

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv atorvastatinu na expresi a funkci endoglinu u endotelové dysfunkce indukované hyperlipidémií

Adéla Holadová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Katarína Tripská, PhD.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala PharmDr. Kataríně Tripské, PhD. za její odborné vedení, obětovaný čas, připomínky, přátelský přístup, rychlou zpětnou vazbu, a hlavně za trpělivost, kterou mi věnovala při experimentální části a odpovídání na odborné i praktické dotazy související s vypracováním této diplomové práce. Poděkování patří i mojí rodině a mým nejbližším za neustálou podporu, kterou mi poskytovali během celého studia.

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

V Hradci Králové 2024

OBSAH

ABSTRAKT	6
1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
2. ÚVOD	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 ENDOGLIN	11
3.1.1 <i>Struktura a exprese endoglinu</i>	<i>11</i>
3.1.2 <i>Regulace endoglinu</i>	<i>12</i>
3.1.3 <i>Signalizace a funkce endoglinu</i>	<i>13</i>
3.1.4 <i>Solubilní endoglin.....</i>	<i>14</i>
3.2 ENDOTEL	15
3.2.1 <i>Fyziologická funkce endotelu</i>	<i>15</i>
3.2.2 <i>Endotelová dysfunkce</i>	<i>16</i>
3.2.3 <i>Biomarkery endotelové dysfunkce</i>	<i>17</i>
3.2.4 <i>Úloha endoglinu v endotelové dysfunkci</i>	<i>18</i>
3.2.5 <i>Typy endotelových buněk používaných ve výzkumu kardiovaskulárního systému.....</i>	<i>19</i>
3.3 HYPERLIPIDÉMIE – DEFINICE, KLASIFIKACE, PROJEVY.....	20
3.3.1 <i>Definice</i>	<i>20</i>
3.3.2 <i>Klasifikace hyperlipidemií</i>	<i>21</i>
3.3.3 <i>Projevy</i>	<i>22</i>
3.3.4 <i>Úloha endoglinu u hyperlipidémie</i>	<i>23</i>
3.4 ATORVASTATIN	24
3.4.1 <i>Indikace, nežádoucí účinky, kontraindikace.....</i>	<i>25</i>
3.5 METODY DETEKCE ENDOGLINU	26
3.5.1 <i>Průtoková cytometrie</i>	<i>26</i>
3.5.2 <i>ELISA</i>	<i>28</i>
3.5.3 <i>PCR.....</i>	<i>29</i>
4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	32

5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
5.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ	33
5.1.1	<i>Rozmrazování buněk</i>	33
5.1.2	<i>Pasážování</i>	34
5.1.3	<i>Příprava zásobního roztoku kyseliny palmitové</i>	34
5.1.4	<i>Premedikace buněk</i>	35
5.2	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	40
5.3	PCR	42
5.4	SENDVIČOVÁ ELISA	45
6.	VÝSLEDKY A DISKUSE	51
6.1	PROTEINOVÁ EXPRESE ENDOGLINU	52
6.2	MRNA EXPRESE ENDOGLINU A JEHO TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ	55
6.3	MRNA EXPRESE ZÁNĚTLIVÝCH MARKERŮ	57
6.4	ANALÝZA SOLUBILNÍHO ENDOGLINU	59
7.	ZÁVĚR	61
8.	SEZNAM TABULEK	62
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
10.	SEZNAM GRAFŮ	64
11.	POUŽITÁ LITERATURA	65

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce: Vliv atorvastatinu na expresi a funkci endoglinu u endotelové dysfunkce indukované hyperlipidemií

Autor: Adéla Holadová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Katarína Tripská, Ph.D.

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem atorvastatin ovlivňuje expresi a funkci endoglinu a s ním souvisejících biomarkerů zánětu/endotelové dysfunkce v různých koncentracích a časech u lidských endotelových buněk z aorty, u kterých byla indukovaná hyperlipidémie pomocí kyseliny palmitové.

Metody: V diplomové práci jsme pracovaly s lidskými aortálními endotelovými buňkami. Ty jsme premedikovaly atorvastatinem/kyselinou palmitovou v různých časech a koncentracích. Za využití průtokové cytometrie jsme měřily proteinovou expresi endoglinu. Dále jsme využívaly metodu qRT-PCR ke zjištění míry mRNA exprese endoglinu, jeho transkripčních faktorů a biomarkerů zánětu. Pomocí metody ELISA, jsme detekovaly hladiny solubilního endoglinu.

