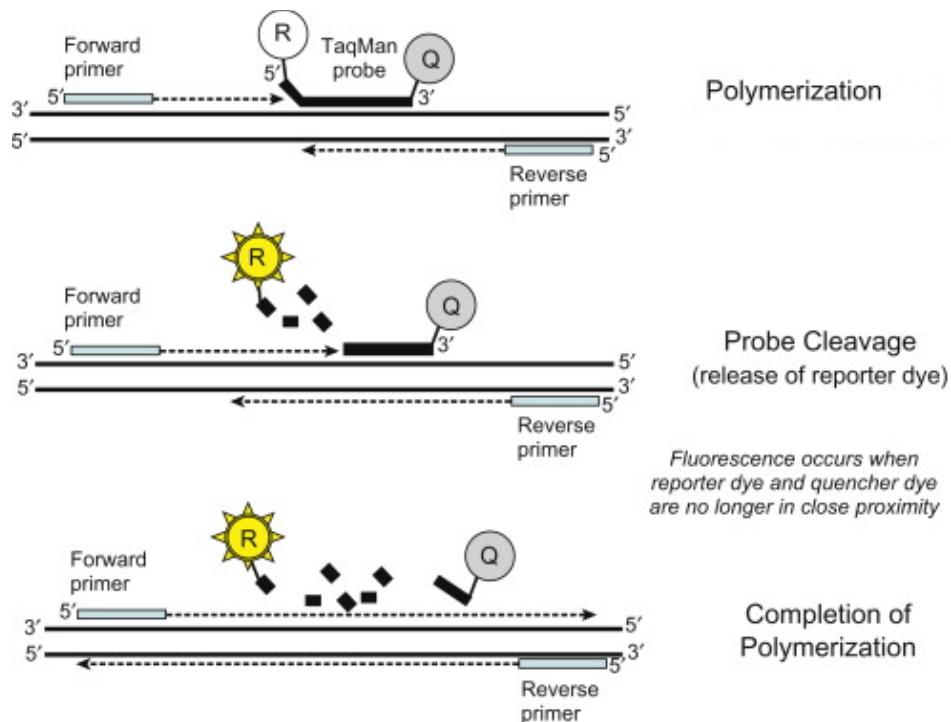
Kvantitatívna real-time PCR

Kvantitatívna real-time PCR (qRT-PCR) je jedným z typov PCR, ktorý umožňuje kvantifikáciu nukleových kyselín veľmi jednoducho a presne [93, 94]. Pri qRT-PCR dochádza k amplifikácii a detekcii DNA súčasne v jednom kroku [93]. Detekciu DNA umožňujú špeciálne fluorescenčné farbivá, ako napríklad SYBR Green I, ktorý sa viaže na dvojvláknovú DNA. Druhou možnosťou sú fluorescenčne značené sondy, ktoré sa viažu k špecifickým oligonukleotidom [95]. Aby boli výsledky čo najpresnejšie je nutné aby každá vzorka obsahovala rovnaké množstvo nukleových kyselín [96].

Pri qRT-PCR sa môže ako substrát použiť aj mRNA. Najskôr je ale potrebné prepísať mRNA do cDNA pomocou reverznej transkriptázy [97]. Na detekciu a kvantifikáciu mRNA sa používajú fluorescenčné sondy, ktoré emitujú svetlo priamo úmerne množstvu PCR produktu, ktorý vznikne počas amplifikácie [90].

Najčastejšie používanou sondou je TaqMan sonda. Na svojom 5'-konci má naviazané fluorescenčné farbivo, tzv. „reporter“, a na 3'-konci má tzv. „quencher“ (zhášač) [97]. Fluorescenčné farbivo reportéru je tlmené pomocou quencheru metódou transferu fluorescenčnej rezonančnej energie (FRET), pokiaľ nedôjde k uvoľneniu reportéru prostredníctvom Taq polymerázy pri predlžovaní primeru [97, 98]. Po rozštípení sondy sa od seba reportér a quencher vzdialia, fluorescencia reportéru už teda nie je ďalej tlmená quencherom a dochádza k jej uvoľneniu. Toto rozštípenie umožňuje pokračovať v syntéze nového reťazca až po koniec templátového reťazca (viď obrázok 13) [97].

Obrázok 13: TaqMan sonda



Obrázok znázorňuje použitie TaqMan sondy na stanovenie fluorescence. Na obrázku sú dve templátové vlákna DNA. V prvej fáze nastáva polymerizácia (polymerization). Na 3' koniec nasadá priamy primer (forward primer), ktorý syntetizuje nové vlákno DNA od 3' konca k 5' koncu pôvodného templátu. Spätný primer (reverse primer) syntetizuje nové vlákno DNA taktiež od 3' konca, ale komplementárneho templátového vlákna DNA. V druhom kroku dochádza k odštiepeniu sondy (probe cleavage) a jej uvoľneniu z DNA vlákna. Po vzdialení sa reportéru (R) od quencheru (Q) sa vyžiari fluorescence. V poslednej fáze dochádza k dosyntetizovaniu celého komplementárneho vlákna a dokončeniu polymerizácie (Completion of Polymerization).

Prevzatý z: ScienceDirect-TaqMan, [online] Dostupný na:

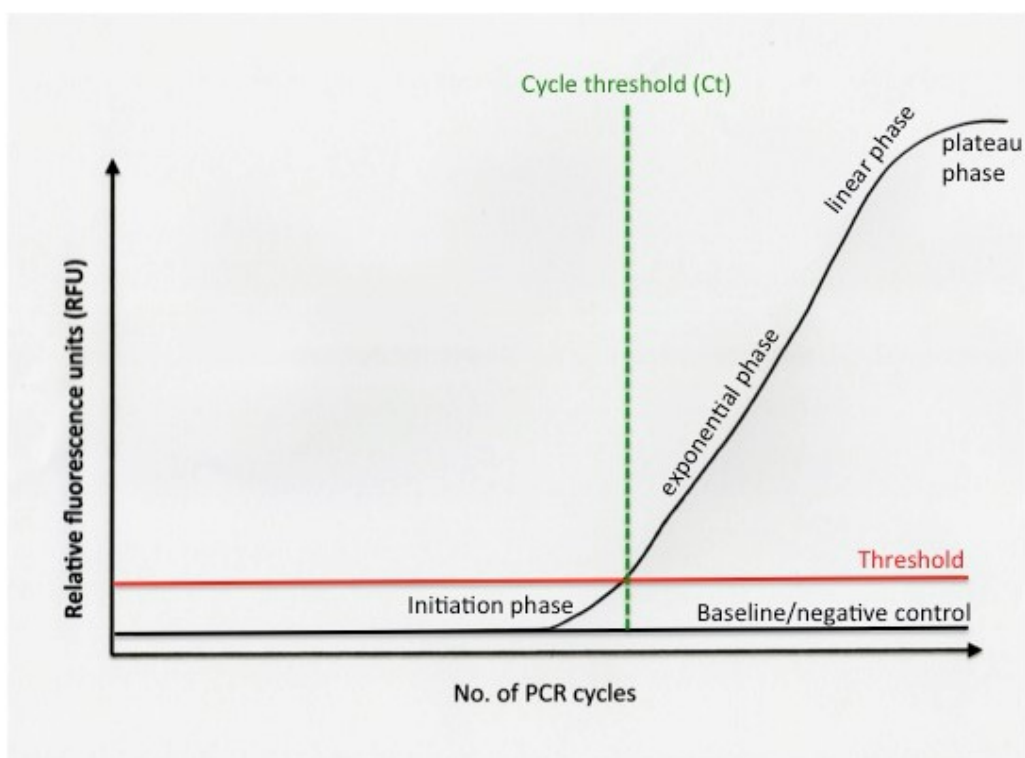
<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/taqman> [2021-04-16].

Prístroj používaný pri qRT-PCR sa skladá z termocykléru, zdroju excitačného žiarenia, detekčného systému pre fluorescenciu a softwaru, ktorý zaznamenáva dáta fluorescence. Výsledky zobrazí ako krivku amplifikácie DNA [99].

Krivka amplifikácie DNA sa skladá zo 4 častí. Iniciálna fáza, exponenciálna fáza, lineárna fáza a fáza plató (viď obrázok 14).

Iniciálna fáza trvá väčšinou 10-15 cyklov, kedy hodnota fluorescenčnej emisie neprekročila fluorescenciu pozadia. Nasleduje exponenciálna fáza, kedy sa fluorescencia zvýšila približne na 10 násobok štandardnej fluorescencie základnej fázy. Cyklus v ktorom toto prebehne sa nazýva prahový cyklus (cycle threshold, Ct). Práve hodnota Ct sa využíva pri vyhodnocovaní výsledkov. Jednou z možností stanovenia hodnoty Ct je nakreslenie priamky rovnobežnej s osou x na grafe intenzity fluorescencie [93, 94]. Počas exponenciálnej fáze prebieha amplifikácia za ideálnych podmienok. V lineárnej fáze sa amplifikácia spomaľuje, nakoľko klesá dostupnosť reakčných činidiel. Pri plató fáze sú už reakčné činidlá vyčerpané a hodnoty fluorescencie sa nevyužívajú pri výpočtoch [94].

Obrázok 14: Graf amplifikácie



Graf zobrazuje zmeny krivky amplifikácie pri PCR. Na ose x má vyjadrené počty cyklov PCR (No. of PCR cycles) a na ose y má relatívnu fluorescenciu (relative fluorescence units) Začiatok krivky (Initiation phase) je lineárny, nakoľko sa ešte nedá detekovať

fluorescencia. So zvyšujúcim sa množstvom produktov narastá aj krivka exponenciálne (exponential phase) až dosiahne prahového bodu (treshold). V tomto bode sa získa hodnota Ct (Cycle treshold), ktorá nám udáva počet cyklov potrebných na dosiahnutie dostatočnej fluorescencie. Po exponenciálnej fáze nastáva lineárna fáza (linear phase) a následne až plató fáza (plateau phase), nakoľko už došlo k vyčerpaniu reakčných činidiel. Negatívna kontrola (Baseline/negative control) má v priebehu všetkých cyklov PCR len lineárny tvar.

Prevzatý z: Nordicbiosite-The lowdown on Real-Time PCR-Part 1 [online] Dostupný na: <https://www.nordicbiosite.com/blog/the-lowdown-on-real-time-pcr-part-1-2> [2021-04-20].

Ako už bolo spomínané, PCR je veľmi citlivá metóda, čo je v určitých prípadoch žiaduce, ale zároveň to môže byť aj nevýhodou. Preto je nutné byť pri spracovávaní vzoriek extra opatrný, aby nedochádzalo ku kontaminácii vzoriek inou DNA, čo by mohlo viesť k nesprávnym výsledkom [90]. Pri qRT-PCR sa môže chyba objaviť už pri prepise mRNA do cDNA. Ďalšie chyby môžu súvisieť s nepresnosťou merania prístrojmi. Na minimalizovanie týchto chýb sa využívajú tzv. housekeepové gény, ktoré sú dôležité pre procesy spojené s prežívaním buniek. Príkladom housekeepového génu je napríklad glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH), hypoxantín fosforybosyl transferáza (HPRT), β -aktín (ACTB) a ďalšie. Ich dôležitou vlastnosťou je, že sa exprimujú rovnako vo všetkých tkanivách a aj pri meniacich sa podmienkach počas experimentu [95].

2.8 Prietoková cytometria – základné princípy

Prietoková cytometria (flow cytometry, FC) je metóda pomocou, ktorej vieme rýchlo zanalyzovať jednotlivé bunky, ktoré prechádzajú cez detektorový systém [100]. Umožňuje nám rýchlo a kvantitatívne preskúmať znaky veľkého množstva individuálnych buniek v heterogénnej vzorke [101]. Využíva sa v rôznych odvetviach vedy ako sú imunológia, virológia, molekulárna biológia či monitorovanie rakoviny a

infekčných ochorení [102]. Vzorkami môžu byť rôzne druhy tkanív, krv, kostná dreň, ale aj rôzne bunkové kultúry [100].

Pomocou FC vieme získať informácie o procesoch prebiehajúcich v bunkách, taktiež aj o expresii špecifických markerov na povrchu buniek, intracelulárnych cytokínoch, signálnych proteínoch a celom bunkovom cykle [100].

Pri FC je dôležité začať s výberom vhodnej fluorescenčne značenej protilátky, ktorá je špecifická pre povrchový marker bunky. Fluorofór sa viaže na protilátku a je vybraný podľa špecifickej vlnovej dĺžky laseru, ktorý je použitý pri FC. Ak sa na povrchu buniek nachádza skúmaný marker, tak potom fluorofór absorbuje energiu z laseru a následne túto energiu uvoľní vo forme špecifickej vlnovej dĺžky svetla. Emitované svetlo je detekované pomocou optického systému, ktorý je citlivý pre rôzne vlnové dĺžky [100]. Existujú viaceré druhy fluorofórov. Patria medzi nich polymérne farbivá, fluorescenčné proteíny, farbivá nukleových kyselín, ktoré sa môžu viazať na DNA a RNA, alebo aj malé organické molekuly ako sú fluoresceín alebo Alexa Fluor 488 (analóg fluoresceínu) [102].

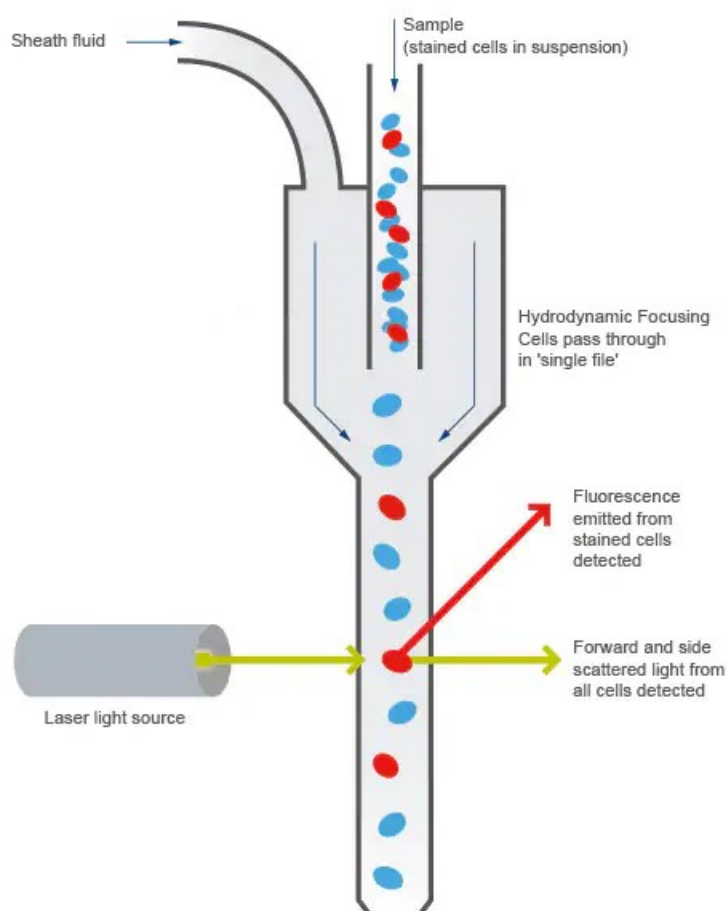
Môžeme rozlišovať dva typy cytometrie - triediacu a netriediacu. Pri netriediacej sa využíva len svetelný rozptyl a fluorescencia, zatiaľ čo pri triediacej sa bunky ešte rozdeľujú podľa naviazaného fluorofóru [103].

Prietokové cytometry sa skladajú z 3 hlavných častí: fluidika, optika a elektronika (viď obrázok 17).