Výsledky: Prokázaly jsme, že atorvastatin o koncentraci 5 μ M po 16h premedikaci signifikantně zvýšil mRNA expresi endoteliální syntázy oxidu dusnatého, a naopak snížil expresi CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2). Dále jsme zjistily, že 25 μ M koncentrace kyseliny palmitové po 24hodinové inkubaci vedla ke snížení proteinové exprese endoglinu oproti kontrole. Metodou ELISA jsem prokázaly u skupiny buněk premedikovaných 24h 25 μ M kyselinou palmitovou a zároveň i 5 μ M atorvastatinem pokles hladiny solubilního endoglinu oproti skupině premedikované pouze 5 μ M atorvastatinem. Ve sledovaných časech a u vybraných koncentrací neměl atorvastatin, ani atorvastatin s kyselinou palmitovou signifikantní vliv na mRNA expresi endoglinu a jeho transkripčních faktorů, stejně tak ani na proteinovou expresi endoglinu.

Závěr: Výsledky prokázaly, že u buněk, u kterých byla indukovaná hyperlipidémie prostřednictvím kyseliny palmitové, neměl atorvastatin ve sledovaných časech a zvolených koncentracích zásadní vliv na expresi endoglinu ani jeho transkripčních faktorů, ale na druhou stranu zásadně ovlivnil mRNA expresi souvisejících biomarkerů zánětu eNOS a CCL2.

Klíčová slova: endoglin, hyperlipidémie, endotelová dysfunkce, atorvastatin

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Effect of atorvastatin on endoglin expression and function in hyperlipidemia-induced endothelial dysfunction

Author: Adéla Holadová

Supervisor of Diploma Thesis: PharmDr. Katarína Tripská, Ph.D.

Aim: The aim of this thesis was to determine how atorvastatin affects the expression and function of endoglin and related biomarkers of inflammation/endothelial dysfunction at different concentrations and times in human endothelial cells from the aorta, in which hyperlipidemia was induced by using palmitic acid.

Methods: In the diploma thesis, we worked with human aortic endothelial cells. We premedicated them with atorvastatin/palmitic acid at different times and concentrations. Using flow cytometry, we measured the protein expression of endoglin. Furthermore, we used the qRT-PCR method to determine the level of mRNA expression of endoglin, its transcription factors and biomarkers of inflammation. Using the ELISA method, we detected the levels of soluble endoglin.

Results: We demonstrated that atorvastatin at a concentration of 5 μ M after 16 hours of premedication significantly increased the mRNA expression of endothelial nitric oxide synthase, and conversely decreased the expression of CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2). Furthermore, we found that a 25 μ M concentration of palmitic acid after 24 hours of incubation led to a decrease in the protein expression of endoglin compared to the control. Using the ELISA method, we demonstrated a decrease in the level of soluble endoglin in a group of cells premedicated for 24 hours with 25 μ M palmitic acid and at the same time 5 μ M atorvastatin compared to the group premedicated only with 5 μ M atorvastatin. At the observed times and at the selected concentrations, atorvastatin, nor atorvastatin with palmitic acid had no significant effect on the mRNA expression of endoglin and its transcription factors, nor on the protein expression of endoglin.

Conclusion: The results showed that in cells in which was induced hyperlipidemia by palmitic acid, atorvastatin did not have a significant effect on the expression of endoglin or its transcription factors at the observed times and selected concentrations, but on the other hand, it significantly affected the mRNA expression of the related inflammatory biomarkers eNOS and CCL2.