1. Fluidika:

Pre analýzu je potrebné zabezpečiť aby vzorka bola vo forme suspenzie. Vo fluidike je dôležité aby bunky prechádzali laserom postupne po jednej [104]. Toto zabezpečuje nosná tekutina (sheat fluid), ktorou je najčastejšie PBS (phosphate-buffered saline). Pod tlakom sú vstrekané vzorky a zároveň aj nosná tekutina do prietokovej komory. Vzorka je vstrekaná pod nižším tlakom ako nosná tekutina, čo umožňuje vytvorenie koaxiálneho prúdu. Tento proces sa nazýva hydrodynamická fokusácia [102, 103]. Následne sú bunky jednotlivo dopravené k laseru (viď obrázok 15) [105].

Obrázok 15: Hydrodynamická fokusácia



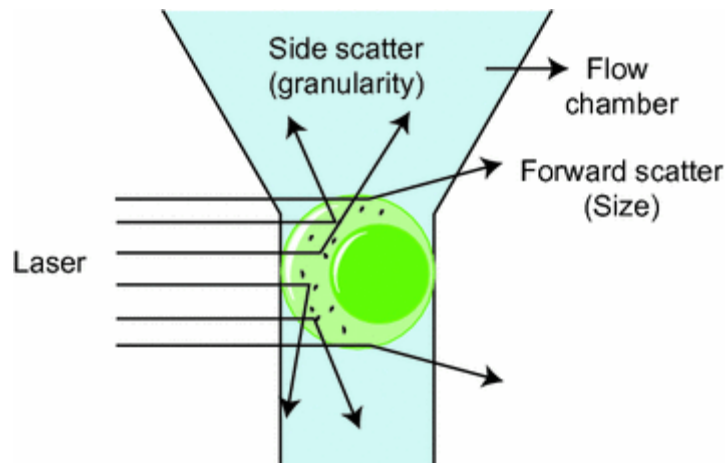
Do prietokovej komory je nasávaná vzorka (sample) so značenými bunkami v suspenzii (stained cells in suspension) a nosná tekutina (sheath fluid), ktorá zabezpečuje, aby bunky prechádzali cez laser jednotlivo (in single file), čomu sa hovorí hydrodynamická fokusácia (hydrodynamic focusing). Vľavo na obrázku je znázornený zdroj svetla (laser light source) a na druhej strane je detekovaný priamy a bočný rozptyl svetla získaný zo všetkých buniek (forward and side scattered light from all cells detected) a fluorescencia z označených buniek (fluorescence emitted from stained cells detected).

Prevzatý z: Abcam-Introduction to flow cytometry [online] Dostupný na:
<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry> [2021-04-06].

2. Optika

Skladá sa z excitačných zdrojov (laserov), šošoviek a zbernej optiky (fotonásobičov a fotodiód). Laser je zdrojom svetla, ktoré sa po narazení na bunku rozptýli. Existujú 2 typy rozptylu a to rozptyl v priamom smere (forward scatter, FSC) a bočný rozptyl (side scatter, SSC). FSC určuje veľkosť buniek a SSC určuje granularitu buniek (vid' obrázok 16). Šošovky sa využívajú na usmernenie žiarenia laseru [103]. Zberná optika zachytáva rozptýlené žiarenie a privádza ho k detektorom [104]. Pomocou filtrov sa dosahuje špecifickosť detektoru na konkrétne fluorescenčné farbivo podľa jeho vlnovej dĺžky [103].

Obrázok 16: Laserový rozptyl



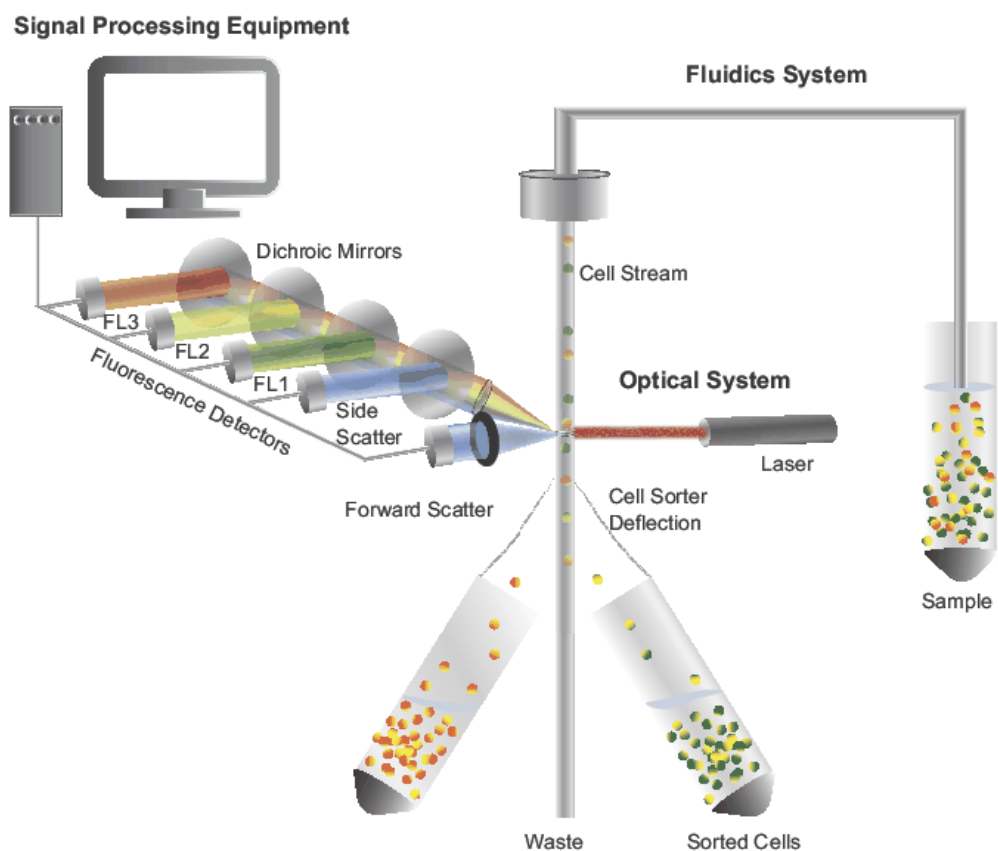
Obrázok zobrazuje priamy a bočný laserový rozptyl u buniek prechádzajúcich prietokovou komorou (flow chamber). Laser pri prechode bunkou vytvára priamy rozptyl (forward scatter), ktorý nám podáva informácie o veľkosti (size) bunky. Bočný rozptyl (side scatter) popisuje granularitu bunky (granularity).

Prevzatý z: *Ex Vivo Studies. In: Fluorescent Tools for Imaging Oxidative Stress in Biology* [106].

3. Elektronika:

Jej úlohou je premieňať signál z detektoru na signál digitálny, ktorý môže byť vyhodnotený pomocou počítača [102].

Obrázok 17: Časti prietokovej cytometrie



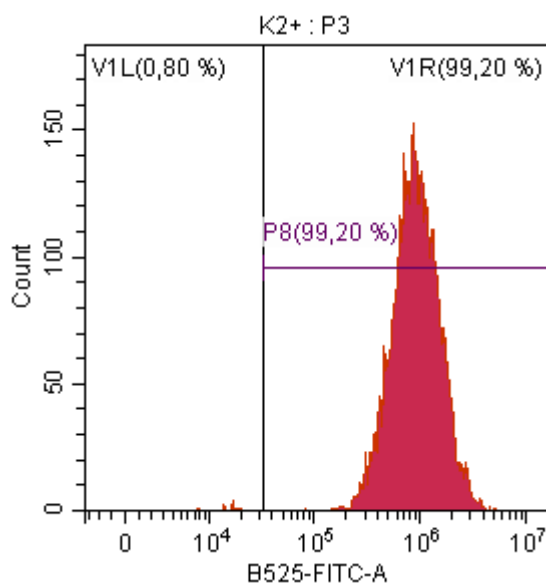
Obrázok znázorňuje 3 hlavné časti prietokového cytometra. Vzorka (sample) je nasávaná pomocou fluidiky (fluidics system) do prístroja a vytvára prúd buniek (cell stream), ktoré jednotlivé vstupujú do optického systému (optical system). Optický systém je zložený z laseru, ktorého lúče prechádzajú cez jednotlivé bunky. Systém zaznamenáva signál z priameho (forward scatter) a z bočného rozptylu (side scatter). Fluorescenčné žiarenie je odrážané pomocou dichroických zrkadiel (dichroic mirrors) a zachytávané fluorescenčnými detektormi (fluorescence detectors). Na spracovanie sa najčastejšie používa elektronika (signal processing equipment). Bunky sa v prípade triediacej cytometrie rozdeľujú (sorted cells) a zvyšok odchádza do odpadu (waste).

Prevzatý z: Newport- Flow Cytometry [online] Dostupný na: <https://www.newport.com/n/flow-cytometry> [2021-04-06].

Výsledky FC môžeme vyhodnocovať vo forme jednoparametrového histogramu alebo dvojparametrového bodového grafu (dot plot).

U histogramu je na ose x zobrazená intenzita fluorescencie. Z osi y môžeme odčítať hodnoty počtu častíc s odpovedajúcou intenzitou svetla (viď obrázok 18) [107]. Niektoré programy umožňujú porovnávať hodnoty medzi dvomi alebo viacerými histogramami [108].

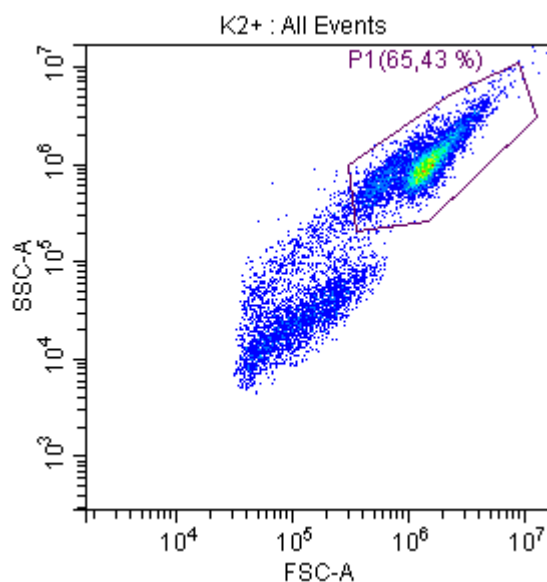
Obrázok 18: Histogram



Na obrázku je zobrazený jednoparametrový histogram. Na ose x je znázornená fluorescencia a na ose y je počet častíc, ktoré odpovedajú danej intenzite svetla (vlastné výsledky).

Pri zobrazovaní pomocou bodového grafu predstavuje 1 bodka grafu vždy jednu bunku [109]. Bodový graf má na ose x zobrazený FSC a na ose y SSC (viď obrázok 19). Na selekciu skúmanej populácie sa využíva tzv. „gating“ [100].

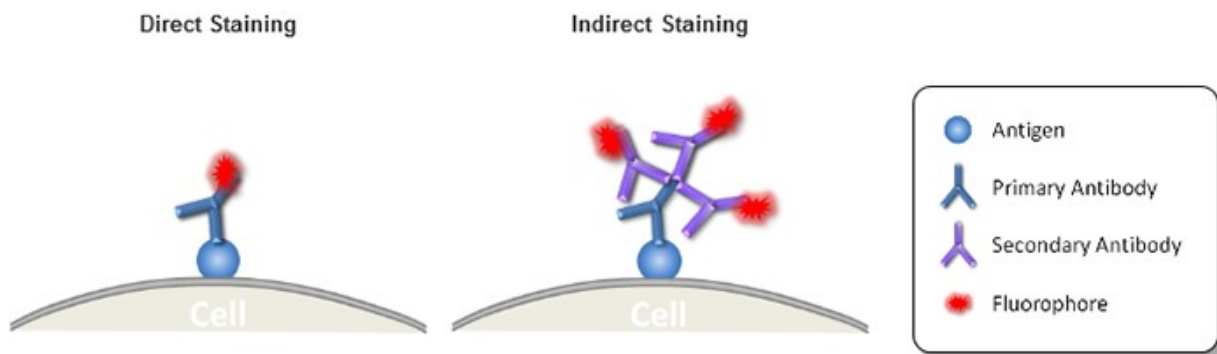
Obrázok 19: Bodový graf



Obrázok znázorňuje bodový graf, ktorý vyjadruje štruktúru a veľkosť bunkovej populácie. Na osu x sú vynesené hodnoty získané pomocou predného rozptylu (FSC-A) a vyjadrujú veľkosť buniek. Osa y zobrazuje hodnoty získané z bočného rozptylu (SSC-A), ktorý popisuje granularitu buniek (vlastné výsledky).

Na meranie expresie proteínov pomocou imunofluorescencie (IF) sa využívajú buď priame (primárne) alebo nepriame (sekundárne) značenie. Priama IF využíva jednu protilátku, ktorá sa špecificky viaže na bunky a zároveň je fluorescenčne označená. Nepriama IF využíva dve protilátky, primárnu a sekundárnu. Primárna protilátka sa priamo viaže na bunku, ale nie je označená fluorofórom. Sekundárna protilátka je označená fluorofórom a viaže sa na primárnu protilátku (viď obrázok 20) [110].

Obrázok 20: Priama a nepriama prietoková cytometria



Obrázok zobrazuje priame a nepriame značenie buniek pomocou protilátok. Na priame značenie (*direct staining*) sa využíva len primárna protilátka (*primary antibody*), ktorá sa naviaže na antigén (*antigen*) na povrchu cieľovej bunky (*cell*) a je zároveň označená fluorofórom (*fluorophore*). Pri nepriamom značení (*indirect staining*), sa primárna protilátka viaže na antigén cieľovej bunky, ale sama nie je značená fluorofórom. Preto je nutné použitie sekundárnej protilátky (*secondary antibody*) s naviazaným fluorofórom.

Prevzatý z: SinoBiological- Flow Cytometry (FACS) Secondary Antibody [online]
Dostupný na: <https://kr.sinobiological.com/category/fcm-facs-secondary-antibody> [2021-04-07].

2.9 ELISA – základné princípy

Imunotesty sú analytické metódy založené na protilátkach a majú využitie v kvalitatívnych ale aj kvantitatívnych analýzach [111]. Medzi tieto testy sa zaraďuje aj enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ktorá je veľmi využívaná pre detekciu a kvantifikáciu proteínov, protilátok, hormónov a antigénov [112].

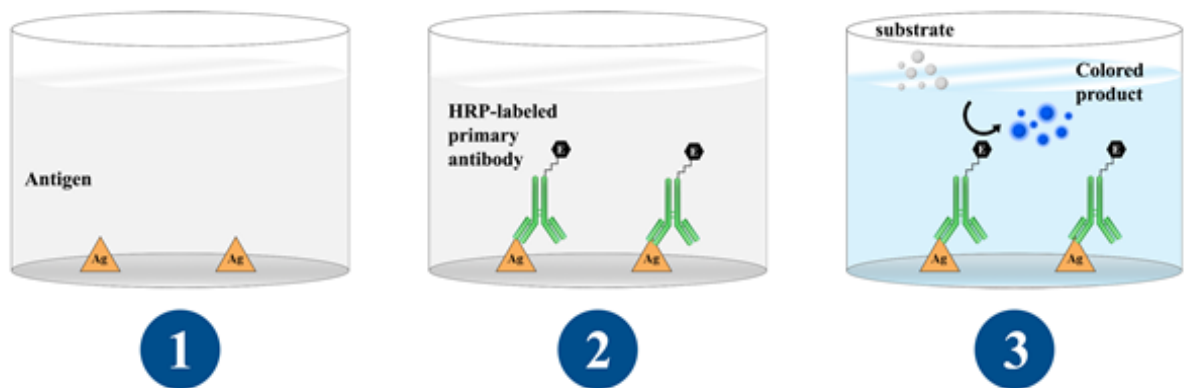
Na metódu ELISA sú potrebné viaceré zložky. V prvom rade sú potrebné testovacie nádoby. Využívajú sa 96-jamkové dosky, ktorých povrch je špeciálne upravený na viazanie proteínov. Antigén je proteín, ktorého hodnoty stanovujeme vo vzorke. Protilátky sú proteíny, ktoré sa viažu s antigénom a sú preň špecifické. Taktiež

sú potrebné aj enzýmy, ktoré sa naviažu na protilátky a zapríčiňujú zmenu farby substrátu. Využíva sa aj tzv. štandard, ktorý má známu koncentráciu a pomocou jeho riedenia sa vytvorí dilučná rada, z ktorej sa vytvorí graf pre vyhodnocovanie výsledkov absorbancie. Absorbancia nám popisuje intenzitu farebných zmien pri ELISA [113, 114].