Key words: endoglin, hyperlipidemia, endothelial dysfunction, atorvastatin

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam zkratky	Český význam zkratky
ALK	activin receptor-like kinase	kinázy podobné aktivinovému receptoru
ALK1	activin receptor-like kinase 1	kináza 1 podobná aktivinovému receptoru
ALK5	activin receptor-like kinase 5	kináza 5 podobná aktivinovému receptoru
API	aqua pro injectione	voda pro injekci
ATV	atorvastatin	atorvastatin
BMPR	bone morphogenetic protein receptor	receptor kostního morfogenetického proteinu
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
CRP	C-reactive protein	C-reaktivní protein
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EBM-2	endothelial cell growth basal medium	základní medium pro růst endotelových buněk
ED	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkce
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	imunoenzymatické stanovení
Eng	endoglin	endoglin
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
FBS	fetal bovine serum	fetální hovězí sérum
FC	flow cytometry	průtoková cytometrie
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
FSC	forward scatter	přední rozptyl
HAEC	human aortic endothelial cells	lidské aortální endotelové buňky
HDL	high density lipoprotein	lipoproteiny s vysokou hustotou
hEGF	human epidermal growth factor	lidský epidermální růstový faktor
HHT	hereditary hemorrhagic teleangiectasia	hereditární hemoragická teleangiektázie
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 alpha	hypoxií indukovatelný faktor faktor alfa
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	endotelové buňky lidské pupečnickové žíly
ICAM-1	intercellular adhesion molecule -1	mizibuněčná adhézní molekula-1
IDL	intermediate density lipoprotein	lipoproteiny se střední hustotou
IL-1	interleukin-1	interleukin-1
KLF6	Kruppel-like factor 6	faktor podobný Kruppelovi 6
L-Eng	long endoglin	dlouhý endoglin
LDL	low density lipoprotein	lipoproteiny s nízkou hustotou
LXR	liver X receptor	jaterní X receptor
m-Eng	membrane endoglin	membránový endoglin

Zkratka	Význam zkratky	Český význam zkratky
MM RT	master mix for reverse transcription	master mix na reverzní transkripci
MMP12	matrix metalloproteinase 12	matrixová metaloproteináza 12
MMP14	matrix metalloproteinase 14	matrixová metaloproteináza 14
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NF- κ B	nuclear factor kappa B	nukleární faktor kappa B
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
NR1H3	nuclear receptor subfamily 1 group H member 3	nukleární receptor podrodiny 1 skupiny H člen 3
PA	palmitic acid	kyselina pamitová
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový tlumivý roztok
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	kvantitativní reverzní transkripce s polymerázovou řetězovou reakcí
R3-IGF	recombinant insulin-like growth factor	rekombinovaný růstový faktor podobný inzulinu
RD	reagent diluent	reakční činidlo
RELA	nuclear factor kappa B subunit 65	nukleární faktor kappa B podjednotka 65
RGD	arginyl-glycyl-aspartic acid	arginin-glycin-asparágová kyselina
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
S-Eng	short endoglin	krátký endoglin
sEng	soluble endoglin	solubilní endoglin
Sp1	specific protein 1	specifický protein 1
SSC	side scatter	boční rozptyl
TGF- β	transforming growth factor beta	transformující růstový faktor beta
TNF- α	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrotizující faktor alfa
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	vaskulární buněčná adhézní molekula-1
VEGF	vascular endothelial growth factor	cévní endotelový růstový faktor
VLDL	very low density lipoprotein	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
WB	wash buffer	promývací roztok
ZP	zona pellucida	zóna pellucida

2. ÚVOD

Endoglin je transmembránový protein, který je členem superrodiny transformujícího růstového faktoru beta (1, 2). Je exprimován na buňkách endotelu a jeho exprese je ovlivněna různými transkripčními faktory. Změny exprese a funkce endoglinu jsou spojeny s různými patologickými stavy jako je například zánět, endotelová dysfunkce, angiogeneze a nádorová onemocnění (3). Důležitou roli sehrává také při metabolickém syndromu, kardiovaskulárních onemocněních a diabetu (4).

Endotel, je tvořený souvislou monovrstvou endotelových buněk. Tvoří výstelku všech cév a odděluje extravaskulární a intravaskulární prostředí (5, 6). Endotel je v neustálém přímém kontaktu s krví/lymfou a cirkulujícími buňkami, a jeho základní funkcí je výměna plynů, elektrolytů a makromolekul mezi krví a orgány (7, 8). Endotel ovlivňuje také krevní srážlivost pomocí antikoagulačních a prokoagulačních faktorů (7). Dále je endotel jedním z hlavních aktérů v regulaci imunologických reakcí, vaskulárního tonu, zánětu a angiogeneze. Pokud je jedna z fyziologických funkcí endotelu poškozena, může docházet k rozvoji endotelové dysfunkce (9, 10). Může docházet k změnám v působení endotelu směrem ke zvýšené vazokonstrikci, rozvoji zánětu a větší pravděpodobnosti vzniku krevních sraženin. Endotelová dysfunkce je spojena s většinou kardiovaskulárních onemocnění, jako je hypertenze, onemocnění koronárních tepen, chronické srdeční selhání, ischemická choroba dolních končetin, dále i diabetes mellitus, chronické selhání ledvin a závažné virové infekce (9, 10).