Princíp metódy:

ELISA je založená na väzbe antigén-protilátka [111]. Na testovanie sa používa najčastejšie 96-jamková doska, ktorá má špeciálne pokrytý povrch aby sa naň mohli pevne viazať proteíny [112]. Do testovacej dosky sa pridá sérum/médium so skúmaným antigénom (viď obrázok 21). Po inkubácii a následnom prepláchnutí dosky by mal antigén zostať naviazaný na povrchu dosky. Následne sa pridá enzýmom značená primárna protilátka, ktorá je špecifická pre daný antigén a zostáva na ňom naviazaná aj po premytí [113]. Ako enzýmy na označovanie protilátok sa používajú predovšetkým zásaditá fosfatáza (alkaline phosphatase, ALP), chrenová peroxidáza (horseradish peroxidase, HRP) a β -galaktozidáza [111]. Medzi každým krokom metódy je nutné premyť dosku pomocou tlmivého roztoku PBS, na odstránenie nenaviazaného materiálu. Na detekciu sa využíva substrát, ktorý po reakcii s enzýmom vytvorí zafarbenie roztoku [112]. Napríklad ALP hydrolyzuje p-nitrophenyl fosfát na p-nitrofenol, ktorý sfarbí roztok na žlté. Tieto enzým-substrátové reakcie trvajú približne 30-60 minút a reakcia sa zastavuje pridaním roztoku hydroxidu sodného, kyseliny chlorovodíkovej alebo kyseliny sírovej. Farebné alebo fluoreskujúce produkty sa detekujú pomocou čítačky 96-jamkových doštičiek [111].

Obrázok 21: Princíp priamej metódy ELISA



Obrázok popisuje proces priamej metódy ELISA. V prvom kroku sa na povrch testovacej nádoby naviaže antigén (antigen) a imobilizuje sa. V druhom kroku sa na antigén naviaže primárna protilátka označená enzýmom HRP (HRP-labeled primary antibody). V poslednom kroku sa do testovacej nádoby pridá substrát (substrate), ktorý po reakcii s enzýmom vytvára farebný produkt (colored product).

Prevzatý a upravený z: AAT Bioquest- *What is a Direct ELISA?* [online] Dostupný na: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-a-Direct-ELISA> [2021-04-10].

Pomocou sériového riedenia sa vytvorí štandardná krivka, kde osa x grafu je koncentrácia vyjadrená pomocou logaritmického stupnice a osa y je lineárna a zodpovedá absorbancii. V tomto prípade hovoríme o kvantitatívnom vyhodnocovaní pomocou metódy ELISA. Pri kvalitatívnom hodnotení sa potvrdzuje len prítomnosť alebo neprítomnosť daného antigénu vo vzorke. Pri semikvantitatívnom hodnotení sa porovnáva intenzita signálu s relatívnymi hladinami antigénu vo vzorke [112].

Medzi výhody tejto metódy patria vysoká citlivosť, relatívne nízke náklady na jednotlivé testy a fakt, že neohrozuje personál pracujúci s touto metódou. Nevýhodou je náročná príprava antigénov a nestabilita protilátok či riziko získania falošne pozitívneho alebo negatívneho výsledku [113].

Typy ELISA (viď obrázok 22):

1. Priama ELISA

Pri priamej metóde sa doska na začiatku pokryje antigénom. Následne sa doska musí premyť aby sa odstránili nenaviazané antigény a pridá sa napríklad albumín, želatína či iné živočíšne proteíny [111, 112]. To zabráni nešpecifickej väzbe protilátok na dosku a minimalizuje to riziko falošne pozitívnych výsledkov. Doska sa opätovne premyje a po premytí sa pridá primárna protilátka konjugovaná s enzýmom. Doska sa nechá inkubovať a následne sa premyje a pridá sa substrát, ktorý vyvolá zmenu farby. Zmena farby nastáva napríklad hydrolýzou fosfátovej skupiny substrátu pomocou ALP alebo oxidáciou substrátu pomocou HRP. So zvyšujúcim sa množstvom cieľového antigénu sa zosilňuje signál [111].

Výhodou oproti iným typom je jej rýchlosť, nakoľko sa používa len jedna protilátka, ale nevýhodou je nízka citlivosť a vyššia cena [112].

2. Nepriama ELISA

Proces metódy je takmer identický ako pri priamej metóde. Rozdiel je, že u nepriamej ELISA sú potrebné dve protilátky. Primárna protilátka, ktorá sa viaže na cieľový proteín a sekundárna, ktorá je enzýmovo značená a viaže sa na primárnu protilátku.

Nepriama ELISA je citlivejšia a menej finančne nákladná v porovnaní s priamou. Výhodou je aj jej flexibilita, nakoľko môže využiť široké množstvo primárnych protilátok. Nevýhodou ale je možná skrižená reaktivita medzi sekundárnymi protilátkami [112]. Často sa táto metóda využíva k diagnostikovaní endokrinných ochorení [111].

3. Sandwich ELISA

V tomto prípade je cieľový antigén detekovaný prostredníctvom zakotvenia medzi dvomi protilátkami. Špecifikom tejto metódy je, že sa povrch dosky pokrýva protilátkou, ktorá slúži na imobilizáciu cieľového antigénu, ktorý sa na ňu naviaže. Na antigén sa ale ešte viaže aj sekundárna protilátka, ktorá je enzymaticky značená. Naviazaný enzým katalyzuje premenu substrátu, ktorý potom generuje signál [111].

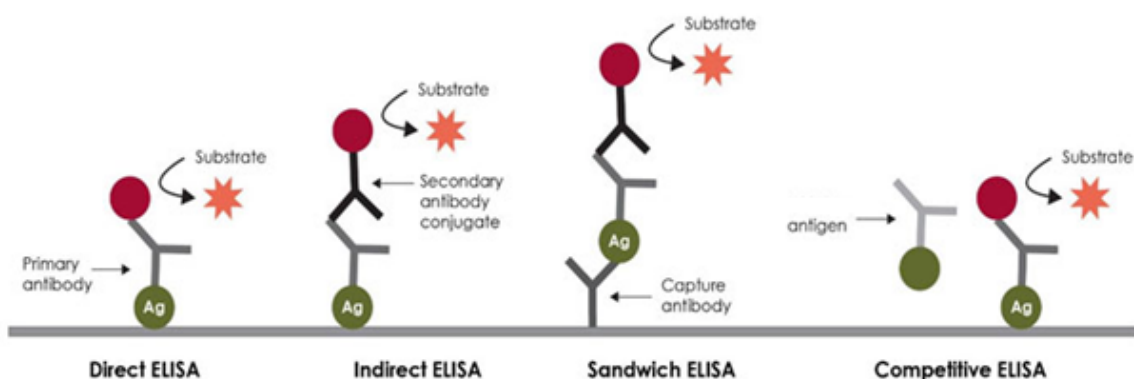
Je možné využiť aj nepriamu metódu sandwich ELISA, kedy sa využíva primárna protilátka, ktorá sa priamo viaže na antigén a sekundárna protilátka, enzymaticky označená, viažuca sa na primárnu protilátku [111].

Výhodami oproti klasickej ELISE je schopnosť protilátky sa selektívne viazať na antigén aj v prípade nespracovanej alebo znečistenej vzorky [115]. Má najvyššiu citlivosť z rôznych typov ELISA. Nevýhodou je ale časová a finančná náročnosť [112].

4. Kompetitívna ELISA

Pri kompetitívnej metóde ELISA medzi sebou antigény súperia o väzbu na imobilizovanú protilátku. Rozhoduje sa o väzbe cieľového antigénu a antigénu enzýmovo značeného. Čím viac cieľových antigénov sa nachádza v skúmanej vzorke tým menej enzýmovo značených antigénov sa môže naviazať, čo vedie k menšiemu sfarbeniu pridaného substrátu [114].

Obrázok 22: Typy metódy ELISA



Obrázok znázorňuje 4 typy metódy ELISA. Prvým typom je priama ELISA (Direct ELISA), pri ktorej sa najprv viaže na povrch antigén (Ag), na neho sa naviaže primárna protilátka, ktorá je značená enzýmom. Následne sa k nim pridá substrát, ktorý reaguje s enzýmom za vzniku farebného produktu. Druhým typom je nepriama ELISA (Indirect ELISA), u ktorej sa na antigén viaže primárna protilátka, ktorá ale nie je označená enzýmom. Preto je nutné pridať ešte enzýmovo značenú sekundárnu protilátku, ktorá reaguje so substrátom. Pri sendvičovej ELISA (Sandwich ELISA) je na testovacej doske naviazaná protilátka (capture antibody). Antigén sa naviaže na protilátku a primárna protilátka sa špecificky viaže na antigén. Nakoľko primárna protilátka nie je označená enzýmom pridá sa k nej ešte sekundárna protilátka s enzýmom, ktorý reaguje so substrátom. Pri kompetitívnej metóde ELISA (Competitive ELISA) súperia o miesto naviazania nami stanovovaný antigén a antigén, ktorý je značený enzymaticky a tak môže reagovať so substrátom.

Prevzatý z: Advasta- ELISA Technical Tips [online] Dostupný na:
<https://advansta.com/elisa-technical-tips/> [2021-04-10].

3 ZADANIE A CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či nová monoklonálna protilátka carotuximab (TRC105) ovplyvňuje expresiu endoglínu a jeho transkripčných faktorov (KLF6 a RELA) a taktiež expresiu MMP14 (enzýmu, ktorý je zodpovedný za štiepenie membránového endoglínu) a solubilného endoglínu, u ľudských aortálnych endotelových buniek, ktoré boli po dobu 3 dní vystavené pôsobeniu vysokých hladín glukózy (45 mmol).

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 HAEC

Human Aortic Endothelial Cells (HAECs) sú endotelové bunky podlhovastého tvaru získané z ľudskej aorty (viď obrázok 23) [17]. Tieto bunky sme si vybrali pre náš experiment, nakoľko sa podieľajú na regulácii vazokonstrikcie a vazodilatácie ciev. Svoje pôsobenie uplatňujú pri imunitných odpovediach a zápalových procesoch prostredníctvom expresie adhézných molekúl. Aj z tohto dôvodu sú vhodné na pozorovanie rozvoja endotelovej dysfunkcie a aterosklerózy [16].

Pri našom experimente sme pracovali s bunkami v laminárnom boxe, aby nedochádzalo ku kontaminácii vzoriek. Fáza proliferácie buniek prebiehala v inkubátore, nakoľko v ňom boli ideálne podmienky pre ich rast (37°C a 5% CO₂). Bunky sme kultivovali v médiu, ktoré je nevyhnutné pre ich život a delenie. Pracovali sme s bunkovou pasážou číslo 5. Pravidelne sme sledovali množstvo buniek v Petriho miskách, aby nedochádzalo k vzájomnému negatívnemu ovplyvneniu rastu buniek. Najvhodnejšie bolo pracovať s bunkami pri 80-90% konfluencii [8].

Obrázok 23: HAEC



Na obrázku vidieť proliferované HAEC v Petriho miskách pod optickým mikroskopom (vlastné výsledky).

4.2 *Príprava vzoriek*

4.2.1 Rozmrazovanie

Pred samotným rozmrazovaním buniek sme si najprv museli pripraviť želatínu a médium pre HAEC.

Zloženie želatíny:

- 76 ml sterilného PBS
- 4 ml 2% želatíny

Zloženie HAEC média:

- 200 ml médium pre rast endotelových buniek (endothelial cell growth basal medium, EBM-2)
- 22 ml fetálne hovädzie sérum (fetal bovine serum, FBS)
- 800 µl fibroblastový rastový faktor (fibroblast growth factor, FGF)
- 80 µl hydrokortizónu
- 200 µl cievny endoteliálny rastový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF)
- 200 µl rekombinantný rastový faktor podobný inzulínu (recombinant insulin-like growth factor, R₃-IGF)
- 200 µl acidum ascorbicum (kyselina askorbová)
- 200 µl ľudský epidermálny rastový faktor (human epidermal growth factor, hEGF)
- 200 µl GA-1000 (roztok gentamicínu a amfotericínu)
- 200 µl heparínu

Po pripravení želatíny a média sme si dali nahrievať médium a PBS do vodného kúpeľa. Do kultivačných Petriho misiek sme napipetovali 2 ml želatíny, ktorá napomáha uchytaniu buniek k Petriho miskám. Miernym poklepávaním po bokoch Petriho misiek sme rozprestrelí želatínu po celom povrchu a vložili do inkubátora na 20 minút.

Po uplynutí 20 minút sme Petriho misky vybrali z inkubátora a vložili do laminárneho boxu. Nadbytočnú želatínu sme odsali pomocou vákuovej odsávačky. Následne sme pridali 8 ml média do každej Petriho misky a nechali ich v laminárnom

boxe pokým sme vybrali bunky, ktoré boli zmrazené pri -80°C . Bunky sme rozmrazovali vo vodnom kúpeli krúživým pohybom až pokým nám v kryoskúmavkách nezostal malý kúsok ľadu. Potom sme bunky pomocou pipety opatrne resuspendovali a preniesli celý obsah jednej skúmavky do jednej Petriho misky. Riadne sme ich označili, uložili do inkubátora a v priebehu dní pozorovali ako sa množia. Bunky narástli do 80-90% konfluencie približne za 2 dni.

4.2.2 Pasážovanie

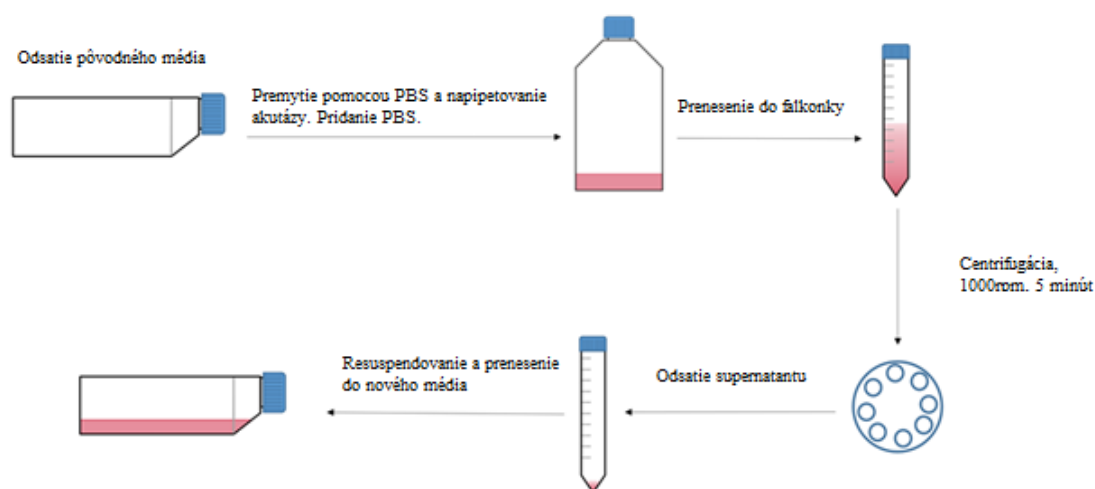
Pred pasážovaním sme si museli vo vodnom kúpeli nahriať médium, PBS a enzým akutázu, ktorý umožňuje uvoľnenie buniek od dna nádoby rozštiepením peptidových väzieb.

Pripravili sme si nové Petriho misky a potiahli ich povrch 2 ml želatíny a vložili do inkubátora na 20 minút.

Z Petriho misiek, v ktorých sa nachádzali naše HAEC bunky sme odsali pôvodné médium pomocou vákuovej odsávačky (viď obrázok 24). Do Petriho misiek sme napipetovali 3 ml PBS, ktoré slúži na odstránenie mŕtvych buniek a odsali ho. Tento krok sme zopakovali ešte jedenkrát. Následne sme pridali 2 ml akutázy a vložili kultivačné misky na 10 minút do inkubátora. Medzičasom sme si odsali želatínu z Petriho misiek a napipetovali do nich 8 ml nového média.

Po 10 minútach sme Petriho misky skontrolovali pod mikroskopom a keď boli všetky bunky odlepené od dna, tak sme k akutáze napipetovali 3 ml PBS, aby sme zastavili jej účinok. Niekoľkokrát sme opláchli dno Petriho misky pomocou pipety a následne sme preniesli celý objem do 15 ml falkonky (kónickej skúmavky). Pridali sme ďalšie 3 ml PBS do Petriho misky a poriadne opláchli dno misky, aby sme preniesli čo najviac buniek. Falkonky sme potom vložili do centrifúgy na 5 minút pri 1000 otáčkach za minútu (revolutions per minute, rpm). Po 5 minútach sme skontrolovali, že sa nám bunky usadili na dne falkonky. Odsali sme supernatant nad bunkami a následne sme k bunkám pridali 3 ml nového média. Pomocou pipety sme resuspendovali bunky v médiu a napipetovali 500 μl suspenzie do každej pripravenej Petriho misky. Misky sme označili a vložili do inkubátora na 4 dni.

Obrázok 24: Pasážovanie buniek



Obrázok popisuje postup pasážovania. Najprv sa odsaje pôvodné médium a kultivačná miska sa premyje pomocou PBS. PBS sa odsaje a k bunkám sa napipetuje akutáza. Po uplynutí 10 minút sa k akutáze pridá PBS. Obsah kultivačnej misky sa preniesie do falkonky a zcentrifuguje. Vzniknutý supernatant sa odsaje a k bunkovej peletke sa pridá médium a resuspenduje sa. Obsah falkonky sa preniesie do novej kultivačnej misky s médiom.

Prevzatý a upravený z: *Passaging adherent cancer cell lines [online]* Dostupný na: <https://www.protocols.io/view/passaging-adherent-cancer-cell-lines-bgtbjwin.html> [2021-03-05].

4.2.3 Premedikácia

Po dosiahnutí 80% konfluencie sme bunky vystavili počas 3 dní pôsobeniu vysokej koncentrácie glukózy. Do kontrolných skupín sme pridávali 40 mmol manitol, ktorého úlohou je vyvolať osmotické javy ako pri podaní glukózy. Pri experimentálnej časti sme pracovali s 12 Petriho miskami (pri PCR aj pri FC) a do každej sme pridávali 8 ml pripraveného média podľa experimentálneho designu. Počet experimentálnych skupín sa pri metódach PCR a FC líšil. Pri PCR sme pracovali s 3 experimentálnymi skupinami, takže na každú skupinu pripadli 4 Petriho misky. Pri FC sme pracovali so 4 experimentálnymi skupinami a teda na každú skupinu pripadli 3 Petriho misky. U oboch metód sme z každej Petriho misky pripravili 2 vzorky.

Na metódu ELISA sme použili 10 vzoriek média pre každú z 2 experimentálnych skupín. Médium bolo získané z vybraných experimentálnych skupín

z predchádzajúcich experimentov. Použili sme väčší počet vzoriek, aby bola dosiahnutá čo najvyššia presnosť výsledkov.

Experimentálny design PCR:

1. Kontrolná skupina (kontrola): 40 mmol manitol a 5 mmol glukóza.
2. Experimentálna skupina (HG): 45 mmol glukóza.
3. Experimentálna skupina + TRC105 (HG/TRC): 45 mmol glukóza a 12 hodín pred PCR sme pridali 96 μ l TRC105 (300 μ g/ml).

Tabuľka 3: Experimentálny design premedikácie PCR

	MAN [mmol]	GLU [mmol]	TRC105 [μ l]
kontrola	40	5	0
HG	0	45	0
HG/TRC	0	45	96

MAN – manitol, GLU – glukóza, HG – vysoké hladiny glukózy, TRC105 – carotuximab, HG/TRC – vysoké hladiny glukózy a pridané TRC

Experimentálny design FC:

1. Kontrolná skupina (kontrola): 40 mmol manitol a 5 mmol glukóza.
2. Kontrolná skupina + TRC105 (TRC): 40 mmol manitol a 5 mmol glukóza. 12 hodín pred samotnou FC sme do Petriho misiek pridali 96 μ l TRC105 o koncentracii 300 μ g/ml.
3. Experimentálna skupina (HG): 45 mmol glukóza.
4. Experimentálna skupina + TRC105 (HG/TRC): 45 mmol glukóza a 12 hodín pred FC sme pridali 96 μ l TRC105 (300 μ g/ml).

Tabuľka 4: Experimentálny design premedikácie FC

	MAN [mmol]	GLU [mmol]	TRC105 [μ l]
kontrola	40	5	0
TRC	40	5	96
HG	0	45	0
HG/TRC	0	45	96

MAN – manitol, GLU – glukóza, TRC105 – carotuximab, TRC – kontrolná skupina s TRC105, HG – vysoké hladiny glukózy, HG/TRC – vysoké hladiny glukózy a pridané TRC

Experimentálny design ELISA:

1. Kontrolná skupina (kontrola): 40 mmol manitol a 5 mmol glukóza.
2. Experimentálna skupina (HG): 45 mmol glukóza.

Tabuľka 5: Experimentálny design premedikácie ELISA

	MAN [mmol]	GLU [mmol]	TRC105 [μ l]
kontrola	40	5	0
HG	0	45	0

MAN – manitol, GLU – glukóza, TRC105 – carotuximab, HG – vysoké hladiny glukózy

Výpočet navážky glukózy a manitolu:

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

m – hmotnosť navážky

c – koncentrácia v roztoku

V – objem roztoku

M_m – molárna hmotnosť (glukózy alebo manitolu)

Pri výpočte navážky manitolu a glukózy sme nepočítali so stanovenou koncentráciou 45 mmol, nakoľko sme k navážkam pridávali médium, ktoré obsahovalo 5 mmol glukózy. Z tohto dôvodu sme do vzorcov dosadzovali hodnotu koncentrácie 40 mmol.

a) Množstvo glukózy u HG

$$m = 40 \cdot 26 \cdot 180,16$$

$$m = 187,4 \text{ mg GLU}$$

b) Množstvo manitolu v kontrolnej skupine

$$m = 40 \cdot 26 \cdot 182,17$$

$$m = 189,5 \text{ mg MAN}$$

Výpočet potrebného množstva média:

$$V = 8 \cdot n + 2 \text{ ml média}$$

V – objem média

n – počet Petriho misiek v danej skupine

Pridávame 2 ml média navyše aby sme mali mierny nadbytok pri pipetovaní.

Výpočet potrebného množstva TRC105 zo zásobného roztoku 25 mg/ml:

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

c_1 – koncentrácia zásobného roztoku TRC105

V_1 – objem TRC105

c_2 – výsledná koncentrácia TRC105

V_2 – výsledný objem média v Petriho miske

$$V_1 = \frac{8000\mu\text{l} * 300\mu\text{l}/\text{ml}}{25000\mu\text{l}/\text{ml}}$$

$$V_1 = 96\mu\text{l TRC105}$$

Pred premedikáciou sme si museli nahriať médium a PBS. Vypočítané množstvá glukózy a manitolu sme si navážili na analytických váhach. K navážkam sme pridali 26 ml nahriateho média a rozpustili glukózu a manitol. Z Petriho misiek sme si odsali pôvodné médium a prepláchli ich 3 ml PBS. PBS sme odsali pomocou vákuovej odsávačky a do Petriho misiek sme pridávali 8 ml pripraveného média podľa tabuľky č.3 alebo č.4.

12 hodín pred meraním sme pridali do príslušných skupín 96 μl TRC105. Po pridaní sme médium v kultivačných miskách dôkladne premiešali a vložili späť do inkubátora.

4.3 PCR

Pred začiatkom samotnej prípravy vzoriek na PCR sme si dali na 20 minút nahriať PBS vo vodnom kúpeli a vybrali TRI ReagentTM Solution (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) z chladničky a nechali zohriať pri izbovej teplote.

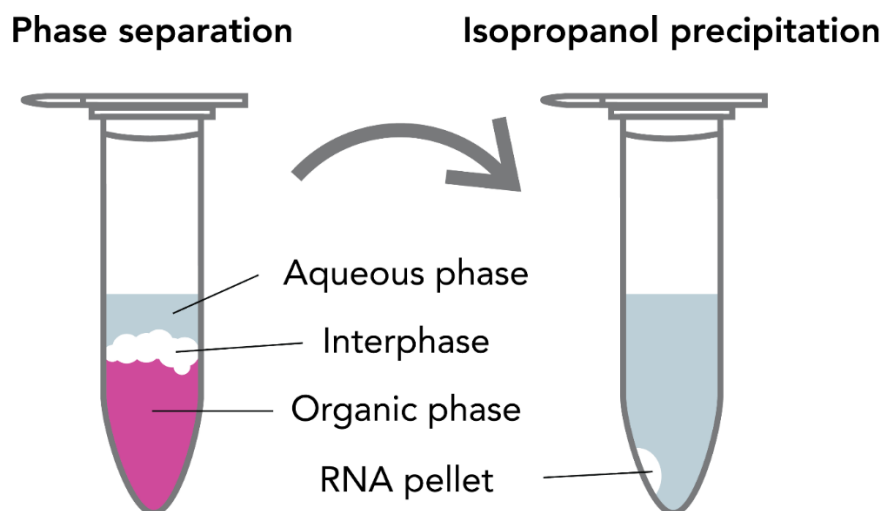
Z Petriho misiek sme si odsali médium pomocou vákuovej odsávačky. Premyli sme ich pomocou 3 ml PBS a následne sme ho odsali. Pre dokonalejšie premytie sme tento krok ešte raz zopakovali. Potom sme pridali 2 ml TRI Reagentu do každej Petriho misky. Jeho pôsobením došlo k uvoľneniu RNA z buniek. TRI Reagent sme nechali pôsobiť 5 minút na ľadovej podložke za občasného premiešania. Pomocou pipety sme opláchli povrch Petriho misky a preniesli 1 ml zmesi do pripravenej 1,5 ml PCR mikrocentrifugačnej skúmavky (VWR International, Pennsylvánia, USA). Z 1 Petriho misky nám teda vznikli 2 mikrocentrifugačné skúmavky so vzorkou.

Následne sme vzorky zhomogenizovali pomocou ultrazvukovej ihly (UP100H, Hielscher Ultrasonics, Nemecko) a inzulínovej striekačky.

Ku všetkým vzorkám sme pridali 0,2 ml chloroformu a potom sme vzorky 10 sekúnd pretrepávali. Vzorky sme nechali stáť 5 minút pri izbovej teplote a následne sme ich vložili do centrifúgy na 15 minút pri 12 000 rpm a 4°C. Po centrifugácii sme

pozorovali 3 vzniknuté vrstvy. Horná priehľadná fáza obsahovala našu extrahovanú RNA. Medzifáza bielej farby obsahovala zvyšky DNA a spodná organická vrstva obsahovala proteíny (viď obrázok 25).

Obrázok 25: Rozdelenie fáz po chloroforme



Na obrázku môžeme vidieť rozdelenie fází po pridaní chloroformu a následnej centrifugácii. Vrchná vodná fáza (Aqueous phase), ktorú sme odoberali, obsahuje RNA. Medzifáza (Interphase) je zložená z bunkovej DNA a spodná organická fáza (Organic phase) obsahuje bielkoviny. K odobranej RNA sa pridáva isopropanol potrebný na precipitáciu.

Prevzatý z: ZYMO RESEARCH- What is TRIZOL [online] Dostupný na:
<https://www.zymoresearch.com/pages/what-is-trizol> [2021-03-10].

V laminárnom boxe sme si pripravili a označili nové mikrocentrifugačné skúmavky a pridali do nich 5 μ l GenElute™-LPA (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), ktorý slúži na stabilizáciu extrahovanej RNA. Opatrne sme pomocou pipety odoberali 3 x 100 μ l vrchnej vodnej fázy tak, aby sme nenarušili medzifázu. Následne sme pridali 500 μ l studeného isopropylalkoholu (IPA) na precipitáciu RNA a vzorky sme na 10 sekúnd premiešali. Nechali sme vzorky 10 minút pri izbovej teplote a potom sme ich umiestnili do centrifúgy na 10 minút pri 12 000 rpm a teplote 4°C. Na dne sme mohli voľným

okom vidieť vzniknutú peletku obsahujúcu RNA. Opatrne sme odsali IPA tak, aby sme nepoškodili peletku. K peletke sme pridali 1 ml 75% studeného etanolu a premiešali. Následne sme etanol odsali a peletku sme nechali voľne vyschnúť na vzduchu. Po odparení etanolu sme peletku rozpustili v 20 μ l aqua pro injectione (voda pre injekcie, API), resuspendovali a nechali 20 minút v chladničke.

Ďalším krokom bolo meranie koncentrácie RNA pomocou spektrofotometra (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Nemecko). Zvolili sme si faktor riedenia (dilution factor) 1000, lid faktor 40 a jednotky ng/ μ l. Ako prvú sme merali tzv. blank vzorku (slepú vzorku), ktorá slúži na spresnenie merania, nakoľko obsahuje použité rozpúšťadlo bez stanovovanej zložky. V našom prípade sme ako blank vzorku použili 1,5 μ l API. Pred samotným meraním sme vzorky poriadne zvortexovali, resuspendovali a pipetovali v objemoch 1,5 μ l. Po každej vzorke sme optickú plochu utreli buničinou.

Po nameraní koncentrácií a zapísaní výsledkov všetkých vzoriek do tabuliek sme zistili, aké množstvo vzorky a API budeme potrebovať, tak aby výsledná koncentrácia všetkých vzoriek bola 100 ng/ μ l.

Ďalšou časťou prípravy vzoriek bol prepis RNA do cDNA (komplementárnej DNA). Po nariadení vzoriek na konečnú koncentráciu 100 ng/ μ l, podľa tabuľky č.6 sme si pripravili master mix na reverznú transkripciu podľa tabuľky č.7.

Tabuľka 6: Riedenie vzoriek

Vzorka	Označenie vzorky	ng/ μ l	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

K – kontrola, HG – vysoké hladiny glukózy, HG/TRC – skupina s vysokými hladinami glukózy a pridaným TRC

Tabuľka 7: Príprava master mixu

		množ. [μ l]	nadb. [μ l]	celkový objem [μ l]
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

Nuclease free water – voda bez nukleáz, RT buffer – pufoer pre reverznú transkripciu, RT random primers – náhodné primery pre reverznú transkripciu, dNTP mix – mix deoxynukleotidtrifosfátov, reverse transcriptase – reverzná transkripáza

Do 0,2 ml PCR mikrocentrifúgačných skúmaviek sme napipetovali vzorku a API podľa tabuľky č.6, 10 μ l master mixu a vložili sme ich do termocykléru.

Po prepise RNA na cDNA sme k vzorkám pridali 180 μ l API, aby výsledná koncentrácia vzoriek bola 5 ng/ μ l.

Podľa tabuľky č. 8 sme si ďalej zmiešali master mix na PCR (TaqMan™ Gene Expression Mater Mix, Applied iosystems, Kalifornia, USA) s príslušným primerom. Do 96-jamkovej dosky MicroAmp™ Optical 96 Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Kalifornia, USA) sme napipetovali 5,5 μ l zmesi master mixu a primeru. Následne sme pipetovali naše vzorky v duplikátoch do príslušných jamiek podľa tabuľky č.9. 96-jamkovú doštičku sme riadne zakryli adhezívnou fóliou a vložili do centrifúgy na 2 minúty pri 1000 rpm. Potom sme 96-jamkovú dosku vložili do prístroja QuantStudio™ Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Kalifornia, USA) a spustili program.