Hyperlipidémie je onemocnění charakterizované zvýšením jednoho nebo více plazmatických lipidů, včetně triglyceridů, cholesterolu, esterů cholesterolu, fosfolipidů a/nebo plazmatických lipoproteinů. Toto zvýšení plazmatických lipidů patří mezi hlavní rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění (11).

Atorvastatin je syntetický inhibitor 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reduktázy, což je klíčový enzym pro syntézu cholesterolu. Atorvastatin je užíván pro jeho schopnosti snižovat plazmatické hladiny VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu, triacylglycerolů a apolipoproteinu B. Atorvastatin je známý pro své pleiotropní účinky (tzn. účinky, které nezahrnují hypolipidemický efekt) (12). Konkrétně u atorvastatinu bylo prokázáno, že zvyšuje produkci oxidu dusnatého zvýšením aktivity endotelové syntázy oxidu dusnatého, čímž působí relaxačně na cévní stěnu. Pravděpodobně také pozitivně ovlivňuje endoteliální dysfunkci snížením tvorby volných kyslíkových radikálů a tlumí migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny cév (13).

V této diplomové práci budeme sledovat vliv atorvastatinu na expresi a funkci endoglinu a s ním souvisejících biomarkerů endotelové dysfunkce u lidských aortálních buněk, u kterých budeme indukovat hyperlipidémii pomocí kyseliny palmitové.

3. TEORETICKÁ ČÁST

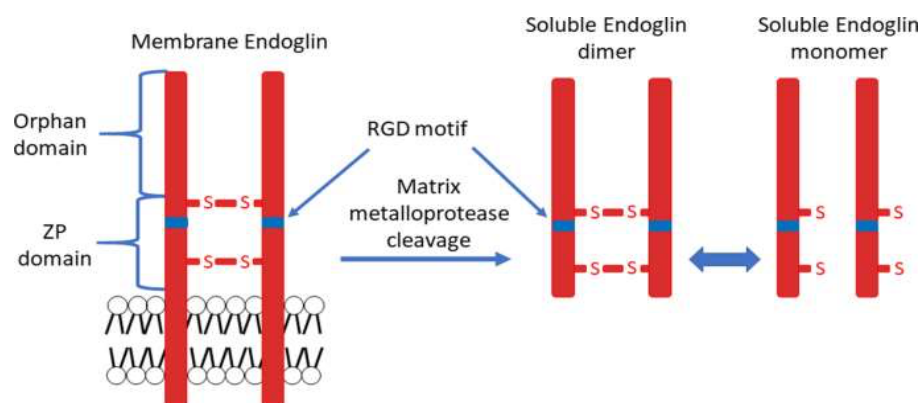
3.1 Endoglin

3.1.1 Struktura a exprese endoglinu

Endoglin (Eng), také známý jako CD105, představuje transmembránový glykoprotein, který hraje roli v regulaci buněčné signalizace a angiogeneze a uplatňuje se i ve spoustě patologických stavů jako je například metabolický syndrom, diabetes mellitus, nádorová onemocnění, preeklampsie, a různá kardiovaskulární onemocnění (4, 14).

Eng je homodimerní transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 180kDa, který prochází jedenkrát skrze cytoplazmatickou membránu. Skládá se z několika domén – kratší cytoplazmatické domény (47 aminokyselin), membránové hydrofobní domény a objemnější extracelulární domény (561 aminokyselin). Celá molekula je pak stabilizována disulfidickými můstky (14) (Obr. 1). V extracelulární části je přítomna sirotčí doména, která není typická pro žádnou jinou proteinovou rodinu. Další stavební prvek extracelulární části je zona pellucida, která obsahuje 226 aminokyselin a zprostředkovává interakce s ostatními proteiny (15-17). Její součástí je RGD sekvence (arginyl-glycyl-aspartic acid), což je struktura, která zprostředkovává vazbu na integriny.