Tabuľka 8: Príprava master mixu PCR

	Objem na 1 vzorku [μ l]	Celkový objem [μ l]
MM	5	260
Primer	0,5	26

MM – master mix

Tabuľka 9: Predloha na pipetovanie 96-jamkovej dosky

	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												

K – kontrola, HG – vysoké hladiny glukózy, HG/TRC – skupina s vysokými hladinami glukózy a s TRC

Po ukončení programu sme získané dáta s cycle treshold (Ct) exportovali do programu Microsoft Excel. Hodnota Ct nám udáva, v ktorom cykle došlo k náhlemu zvýšeniu fluorescencie. Naše výsledky sme vyhodnocovali pomocou metódy delta-delta Ct. Táto metóda nám umožňuje zistiť zmeny v génovej expresii počas kvantitatívnej real-time PCR. Pri výpočte sme postupovali v niekoľkých krokoch. Na porovnanie hodnôt je nutné mať kontrolnú skupinu bez premedikácie a hodnoty Ct pre housekeepový gén, ktorý by mal byť stabilný. Ako prvé sme si vypočítali hodnotu delta Ct. Jednalo sa o rozdiel medzi hodnotami Ct nášho pozorovaného génu a Ct housekeepového génu.

$$\Delta Ct = Ct (\text{pozorovaný gén}) - Ct (\text{housekeepový gén})$$

Následne sme si vypočítali priemer z hodnôt delta Ct kontrolnej skupiny. Potom sme počítali delta-delta Ct ako rozdiel medzi hodnotou delta Ct vzorky a priemernej hodnoty delta Ct kontrolnej skupiny.

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

Posledným krokom bolo počítanie negatívnej druhej mocniny delta-delta Ct [116].

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

Pri vyhodnocovaní výsledkov sme použili štatistický program GraphPad Prism verzia 9.0.2 (GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

4.4 Prietoková cytometria

Ako prvý krok sme si dali nahrievať médium, PBS a akutázu do vodného kúpeľa. Z Petriho misiek sme si pomocou vákuovej odsávačky odsali pôvodné médium. Na odstránenie mŕtvych buniek sme Petriho misky prepláchli dvakrát pomocou PBS a to sme následne odsali odsávačkou. Potom sme pridali 2 ml akutázy na oddelenie buniek od dna Petriho misiek a vložili ich na 10 minút do inkubátora.

Po uplynutí 10 minút sme k akutáze napipetovali 3 ml PBS a pomocou pipety opláchli dno Petriho misiek. Objem Petriho misiek sme preniesli do 15 ml falkonky a pre dokonalejšie prenesenie buniek sme tento oplach zopakovali ešte raz. Označené falkonky sme vložili do centrifúgy pri 1000 rpm na 5 minút.

Po vybratí falkoniek z centrifúgy sme videli usadené bunky, ktoré na dne vytvorili peletku. Vzniknutý supernatant nad peletkou sme opatrne odsali a pridali k bunkám 500 μ l chladného fosfátom pufovaného soľného roztoku s 1% hovädzím sérovým albumínom (1% BSA v PBS). Peletku sme resuspendovali a rozdelili do 2 mikrocentrifugačných skúmaviek po 250 μ l a vložili do centrifúgy na 5 minút pri 1000 rpm a 4°C. Odsali sme PBS nad peletkou a pridali 1 kvapku R.T.U. 2,5% Normal Goat Serum (Vector Laboratories Ltd, UK). Úlohou séra je blokovanie nešpecifických miest na bunkách, aby sme zabránili nešpecifickému viazaniu protilátok. Následne sme pridali 150 μ l 1% BSA v PBS, zvortexovali a nechali 20 minút pri 4°C. Po uplynutí 20 minút sme premiestnili mikrocentrifugačné skúmavky do centrifúgy na 5 minút pri 1000 rpm a 4°C. Po centrifugácii sme odsali supernatant a k peletke sme pridali primárnu protilátku (buď 20 μ l Eng mouse anti human (P4A4) alebo 10 μ l MMP-14 mouse anti human conjugated with APC (FAB9181A, R&D Systems, Minnesota, USA)). Od tohto kroku bolo nutné pracovať v tme, aby nedošlo k predčasnému vyžiareniu fluorofóru naviazaného na protilátke. Precízne sme zmes zvortexovali a inkubovali 1 hodinu pri 4°C. Každých 20 minút sme zmes zvortexovali, aby nedochádzalo k usadovaniu buniek na dne mikrocentrifugačných skúmaviek.

Po uplynutí 1 hodiny sme k vzorkám pridali 0,25 μ l 1% BSA v PBS a scentrifugovali po dobu 5 minút pri 1000 rpm, 4°C a následne odsali supernatant.

Pri stanovovaní proteínových hladín Eng, sme ku všetkým vzorkám okrem negatívnej kontroly (kde sa nenachádzala primárna protilátka) pridali 100 µl sekundárnej protilátky Alexa Fluor 488 (goat anti mouse) (Invitrogen, Kalifornia, USA) nariadenú s PBS v pomere 1:600. Opäť sme vzorky nechali inkubovať 30 minút v tme pri 4°C. Po 30 minútach sme pridali 200 µl 1% BSA v PBS, vzorky sme vložili do centrifúgy na 5 minút pri 1000 rpm a 4°C. Pri stanovovaní hladín MMP-14 sme tento krok vynechali, keďže fluorofór bol naviazaný priamo na primárnej protilátke.

Po stočení sme odsali supernatant a vzorky nariedili 300 µl PBS. Zmes sme resuspendovali a preniesli do FACS túb, v ktorých prebehlo meranie.

Na samotné meranie sme si vzali aj zriedený propidium jodid s PBS v pomere 1:1 a pridali sme 2 µl do vzoriek, aby sme vedeli vylúčiť z našich meraní mŕtve bunky. Propidium jodid je farbivo, ktoré sa používa na označenie neživých buniek u prietokovej cytometrie. Meranie prebiehalo na prietokovom cytometry CytoFlex LX (Beckman Coulter, Kalifornia, USA).

Výsledky sme vyhodnocovali prostredníctvom programu CytExpert Acquisition and Analysis Software (verze 2.3, Beckman Coulter, Kalifornia, USA). Vypočítali sme si index relatívnej expresie vynásobením množstva buniek pozitívnych na protilátku a priemernej fluorescencie. Tento index sme previedli na percentá kontroly (vzorku/priemer kontroly*100).

Ďalej sme pri vyhodnocovaní použili štatistický program GraphPad Prism verzia 9.0.2 (GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

4.5 ELISA

Na ELISA analýzu sme použili médium z predchádzajúcich experimentov, ktoré bolo odobrané z premedikovaných Petriho misiek podľa experimentálneho dizajnu v tabuľke č.5, zcentrifugované pri 13200 rpm po dobu 10 minút a následne uchovávané pri -80°C.

Pre účely tejto diplomovej práce, nebola stanovovaná koncentrácia u skupín TRC a HG/TRC, keďže u TRC105 bola popísaná interferencia pri tomto type esejí [117].

Večer pred experimentom sme vzorky premiestnili z -80°C do 4°C, kde sme ich nechali cez noc rozmraziť.

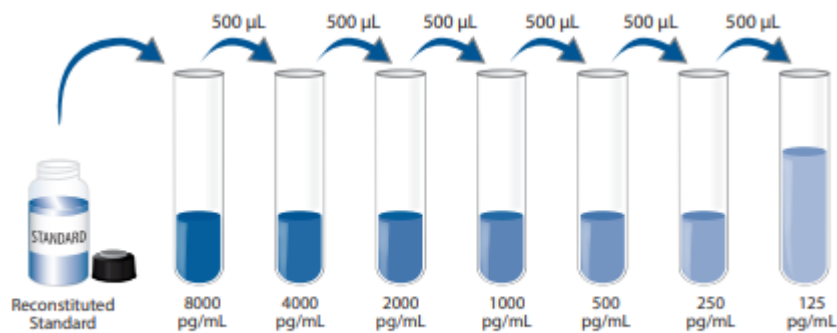
Ďalej sme tzv. „capture“ protilátku rekonštituovali pomocou 1 ml sterilného PBS a nechali 15 minút pri izbovej teplote. Potom sme 66,7 μ l tejto protilátky pridali do 12 ml PBS, zvortexovali a pridali 100 μ l do každej jamky na 96-jamkovej doštičke. Dosku sme prekryli adhéznou fóliou a nechali inkubovať cez noc pri izbovej teplote a 500 rpm.

Na druhý deň ráno, sme vybrali všetky komponenty potrebné na ELISA z chladničky a nechali ich pri izbovej teplote. Najprv sme si pripravili premývací roztok pridaním 20 ml koncentráту k 480 ml destilovanej vody. Ďalej sme si pripravili 150 ml tzv. „reagent diluentu“ a to tak, že koncentrovaný roztok sme nariedili s MiliQ v pomere 1:10.

Následne sme 96-jamkovú dosku trikrát premyli s premývacím roztokom (250 μ l/jamka). Potom sme zablokovali nešpecifické miesta v jamke pridaním reagent diluentu (300 μ l/jamka), ktorý sme nechali pôsobiť 1 hodinu pri izbovej teplote a pri 500 rpm.

Počas inkubácie sme najprv zrekonštituovali štandard endoglínu s 500 μ l reagent diluentu. 21 μ l tohto štandardu sme pridali k 979 μ l reagent diluentu. Tak sme vytvorili prvý bod našej kalibračnej krivky o koncentracii 8000 pg/ml. 500 μ l tohto roztoku sme potom pridali k 500 μ l reagent diluentu a vytvorili tak roztok o koncentracii 4000 pg/ml, podľa obrázku 26. Podobným spôsobom sme si pripravili aj ostatné roztoky našej sedem bodovej kalibračnej krivky.

Obrázok 26: Riedenie štandardu



Obrázok znázorňuje riedenie roztoku na kalibračnú krivku. Ako prvé sa odoberie 21 µl zrekonštituovaného štandardu (*reconstituted standard*) a pridá sa k 979 µl reagent diluentu. Táto koncentrácia je prvým bodom kalibračnej krivky. Následne sa v každom bode odoberie 500 µl z predchádzajúcej skúmavky a pridá sa k 500 µl reagent diluentu. Až kým nám nevznikne roztok o koncentrácii 125 pg/ml. Ako slepá vzorka bol použitý roztok samotného reagent diluentu.

Prevzatý z: *Human Endoglin/CD105 DuoSet ELISA* [online] Dostupný na:

https://www.rndsystems.com/products/human-endoglin-cd105-duoset-elisa_dy1097 [2021-04-10]

Po uplynutí inkubačnej doby nasledovalo premytie 96-jamkovej dosky premývacím roztokom (250 µl/jamku), ktoré sme zopakovali 3 razy. Potom sme do dosky v duplikátoch napipetovali pripravenú kalibračnú krivku, naše vzorky (ktoré boli nariadené s reagent diluentom v pomere 1:1) a nízky, stredný a vysoký štandard (100 µl/jamka) podľa tabuľky č. 10. Dosku sme opäť prelepili adhéznou fóliou a nechali inkubovať po dobu 2 hodín pri izbovej teplote a pri 500 rpm.

Tabuľka 10: Predloha na pipetovanie 96-jamkovej dosky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
B	125	125	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
C	250	250	HG1	HG2	HG3	HG4	HG5	HG6	HG7	HG8	HG9	HG10
D	500	500	HG1	HG2	HG3	HG4	HG5	HG6	HG7	HG8	HG9	HG10
E	1000	1000	nízky št. 1	nízky št. 1	stred. št. 1	stred. št. 1	vysoký št. 1	vysoký št. 1				
F	2000	2000	nízky št. 2	nízky št. 2	stred. št. 2	stred. št. 2	vysoký št. 2	vysoký št. 2				
G	4000	4000	nízky št. 3	nízky št. 3	stred. št. 3	stred. št. 3	vysoký št. 3	vysoký št. 3				
H	8000	8000	nízky št. 4	nízky št. 4	stred. št. 4	stred. št. 4	vysoký št. 4	vysoký št. 4				

K – kontrola, HG – vysoká hladina glukózy, nízky št. – nízky štandard, stred. št. – stredný štandard, vysoký št. – vysoký štandard

Opäť nasledovalo 3-násobné premývanie 96-jamkovej dosky. Potom sme do každej jamky pridali 100 µl roztoku detekčnej protilátky (66,7 µl rekonštituovanej protilátky bolo pridaných k 12 ml PBS), prikryli adhéznu fóliou a inkubovali 2 hodiny pri izbovej teplote a 500 rpm.

Po premytí sme do dosky napipetovali 100 µl/jamku roztoku Streptavidin-HRP (60 µl koncentráta bolo pridaných do 12 ml reagent diluentu) a prelepenú dosku sme nechali inkubovať 20 minút pri izbovej teplote, 500 rpm a v tme.

Následne sme dosku opäť 3krát premyli a potom sme do každej jamky pridali 100 µl roztoku substrátu (ktorý sme si pripravili zmiešaním 6 ml reagentu A a 6 ml reagentu B za tmy tesne pred použitím). 96-jamkovú dosku sme prelepili adhéznu fóliou a nechali inkubovať ďalších 20 minút pri izbovej teplote za tmy pri 500 rpm.

Nakoniec sme do každej jamky pridali 50 µl Stop roztoku (kyselina sírová).

Dosku sme umiestnili do spektrofotometra, ktorý umožňuje čítanie 96-jamkovej dosky, kde boli vzorky premiešané a potom bola odčítaná absorbancia pri 450 a 540 nm.

Po skončení merania sme dáta s hodnotami absorbancie exportovali do programu Microsoft Excel. Najprv sme odčítali hodnoty namerané pri 540 nm od hodnôt nameraných pri 450 nm. Ďalej sme od všetkých vzoriek odčítali hodnotu tzv. blank vzorku (súčasť kalibračnej krivky). Následne sme všetky duplikáty spriemerovali

a tieto hodnoty sme vložili do online softwaru Assayfit Pro, pomocou ktorého sme za využitia štvor-parametrovej logistickej krivky (four parametric logistic curve, 4-PL), získali hodnoty koncentrácií u našich vzoriek. Na vyhodnotenie rozdielu medzi našimi skupinami sme použili štatistický program GraphPad Prism verzia 9.0.2 (GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

5 VÝSLEDKY

Výsledky v tejto práci uvádzame ako priemer \pm štandardná odchýlka priemeru. Hladinu štatistickej významnosti (p) sme stanovili Mann-Whitney testom (neparametrický t-test). Za štatisticky významný rozdiel sa považuje hodnota $p \leq 0,05$. Štatisticky významné hodnoty sa označujú symbolom „*“, pričom platí, že: ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Na vyhodnotenie výsledkov sme použili štatistický program GraphPad Prism verzia 9.0.2 (GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

5.1 *qRT-PCR*:

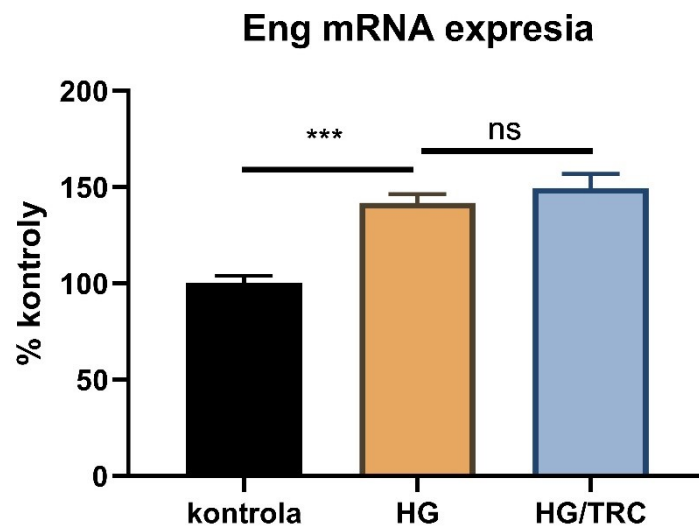
Pomocou metódy *qRT-PCR* sme stanovovali génovú expresiu Eng a jeho transkripčných faktorov, konkrétne KLF6 a RELA, a expresiu enzýmu MMP-14. Z dôvodu vyššej presnosti sme výsledky normalizovali na tzv. housekeepový gén HPRT1.