Expese Eng byla zaznamenána na buňkách endotelu, v buňkách hladké svaloviny cév, fibroblastech, v aktivovaných monocytech a makrofázích (18-21).



Obrázek 1: Struktura endoglinu

V levé části obrázku je zobrazený membránový Eng (Membrane Endoglin) ve formě dimeru spojený disulfidickými můstky prostupující cytoplazmatickou membránou. Je tam vyznačeno i rozdělení domény na sirotčí (orphan) a zona pellucida (ZP domain). RGD sekvence (RGD motif), je struktura, která zprostředkovává vazbu na integriny. Matrixová metalloproteináza (Matrix metalloprotease) zprostředkovává rozdělení membránového Eng za vzniku solubilního Eng (Soluble Endoglin), jenž putuje do cirkulace. V pravé části obrázku je znázorněno, že v cirkulaci se solubilní Eng může vyskytovat jako dimer nebo jako monomer (3).

Existují dvě izofomy Eng – dlouhý Eng (L-Eng) a krátký Eng (S-Eng). Navzájem se liší afinitou k cílovým receptorům, počtem stavebních aminokyselin v intracelulární doméně a možnostmi fosforylace (22, 23). S-Eng má zkrácený C-konec, který nemůže být fosforylován a postrádá i místa pro interakci s proteiny, což vede k funkčním rozdílům ve srovnání s L-Eng. L-Eng stimuluje

angiogenezi, migraci a proliferaci endotelových buněk, naopak S-Eng tyto děje potlačuje a podporuje tak buněčné stárnutí. L-Eng je majoritní forma Eng a z tohoto důvodu se v této práci budeme věnovat pouze jemu (24).

Dále rozlišujeme membránovou a solubilní formu Eng. Membránový Eng (membrane endoglin, m-Eng) je dimer prostupující membránou a solubilní Eng (soluble endoglin, sEng) je forma, která cirkuluje v plazmě, popřípadě v kultivačním mediu buněk (25).

3.1.2 Regulace endoglinu

Gen pro Eng je lokalizovaný na chromozomu 9. Skládá se z 15 exonů, z nichž 13 kóduje extracelulární doménu (26).

Při zkoumání možné regulace exprese Eng hypoxií bylo zjištěno, že promotor Eng je aktivován za hypoxických podmínek, což vede k zvýšené mRNA (messenger ribonucleic acid, mediátorová ribonukleová kyselina) expresi Eng v buňce a zvýšené proteinové expresi Eng na buněčném povrchu. Tímto byl objeven prvek v genu Eng, který reaguje na hypoxii a může regulovat Eng expresi na transkripční úrovni. Vzhledem k tomu, že signální dráhy hypoxie a transformujícího růstového faktoru β (transforming growth factor β , TGF- β) jsou zprostředkovány hypoxií indukovatelným faktorem 1 alfa (Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF-1 α) a proteiny Smad, bylo zapojení těchto faktorů zkoumáno v kombinaci se specifickým proteinem 1 (specific protein 1, Sp1). V důsledku toho byl identifikován multiproteinový komplex Sp1/Smad3/HIF-1 na promotoru Eng (27).

Sp1 je považován za kritický prvek pro bazální transkripci Eng. Mutace v této sekvenci nebo přidání inhibitoru Sp1 vedou k eliminaci bazální transkripční aktivity a schopnosti promotoru Eng reagovat na TGF- β (28).

Expresie Eng je regulována také dalšími transkripčními faktory. Ty mají schopnost zvyšovat, popřípadě snižovat expresi genu pro Eng a tím ovlivnit následnou proteosyntézu (29). Konkrétně se jedná o:

Člen rodiny faktorů podobných Kruppelovi 6 (Kruppel-like factor 6, KLF6), je nukleární protein, který se při poškození endotelu přesouvá do jádra buňky, kde reguluje angiogenezi a vaskulární remodelaci. Ovlivňuje i složky membránového komplexu receptoru TGF- β , mezi které se řadí i Eng (30). KLF6 se skládá ze tří „zinkových prstů“, které jsou zodpovědné za vazbu na guanin-cytosin (GC) oblasti v promotorech různých genů (31). Gen pro Eng obsahuje dvě GC oblasti, a navíc je s KLF6 indukován během poškození cév. Bylo zjištěno, že KLF6 je schopen pozitivně regulovat expresi genu pro Eng (32).