5.1.1 mRNA expresia Eng

Pomocou qRT-PCR metódy sme preukázali signifikantný rozdiel v génovej expresii Eng medzi kontrolnou skupinou a skupinou HG ($p < 0,001$). Expresia Eng bola u skupiny HG signifikantne vyššia ako u kontrolnej skupiny.

Pri porovnávaní skupín HG a HG/TRC sa nepreukázal žiadny signifikantný rozdiel ($p = 0,442$). Výsledky sú zobrazené v grafe č.1 a sú vyjadrené v % kontroly.

Graf 1: Expresia Eng



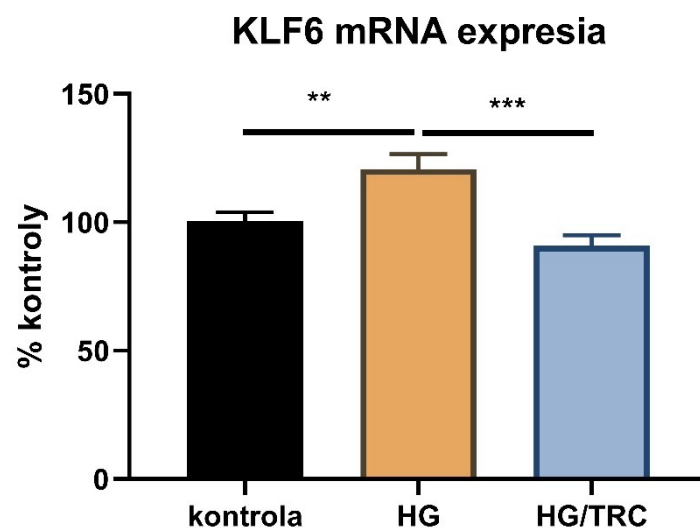
Graf vyjadruje mieru expresie Eng v jednotlivých experimentálnych skupinách. Stĺpec naľavo, označený ako kontrola, predstavuje kontrolnú skupinu s normálnymi hladinami glukózy. Druhý stĺpec (HG) predstavuje experimentálnu skupinu vystavenú vysokým dávkam glukózy a posledný stĺpec (HG/TRC) predstavuje experimentálnu skupinu s vysokou hladinou glukózy a liečivom TRC105. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.1.2 mRNA expresia KLF6

Pri vyhodnocovaní génovej expresie transkripčného faktoru KLF6 sme preukázali štatisticky významne vyššie hodnoty u experimentálnej HG skupiny ($p=0,005$) v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Génová expresia KLF6 u experimentálnej skupiny HG/TRC bola signifikantne nižšia ako u skupiny HG ($p<0,001$). Výsledky sú zobrazené v grafe č.2 a sú vyjadrené v % kontroly.

Graf 2: Expresia KLF6



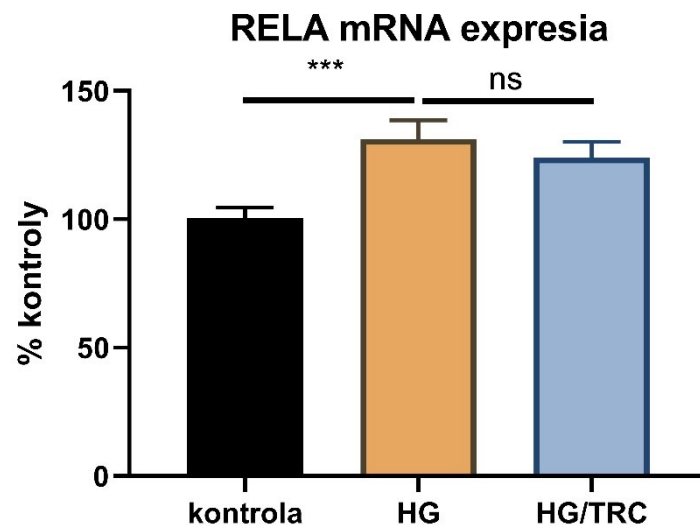
Ľavý stĺpec grafu zobrazuje mieru expresie KLF6 v kontrolnej skupine (kontrola). Stĺpec označený HG predstavuje experimentálnu skupinu, ktorá bola vystavená vysokým hladinám glukózy. Stĺpec vpravo predstavuje experimentálnu skupinu vystavenú vysokým hladinám glukózy a pridanému liečivu TRC105 (HG/TRC). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.1.3 mRNA expresia RELA

Štatisticky významné zvýšenie expresie RELA bolo preukázané u experimentálnej skupiny HG v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,001$).

U experimentálnej skupiny HG/TRC sa neprejavil signifikantný rozdiel v expresii RELA oproti skupine HG ($p = 0,721$). Výsledky sú zobrazené v grafe č.3 a sú vyjadrené v % kontroly.

Graf 3: Expresia RELA



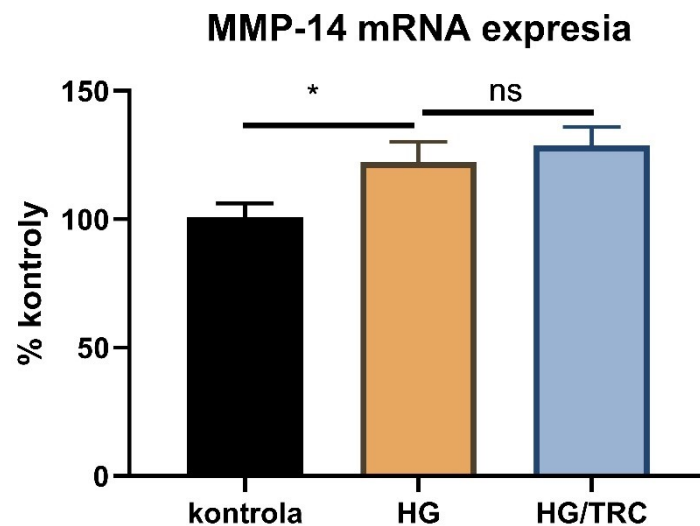
Na ľavej strane grafu je zobrazená expresia génu RELA v kontrolnej skupine (kontrola). Stredný stĺpec grafu predstavuje expresiu v experimentálnej skupine, vystavenú vysokým hladinám glukózy (HG). Stĺpec vpravo zobrazuje expresiu génu v experimentálnej skupine vystavenej vysokým dávkam glukózy a liečivu TRC105 (HG/TRC). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.1.4 mRNA expresia MMP-14

Pomocou metódy qRT-PCR sme preukázali signifikantne vyššiu expresiu enzýmu MMP-14 u experimentálnej skupiny HG oproti kontrolnej skupine ($p=0,021$).

Pri porovnávaní výsledkov expresie MMP-14 u experimentálnych skupín HG a HG/TRC sa signifikantný rozdiel nepreukázal ($p=0,645$). Výsledky sú zobrazené v grafe č.4 a sú vyjadrené v % kontroly.

Graf 4: Expresia MMP-14



Ľavý stĺpec grafu zobrazuje mieru expresie MMP-14 v kontrolnej skupine (kontrola). Prostredný stĺpec označený HG predstavuje experimentálnu skupinu, ktorá bola vystavená vysokým hladinám glukózy. Stĺpec úplne vpravo predstavuje experimentálnu skupinu vystavenú vysokým hladinám glukózy a pridanému liečivu TRC105 (HG/TRC). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

5.2 Prietoková cytometria

Metódou prietokovej cytometrie sme stanovili proteínové hladiny Eng a enzýmu MMP-14. V prvom rade sme porovnávali proteínové hladiny medzi skupinou vystavenou normálnym hladinám glukózy bez pridaného liečiva (kontrola) a skupinou s normálnymi hladinami glukózy a liečivom (TRC). Ďalej sme porovnávali kontrolnú skupinu a skupinu vystavenú vysokým hladinám glukózy bez pridaného liečiva (HG). Nakoniec sme porovnali skupinu HG a experimentálnu skupinu s vysokými hladinami glukózy a liečivom (HG/TRC). Výsledky sme zobrazili vo forme grafov a vyjadrili v % kontroly.

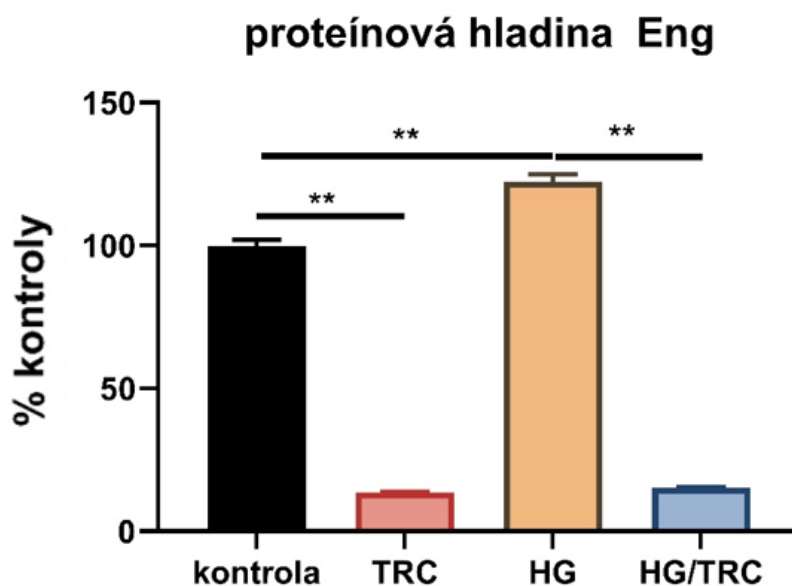
5.2.1 Proteínová hladina Eng

Metódou prietokovej cytometrie sme preukázali signifikantne nižšie ($p=0,004$) proteínové hladiny Eng v skupine s TRC105 (TRC) v porovnaní s kontrolnou skupinou (kontrola).

Pri porovnávaní zmien proteínových hladín Eng medzi kontrolnou skupinou (kontrola) a experimentálnou skupinou s vysokou glukózou (HG) sme zaznamenali signifikantný nárast ($p=0,004$) v skupine HG.

Medzi experimentálnymi skupinami HG a HG/TRC sa prejavil signifikantný pokles ($p=0,004$) proteínovej hladiny Eng v experimentálnej skupine HG/TRC. Výsledky sú zobrazené v grafe č.5 a sú vyjadrené v % kontroly.

Graf 5: Proteínová hladina Eng



Ľavý stĺpec grafu predstavuje proteínové hladiny Eng v kontrolnej skupine (kontrola). Druhý stĺpec zľava označený ako TRC, zobrazuje proteínovú hladinu Eng v skupine s normálnou glukózou a pridaným liečivom TRC105. Stĺpec v grafe označený ako HG, predstavuje proteínovú hladinu Eng v experimentálnej skupine s vysokými dávkami glukózy. Stĺpec vpravo zobrazuje proteínovú hladinu Eng v experimentálnej skupine vystavenej vysokým dávkam glukózy a liečivu TRC105 (HG/TRC). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

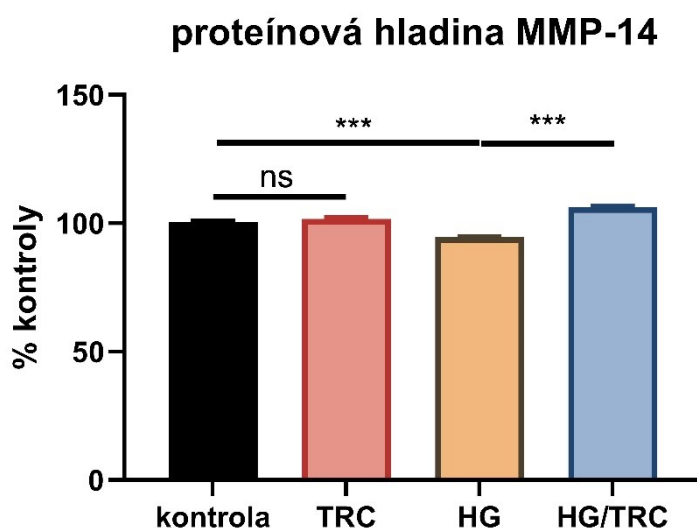
5.2.2 Proteínová hladina MMP-14

Proteínová hladina MMP-14 sa signifikantne nelíšila ($p=0,228$) medzi skupinami kontrola a TRC.

Medzi kontrolnou skupinou (kontrola) a skupinou s vysokou glukózou (HG) bol zaznamenaný signifikantný pokles ($p<0,001$) proteínových hladín MMP-14 u experimentálnej skupiny HG.

Porovnanie proteínových hladín MMP-14 medzi experimentálnymi skupinami HG a HG/TRC preukázalo štatisticky významný nárast ($p<0,001$) týchto hladín v skupine HG/TRC. Výsledky sú zobrazené v grafe č.6 a sú vyjadrené v % kontroly.

Graf 6: Proteínová hladina MMP-14



Vľavo na grafe je stĺpec predstavujúci proteínovú hladinu MMP-14 v kontrolnej skupine (kontrola). Druhý stĺpec označený ako TRC, zobrazuje proteínovú hladinu MMP-14 v kontrolnej skupine s pridaným liečivom TRC105. Stĺpec v grafe označený HG, predstavuje proteínovú hladinu MMP-14 v experimentálnej skupine s vysokými dávkami glukózy. Pravý stĺpec v grafe zobrazuje proteínovú hladinu MMP-14 v experimentálnej skupine vystavenej vysokým dávkam glukózy a liečivu TRC105 (HG/TRC105). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

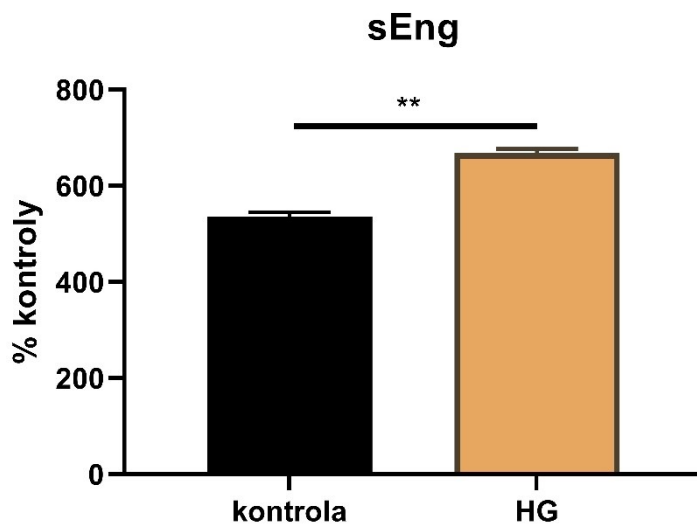
5.3 ELISA

Metódou ELISA sme vyhodnocovali hladiny sEng v médiu. Porovnávali sme množstvá sEng v médiu získaného z kontrolnej skupiny (kontrola), ktorá bola vystavená normálnym hladinám glukózy a experimentálnej skupiny (HG), ktorá bola vystavená vysokým hladinám glukózy. Výsledok sme zobrazili pomocou grafu a vyjadrili sme ho v % kontroly.

5.3.1 hladiny sEng v médiu

Pomocou metódy ELISA sme preukázali signifikantný rozdiel koncentrácie sEng u kontrolnej skupiny v porovnaní s experimentálnou skupinou HG. V skupine HG boli hladiny sEng štatisticky významne vyššie ($p=0,002$). Výsledky sú zobrazené v grafe č.7 a sú vyjadrené v % kontroly.

Graf 7: Hladiny sEng



Ľavý stĺpec grafu ukazuje množstvo sEng v kontrolnej skupine (kontrola). Pravý stĺpec grafu zobrazuje množstvo sEng v experimentálnej skupine (HG). Výsledky sú vyjadrené v % kontroly.

6 DISKUSIA

Eng je významne exprimovaný v arteriálnych endotelových bunkách. Bolo dokázané, že expresia Eng sa vyskytuje u myších modelov aterosklerózy len v aortálnych endotelových bunkách. U iných buniek aterosklerotickej lézie expresia Eng nebola detekovaná [41]. Navyše expresia membránového Eng poklesla v rozvinutom aterosklerotickom pláte, čo nasvedčuje, že jeho expresia sa znižuje s progresiou aterosklerózy [47, 118]. Okrem toho, expresia membránového Eng bola znížená u ľudských endotelových buniek získaných z umbilikálnej žily (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), ktoré boli vystavené prezápalovej stimulácii TNF- α po dobu 24 hodín [119]. Na druhej strane, membránový Eng sa zúčastňuje zápalovej infiltrácie leukocytov *in vitro* a aj *in vivo*, kde sa predpokladá, že má podpornú úlohu pri zápale [53, 120]. Tieto výsledky poukazujú na komplexnú reguláciu expresie a tiež aj funkcie Eng počas ED a zápalu, ktoré sú významné pre rozvoj aterosklerózy.

Hyperglykémia je jedným zo symptómov metabolického syndrómu a príznakom ochorenia DM, ale úloha Eng a sEng pri hyperglykémii nie je presne známa.

Novým prístupom v liečbe určitých ochorení je použitie monoklonálnych protilátok, ktoré cielia presnejšie na pozmenené alebo toxické proteíny. Carotuximab (TRC105) je ľudská/myšia terapeutická monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na ľudský ale aj myšiu Eng, avšak má vyššiu afinitu k ľudskému Eng [121]. V súčasnosti nie sú štúdie, ktoré by ukazovali účinky TRC105 vo vzťahu k rozvoju ED za hyperglykemických podmienok.

V tejto diplomovej práci sme sa zameriavali na popísanie účinku pôsobenia vysokých hladín glukózy, ktorými sme simulovali hyperglykémiu podobne ako pri DM2 a metabolickom syndróme v *in vivo* podmienkach, na expresiu Eng a taktiež aj transkripčných faktorov podieľajúcich sa na expresii Eng vzhľadom k liečbe pomocou TRC105. Taktiež sme sa sústredili na štúdium zmien hladín sEng pri hyperglykémii.

Vystavenie vysokým hladinám glukózy signifikantne zvýšilo mRNA expresiu Eng, KLF6 a RELA v porovnaní s kontrolnou skupinou. Tieto výsledky poukazujú na to, že vysoké hladiny glukózy aktivujú transkripciu faktorov zúčastňujúcich sa na expresii Eng, čo bolo potvrdené zvýšenými proteínovými hladinami Eng po vystavení buniek vysokým hladinám glukózy. Podobne ako v predchádzajúcich výsledkoch

publikovaných Vicenom a kol., ktorí zistili, že simulovanie hypercholesterolémie 7-ketocholesterolom vyvoláva expresiu Eng u HAEC prostredníctvom aktivácie transkripčných faktorov, vrátane KLF6 a RELA [66, 122, 123]. Taktiež ďalšia *in vitro* štúdia, realizovaná na HUVECs vystavených vysokým hladinám glukózy (25 mmol/l) alebo oscilujúcim hladinám glukózy (5-25 mmol/l), viedla k zvýšeniu mRNA expresie Eng a KLF6 [124]. Tieto údaje poukazujú na to, že vystavenie endotelových buniek rizikovým faktorom, ktoré sa podieľajú na rozvoji ED, zvyšuje expresiu Eng. Ďalej bolo popísané, že zvýšená expresia Eng zvyšuje adhéziu a transmigráciu monocytov cez endotel, čo naznačuje rozhodujúcu úlohu Eng v tomto procese [8].

V ďalšej časti tejto diplomovej práce sme sa venovali vyhodnoteniu možných zmien hladín sEng v dôsledku vystavenia buniek vysokým hladinám glukózy.

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) sú endopeptidázy závislé na zinku s rôznymi a často protichodnými účinkami v organizme. Doteraz sa preukázalo, že len 2 typy MMPs sú schopné štiepiť membránový Eng a tak uvoľniť sEng, sú to MMP-12 a MMP-14 [125, 126]. Zistili sme, že vysoká hladina glukózy zvyšuje expresiu MMP-14 a u proteínových hladín MMP-14 sme zaznamenali len mierny pokles. Tieto výsledky mohli byť spôsobené tým, že sme vybrali analýzu vzorky pomocou extracelulárnej prietokovej cytometrie a neuskutočnili sme analýzu intracelulárnou prietokovou cytometriou a nemerali sme aktivitu proteínu. Napriek tomu hladiny sEng boli zvýšené po vystavení vysokým hladinám glukózy. Tieto výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi publikáciami, ktoré ukazujú, že plazmatické koncentrácie sEng boli zvýšené u pacientov s pokročilým DM a koncentrácia sEng pozitívne koreluje so závažnými vaskulárnymi zmenami vyvolanými DM, ako sú retinopatie, diabetická periférna neuropatia a nefropatia [54, 127-129]. Nemôžeme však objasniť presný mechanizmus uvoľňovania sEng, a preto by sa mali uskutočniť ešte ďalšie výskumy s MMP-14 a MMP-12.

Ďalej sme sa rozhodli v tejto diplomovej práci využiť TRC105 na dôkaz, či môže za hyperglykemických podmienok ovplyvniť expresiu Eng, transkripčných faktorov a MMP-14.

Analýza qRT-PCR preukázala, že TRC105 neovplyvňuje génovú expresiu Eng vyvolanú vysokými hladinami glukózy. TRC105 znížilo génovú expresiu KLF6, avšak

nie génovú expresiu RELA. Bolo dokázané, že oba, KLF6 aj RELA, sú svojim spoločným pôsobením kľúčové pri ovplyvnení expresie Eng [8]. Preto predpokladáme, že nakoľko TRC105 nespôsobilo zmeny u oboch transkripčných faktorov rovnako, nebola expresia Eng ovplyvnená.

Analýza prietokovou cytometriou odhalila, že TRC105 blokuje Eng, ako bolo uvedené v iných publikáciách [130]. Preukázali sme, že vystavenie buniek vysokým hladinám glukózy zvýšilo expresiu Eng v membráne HAEC, čo naznačuje vyššie hladiny Eng v týchto bunkách. Avšak sme dokázali, že TRC105 blokuje expresiu Eng aj po vystavení buniek vysokým hladinám glukózy v porovnaní s HAEC, ktoré boli vystavené len vysokým hladinám glukózy. To naznačuje, že môžeme očakávať blokovanie alebo inhibíciu účinkov Eng, ako už bolo naznačené skôr [8].

Hladiny sEng nebolo možné merať po vystavení buniek TRC105, nakoľko táto protilátka interferovala s komponentami, ktoré sa používajú pri metóde ELISA.

V tejto diplomovej práci sme preukázali, že vysoké hladiny glukózy zvyšujú expresiu membránového Eng a hladiny sEng. Okrem toho sme zistili, že TRC105 blokuje expresiu Eng bez priameho zapojenia transkripčných faktorov. Analýza funkčných dôsledkov získaných výsledkov v tejto diplomovej práci bude predmetom ďalších štúdií.

7 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť vplyv carotuximabu na expresiu Eng, jeho transkripčných faktorov a MMP-14 u endotelových buniek vystavených vysokým hladinám glukózy.

Výsledky tejto diplomovej práce preukázali, že po pôsobení vysokých hladín glukózy na endotelové bunky bola signifikantne zvýšená génová expresia Eng, transkripčných faktorov a MMP-14 a taktiež proteínová hladina Eng. Avšak u proteínových hladín MMP-14 bol zaznamenaný mierny pokles. Hoci sme zaznamenali pokles génovej expresie KLF6 po podaní carotuximabu, nedošlo k zmene génovej expresie u Eng a k poklesu proteínových hladín Eng dochádza inými mechanizmami. Napriek tomu, že u buniek vystavených vysokým hladinám glukózy sa nepreukázal vplyv carotuximabu na génovú expresiu MMP-14, na proteínovej hladine sme zaznamenali mierny nárast, čo by potenciálne mohlo znamenať nárast hladín sEng.

Tieto výsledky preukazujú, že carotuximab má vplyv na proteínové hladiny Eng a MMP-14, ale funkčné dôsledky týchto zmien musia byť ďalej preskúmané.

8 POUŽITÉ SKRATKY

skratka	význam skratky	slovenský význam
ACE	angiotensin-converting enzyme	angiotenzín-konvertujúci enzým
ACTB	beta-actin	beta aktín
AGEs	advanced glycation end products	konečné produkty pokročilej glykácie
ALK	activin-like kinase	kináza podobná aktivínu
ALP	alkaline phosphatase	zásaditá fosfatáza
API	aqua pro injectione	voda pre injekcie
ATP	adenosine triphosphate	adenozíntrifosfát
BH4	tetrahydrobiopterin	tetrahydrobiopterín
BMP9	bone morphogenetic protein 9	kostný morfogenetický proteín 9
BSA	bovine serum albumin	hovädzí sérový albumín
cAMP	cyclic 3'5'-adenosine monophosphate	cyklický 3'5'-adenozín monofosfát
cDNA	complementary DNA	komplementárna DNA
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	cyklický guanozín monofosfát
CRP	C-reactive protein	C-reaktívny proteín
Ct	cycle treshold	prahový cyklus
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus type 1	diabetes mellitus 1. typu
DM2	diabetes mellitus type 2	diabetes mellitus 2. typu
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates	deoxynukleotidtrifosfáty
ED	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkcia
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor	endotelový hyperpolarizačný faktor
EGM-2	endothelial cell growth medium	médium pre rast endotelových buniek
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	imunoenzymetické stanovenie
Eng	endoglin	endoglin

eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ET-1	endothelin-1	endotelín-1
ET-A	endothelin-A	endotelín-A
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavínadenínindinukleotid
FBS	fetal bovine serum	fetálne hovädzie sérum
FC	flow cytometry	prietoková cytometria
FFA	free fatty acids	voľné mastné kyseliny
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový rastový faktor
FMN	flavin mononucleotide	flavínmononukleotid
FRET	fluorescence resonance energy transfer	transfer fluorescenčnej rezonančnej energie
FSC	forward scatter	predný rozptyl
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GC	guanylate cyclase	guanylát cykláza
GLU	glucose	glukóza
GLUT-1	glucose transporter-1	transportér pre glukózu-1
GLUT-4	glucose transporter-4	transportér pre glukózu-4
HAEC	human aortic endothelial cells	ľudské endotelové bunky aorty
hEGF	human epidermal growth factor	ľudský epidermálny rastový faktor
HG	high glucose	vysoké hladiny glukózy
HIF-1-α	hypoxia-inducible factor 1 alpha	hypoxiou indukovateľný faktor 1 alfa
HLA	human leukocyte antigen	hlavný histokompatibilný systém
HPRT-1	hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	hypoxantín fosforibosyltransferáza 1
HRP	horseradish peroxidase	chrenová peroxidáza
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells	ľudské endotelové bunky získané z umbilikálnej žily

ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	medzibunková adhézna molekula 1
IF	imunofluorescence	imunofluorescencia
IL-1	interleukin-1	interleukín-1
IL-6	interleukin-6	interleukín-6
iNOS	inducible nitric oxide synthase	indukovateľná syntáza oxidu dusnatého
IPA	isopropyl alcohol	isopropylalkohol
IRS	insulin receptor substrate	substráty inzulínového receptoru
KLF6	Krüpple-like factor 6	Krüpple-like faktor 6
LDL	low-density lipoproteins	nízko-denzitné lipoproteíny
L-Eng	long-endoglin	dlhý endoglin
LXR	liver X nuclear receptor	pečeňový X jadrový receptor
MAN	mannitol	manitol
MMP-12	matrix metalloproteinase-12	matrixová metaloproteináza-12
MMP-14	matrix metalloproteinase-14	matrixová metaloproteináza-14
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotínamid adenín dinukleotid fosfát
NF-κB	nuclear factor kappa B	nukleárny faktor kappa B
nNOS	neuronal nitric oxide synthase	neuronálna syntáza oxidu dusnatého
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
NOS	nitric oxide synthase	syntáza oxidu dusnatého
OD	orphan domain	sirotská doména
oGTT	oral glucose-tolerance test	orálny glukózo-tolerančný test
PBS	phosphate buffer saline	fosfátový tlmivý roztok
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová reťazová reakcia
PGH2	prostaglandin H2	prostaglandín H2
PGI2	prostacyclin	prostacyklín
PI3K	phosphoinositide-3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain	kvantitatívna real-time

	reaction	polymerázová reakcia
R3-IGF	recombinant insulin-like growth factor	rekombinantný rastový faktor podobný inzulínu
RELA	nuclear factor kappa B subunit phosphorylated on carbon 65	podjednotka nukleárneho faktoru kappa B fosforylovaná na uhlíku 65
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species	reaktívne formy kyslíku
rRNA	ribosomal RNA	ribozomálna RNA
sEng	soluble endoglin	solubilný endoglin
S-Eng	short-endoglin	krátky endoglin
Sp1	specific protein 1	špecifický proteín 1
SSC	side scatter	bočný rozptyl
TGF-β	transforming growth factor beta	transformujúci rastový faktor beta
TGF-βR	transforming growth factor beta receptor	receptor transformujúceho rastového faktoru beta
TNF-α	tumor necrosis factor-alfa	tumor nekrotizujúci faktor- alfa
t-PA	tissue plasminogen activator	tkanivový aktivátor plazminogénu
TXA₂	thromboxane A2	tromboxan A2
uPA	urokinase plasminogen activator	urokinátový typ plazminogénového aktivátora
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	cievna adhézna molekula-1
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulárny endotelový rastový faktor
vWF	von Willebrand factor	von Willebrandov faktor
ZP	zona pellucida	zóna pellucida

9 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Hodnoty glykémie.....	32
Tabuľka 2: Diagnostické kritériá metabolického syndrómu.....	34
Tabuľka 3: Experimentálny design premedikácie PCR.....	64
Tabuľka 4: Experimentálny design premedikácie FC	65
Tabuľka 5: Experimentálny design premedikácie ELISA	65
Tabuľka 6: Riedenie vzoriek.....	70
Tabuľka 7: Príprava master mixu	71
Tabuľka 8: Príprava master mixu PCR.....	71
Tabuľka 9: Predloha na pipetovanie 96-jamkovej dosky	72
Tabuľka 10: Predloha na pipetovanie 96-jamkovej dosky	77

10 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Endotel	12
Obrázok 2: Rizikové faktory vzniku endotelovej dysfunkcie	18
Obrázok 3: Štruktúra endoglínu.....	20
Obrázok 4: TGF β signalizačná kaskáda	22
Obrázok 5: Funkcia endoglínu pri ateroskleróze	24
Obrázok 6: Vznik solubilného endoglínu	26
Obrázok 7: Syntéza inzulínu.....	29
Obrázok 8: Uvoľnenie inzulínu z pankreasu	30
Obrázok 9: Inzulínová signalizácia.....	31
Obrázok 10: Patofyziológia DM2.....	35
Obrázok 11: Mechanizmus účinku TRC105	39
Obrázok 12: Fázy PCR	42
Obrázok 13: TaqMan sonda.....	44
Obrázok 14: Graf amplifikácie	45
Obrázok 15: Hydrodynamická fokusácia	48
Obrázok 16: Laserový rozptyl	49
Obrázok 17: Časti prietokovej cytometrie	50
Obrázok 18: Histogram.....	51
Obrázok 19: Bodový graf	52
Obrázok 20: Priama a nepriama prietoková cytometria	53
Obrázok 21: Princíp priamej metódy ELISA	55
Obrázok 22: Typy metódy ELISA.....	58
Obrázok 23: HAEC.....	60
Obrázok 24: Pasážovanie buniek.....	63
Obrázok 25: Rozdelenie fáz po chloroforme	68
Obrázok 26: Riedenie štandardu.....	76

11 ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Expresia Eng.....	80
Graf 2: Expresia KLF6	81
Graf 3: Expresia RELA.....	82
Graf 4: Expresia MMP-14	83
Graf 5: Proteínová hladina Eng	85
Graf 6: Proteínová hladina MMP-14	86
Graf 7: Hladiny sEng	87

12 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Carrizzo, A., et al., *The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
2. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2012. **35 Suppl 1**: p. S64-71.
3. Pi, X., et al., *Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis*. Circ Res, 2018. **123**(4): p. 477-494.
4. Bernatova, I., et al., *Endothelium in diseased states*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 810436.
5. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
6. Endemann, D.H., et al., *Endothelial dysfunction*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 1983-92.
7. Vrablík, M., et al., *Endoteliální dysfunkce - první stadium aterosklerózy*. Medicine for practice, 2011. **8**(3): p. 119-122.
8. 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.
9. Schoonderwoerd, M.J.A., et al., *Endoglin: Beyond the Endothelium*. Biomolecules, 2020. **10**(2).
10. Lopez-Novoa, J.M., et al., *The physiological role of endoglin in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(4): p. H959-74.
11. Davignon, J., et al., *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
12. Rossi, E., et al., *Endoglin as an Adhesion Molecule in Mature and Progenitor Endothelial Cells: A Function Beyond TGF-beta*. Front Med (Lausanne), 2019. **6**: p. 10.
13. Duffy, A.G., et al., *Phase I and Preliminary Phase II Study of TRC105 in Combination with Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(16): p. 4633-4641.

14. TRACON Pharmaceuticals, I. *TRACON Pharmaceuticals Announces Termination Of Phase 3 TAPPAS Trial Based On The Recommendation Of The Independent Data Monitoring Committee*. TRACON PHARMA. <https://traconpharma.gcs-web.com/news-releases/news-release-details/tracon-pharmaceuticals-announces-termination-phase-3-tappas>, 2019. [cited 2021-04-25].
15. Kumar, S., et al., *Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF-beta signaling*. *Oncogene*, 2014. **33**(30): p. 3970-9.
16. Kruger-Genge, A., et al., *Vascular Endothelial Cell Biology: An Update*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(18).
17. Poursaleh, A., et al., *Isolation of intimal endothelial cells from the human thoracic aorta: Study protocol*. *Med J Islam Repub Iran*, 2019. **33**: p. 51.
18. Pecka, M., *Laboratorní hematologie v přehledu. Buňka a krevetvorba*. 2002, Český Těšín: FINIDR, s.r.o. 160.
19. Karásek, D., et al., *Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi*. *Internal Medicine for Practice*, 2004. **6**(9): p. 450-453.
20. Marti, C.N., et al., *Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(16): p. 1455-69.
21. Ghosh, A., et al., *Role of free fatty acids in endothelial dysfunction*. *J Biomed Sci*, 2017. **24**(1): p. 50.
22. Karetová, D., *Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob*. *Internal Medicine for Practice*, 2002. **4**(3): p. 119-122.
23. Durand, M.J., et al., *Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease*. *Microcirculation*, 2013. **20**(3): p. 239-47.
24. Galley, H.F., et al., *Physiology of the endothelium*. *Br J Anaesth*, 2004. **93**(1): p. 105-13.
25. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. *Int J Biol Sci*, 2013. **9**(10): p. 1057-69.
26. Trojan, S., et al., *Fyziologie: Učebnice pro lékařské fakulty*. 1988, Praha: AVICENUM. 565.
27. Vischer, U.M., *von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(6): p. 1186-93.

28. Stanek, A., et al., *The Role of Endothelium in Physiological and Pathological States: New Data*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 1098039.
29. Forstermann, U., et al., *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
30. Vestweber, D., *Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1257**: p. 184-92.
31. Claesson-Welsh, L., *Vascular permeability--the essentials*. Ups J Med Sci, 2015. **120**(3): p. 135-43.
32. Park, K.H., et al., *Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches*. J Korean Med Sci, 2015. **30**(9): p. 1213-25.
33. Lawson, C., et al., *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
34. Celermajer, D.S., *Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?* J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(2): p. 325-33.
35. Mason, J.C. *Vascular cytoprotection, autoimmune disease, and premature atherosclerosis*. 2018. **13**, 121-128.
36. Gougos, A., et al., *Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8361-4.
37. Garcia-Pozo, L., et al., *[Endoglin: structure, biological functions, and role in fibrogenesis]*. Rev Esp Enferm Dig, 2008. **100**(6): p. 355-60.
38. Altomonte, M., et al., *Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma*. Br J Cancer, 1996. **74**(10): p. 1586-91.
39. Meurer, S.K., et al., *Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(23).
40. Alt, A., et al., *Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e29948.
41. Nachtigal, P., et al., *The role of endoglin in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2012. **224**(1): p. 4-11.
42. Yamashita, H., et al., *Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 1995-2001.

43. Gallardo-Vara, E., et al., *Endoglin Protein Interactome Profiling Identifies TRIM21 and Galectin-3 as New Binding Partners*. *Cells*, 2019. **8**(9).
44. Igreja Sa, 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).
45. Vicen, M., et al., *Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome*. *Cell Mol Life Sci*, 2021. **78**(6): p. 2405-2418.
46. Pece, N., et al., *Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(10): p. 2568-79.
47. Rathouska, J., et al., *Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction*. *Atherosclerosis*, 2015. **243**(2): p. 383-8.
48. Inman, G.J., *Linking Smads and transcriptional activation*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 1): p. e1-e3.
49. Moustakas, A., et al., *The regulation of TGFbeta signal transduction*. *Development*, 2009. **136**(22): p. 3699-714.
50. Whitman, M., et al., *TGFbeta signaling at the summit*. *Development*, 2005. **132**(19): p. 4205-10.
51. Jang, Y.S., et al., *Contrasting roles of different endoglin forms in atherosclerosis*. *Immune Netw*, 2014. **14**(5): p. 237-40.
52. Nemeckova, I., et al., *High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119665.
53. Ruiz-Remolina, L., et al., *Circulating soluble endoglin modifies the inflammatory response in mice*. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0188204.
54. Blazquez-Medela, A.M., et al., *Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients*. *BMC Med*, 2010. **8**: p. 86.
55. Vitverova, B., et al., *Long term effects of soluble endoglin and mild hypercholesterolemia in mice hearts*. *PLoS One*, 2020. **15**(5): p. e0233725.

56. Ceriello, A., et al., *GLP-1 reduces metalloproteinase-9 induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes. The possible role of oxidative stress.* Ther Clin Risk Manag, 2015. **11**: p. 901-3.
57. Vaquerizas, J.M., et al., *A census of human transcription factors: function, expression and evolution.* Nat Rev Genet, 2009. **10**(4): p. 252-63.
58. Lambert, S.A., et al., *The Human Transcription Factors.* Cell, 2018. **172**(4): p. 650-665.
59. McConnell, B.B., et al., *Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases.* Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1337-81.
60. Andreoli, V., et al., *Biology of Kruppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death.* IUBMB Life, 2010. **62**(12): p. 896-905.
61. Kim, G.D., et al., *Kruppel-like factor 6 promotes macrophage inflammatory and hypoxia response.* FASEB J, 2020. **34**(2): p. 3209-3223.
62. Botella, L.M., et al., *TGF-beta regulates the expression of transcription factor KLF6 and its splice variants and promotes co-operative transactivation of common target genes through a Smad3-Sp1-KLF6 interaction.* Biochem J, 2009. **419**(2): p. 485-95.
63. Zhang, Y., et al., *Kruppel-like factor 6 is a co-activator of NF-kappaB that mediates p65-dependent transcription of selected downstream genes.* J Biol Chem, 2014. **289**(18): p. 12876-85.
64. Vallabhapurapu, S., et al., *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
65. Amoah-Apraku, B., et al., *NF-kappa B and transcriptional control of renal epithelial-inducible nitric oxide synthase.* Kidney Int, 1995. **48**(3): p. 674-82.
66. van Uden, P., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB.* Biochem J, 2008. **412**(3): p. 477-84.
67. Kordač, V., et al., *Vnitřní lékařství III.* 1991, Praha: AVICENUM. 620.
68. Vlček, J., et al., *Klinická farmacie I.* 2011: Grada. 368.
69. Baeshen, N.A., et al., *Cell factories for insulin production.* Microb Cell Fact, 2014. **13**: p. 141.
70. Navale, A.M., et al., *Glucose transporters: physiological and pathological roles.* Biophys Rev, 2016. **8**(1): p. 5-9.
71. Klener, P., et al., *Vnitřní lékařství.* 2011: Galén. 1174.

72. Boland, B.B., et al., *The dynamic plasticity of insulin production in beta-cells*. Mol Metab, 2017. **6**(9): p. 958-973.
73. Kahn, C.R., et al., *The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action*. J Clin Invest, 1988. **82**(4): p. 1151-6.
74. Wilcox, G., *Insulin and insulin resistance*. Clin Biochem Rev, 2005. **26**(2): p. 19-39.
75. Karen, I., et al., *Diabetes mellitus. Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře*. 2020, Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP. 24.
76. Petersmann, A., et al., *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019. **127**(S 01): p. S1-S7.
77. Bluestone, J.A., et al., *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
78. Gillespie, K.M., *Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention*. CMAJ, 2006. **175**(2): p. 165-70.
79. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
80. Kao, K.T., et al., *Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents*. Aust Fam Physician, 2016. **45**(6): p. 401-6.
81. Skyler, J.S., et al., *Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis*. Diabetes, 2017. **66**(2): p. 241-255.
82. Rosen, L.S., et al., *A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4820-9.
83. TRACON Pharmaceuticals, I. *TRACON Pharmaceuticals Announces TRC105, TRC253 And TRC102 Data Presentations At Upcoming AACR Annual Meeting*. TRACON PHARMA. <https://traconpharma.gcs-web.com/news-releases/news-release-details/tracon-pharmaceuticals-announces-trc105-trc253-and-trc102-data>, 2019. [cited 2021 04-25].
84. Karzai, F.H., et al., *A phase I study of TRC105 anti-endoglin (CD105) antibody in metastatic castration-resistant prostate cancer*. BJU Int, 2015. **116**(4): p. 546-55.

85. Brossa, A., et al., *Effect of the monoclonal antibody TRC105 in combination with Sunitinib on renal tumor derived endothelial cells*. *Oncotarget*, 2018. **9**(32): p. 22680-22692.
86. Rosen, L.S., et al., *Endoglin for targeted cancer treatment*. *Curr Oncol Rep*, 2014. **16**(2): p. 365.
87. European Medicines Agency, *Notification of discontinuation of a paediatric development which is covered by an agreed PIP Decision*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/carotuximab-notification-discontinuation-paediatric-development-which-covered-agreed-paediatric_en.pdf, 2019. [cited 2021- 04-19].
88. Garibyan, L., et al., *Polymerase chain reaction*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(3): p. 1-4.
89. Ramesh, R., et al., *Polymerase chain reaction*. *Natl Med J India*, 1992. **5**(3): p. 115-9.
90. Green, M.R., et al., *Polymerase Chain Reaction*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019. **2019**(6).
91. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
92. Powledge, T.M., *The polymerase chain reaction*. *Adv Physiol Educ*, 2004. **28**(1-4): p. 44-50.
93. Guescini, M., et al., *A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition*. *BMC Bioinformatics*, 2008. **9**: p. 326.
94. Wong, M.L., et al., *Real-time PCR for mRNA quantitation*. *Biotechniques*, 2005. **39**(1): p. 75-85.
95. Kozera, B., et al., *Reference genes in real-time PCR*. *J Appl Genet*, 2013. **54**(4): p. 391-406.
96. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. *Genome Res*, 1996. **6**(10): p. 986-94.
97. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005. **5**(2): p. 209-19.

98. McAvin, J.C., et al., *Sensitive and specific method for rapid identification of Streptococcus pneumoniae using real-time fluorescence PCR*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(10): p. 3446-51.
99. Navarro, E., et al., *Real-time PCR detection chemistry*. Clin Chim Acta, 2015. **439**: p. 231-50.
100. Jahan-Tigh, R.R., et al., *Flow cytometry*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(10): p. 1-6.
101. Mizrahi, O., et al., *Quantitative Flow Cytometry: Concerns and Recommendations in Clinic and Research*. Cytometry B Clin Cytom, 2018. **94**(2): p. 211-218.
102. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5 1 1-5 1 11.
103. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(2): p. 163-176.
104. Šinkorová, Z., et al., *Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část* Vojenské zdravotnické listy, 2008. **77**(3): p. 98-103.
105. ThermoFisher SCIENTIFIC, *Fluidics of a Flow Cytometer* <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/fluidics-flow-cytometer.html>. [cited 2021- 04-20].
106. Kaur, A., *Ex Vivo Studies*. In: *Fluorescent Tools for Imaging Oxidative Stress in Biology*. 2018, Springer, Cham.
107. Kumar, A., et al., *Cell Separation*. 2007: Springer Verlag. 203.
108. Leslie, G. *Flow Cytometry: A Basic Guide*, https://www.sdu.dk/-/media/files/om_sdu/institutter/imb/analytical+flow+cytometry,-d-.basic+guide.pdf. 2006, July.
109. Khowawisetsut, L., et al., *Data analysis and presentation in flow cytometry*. ScienceAsia, 2018. **44S**: p. 19-27.
110. Becheva, Z.R., et al., *Comparison between direct and indirect immunofluorescence method for determination of somatic cell count*. Chemical Papers, 2018. **72**(8): p. 1861-1867.

111. Sakamoto, S., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites*. J Nat Med, 2018. **72**(1): p. 32-42.
112. Alhajj, M., et al., *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
113. *The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Bull World Health Organ, 1976. **54**(2): p. 129-39.
114. Hidayat, R., et al., *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique Guideline*. . Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine and Translational Research, 2021. **5**(2): p. 352-358.
115. Osmekhina, E., et al., *Sandwich ELISA for quantitative detection of human collagen prolyl 4-hydroxylase*. Microb Cell Fact, 2010. **9**: p. 48.
116. 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.
117. Liu, Y., et al., *Modulation of circulating protein biomarkers following TRC105 (anti-endoglin antibody) treatment in patients with advanced cancer*. Cancer Med, 2014. **3**(3): p. 580-91.
118. 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.
119. 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.
120. Rossi, E., et al., *Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration*. Blood, 2013. **121**(2): p. 403-15.
121. 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.
122. Botella, L.M., et al., *Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury*. Blood, 2002. **100**(12): p. 4001-10.

123. Gallardo-Vara, E., et al., *Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury*. *Angiogenesis*, 2016. **19**(2): p. 155-71.
124. La Sala, L., et al., *Oscillating glucose and constant high glucose induce endoglin expression in endothelial cells: the role of oxidative stress*. *Acta Diabetol*, 2015. **52**(3): p. 505-12.
125. Aristorena, M., et al., *MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(12).
126. Hawinkels, L.J., et al., *Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(10): p. 4141-50.
127. Bilir, B., et al., *Association of apelin, endoglin and endocan with diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016. **20**(5): p. 892-8.
128. Ekiz-Bilir, B., et al., *Evaluation of endocan and endoglin levels in chronic kidney disease due to diabetes mellitus*. *Arch Med Sci*, 2019. **15**(1): p. 86-91.
129. Doghish, A.S., et al., *Plasma endoglin in Type2 diabetic patients with nephropathy*. *Diabetes Metab Syndr*, 2019. **13**(1): p. 764-768.
130. 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.