Nukleární faktor kappa B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B), je rodina proteinů, která hraje klíčovou roli v regulaci imunitního systému a zánětu (33). Má vliv na mnoho procesů, včetně buněčné diferenciace, růstu, apoptózy a tvorby nových cév (34). Účastní se patologických dějů, které souvisí se zánětlivým procesem, jako jsou onkologická nebo autoimunitní onemocnění (35). Prokázalo se, že NF- κ B, konkrétně podjednotka 65 (NF- κ B p65) může být aktivován mimo jiné i pomocí KLF6. NF- κ B p65 se nachází v cytoplazmě, kde je vázáná na inhibiční proteiny nazývané I kappa B. Po přijetí signálu (zprostředkovaného především tvorbou reaktivních forem kyslíku podléhá I kappa B degradaci, což vede ke vstupu NF- κ B p65 do buněčného jádra, kde se

může vázat na deoxyribonukleovou kyselinu (deoxyribonucleic acid, DNA) a modulovat expresi různých genů (36), mimo jiné také HIF-1 α (37) a Eng (38).

Jaterní X receptor (liver X receptor, LXR), je nukleární receptor, který má za úkol regulovat homeostázu cholesterolu, žlučových kyselin (39) a glukózy v organismu. LXR je intenzivně zkoumán jako cíl pro léky na terapii aterosklerózy, diabetu a Alzheimerovy choroby (40). Oxysteroly, oxidované formy cholesterolu (41), které aktivují LXR, jsou upregulovány enzymem metalloproteináza 14, který mimo jiné štěpí Eng na sEng (42). Při výzkumu nových genů LXR v placentě bylo taky zjištěno, že LXR je transkripčním faktorem Eng. LXR je schopen se vázat na LXR responzivní element v promotoru Eng, a tak zprostředkovat aktivaci Eng exprese (43).

3.1.3 Signalizace a funkce endoglinu

Eng je přídatný receptor pro TGF- β (44). Receptory pro TGF- β můžeme rozdělit na tři odlišné subtypy: receptory typu I, nazývané též jako kinázy podobné aktivinovému receptoru (activin receptor like kinase, ALK 1-7), receptory typu II např. TGF- β receptor typu II nebo receptor pro kostní morfogenetický protein typu II, a receptory typu III (Eng a β -glykan) (45, 46).

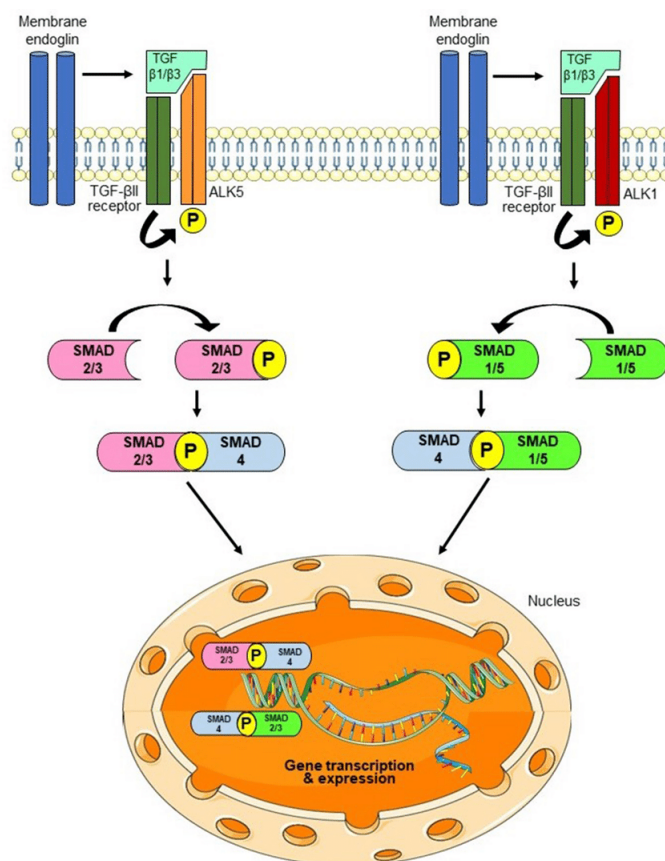
Vazba ligandů na Eng v komplexu s receptorem typu II vede k aktivaci a změně konformací receptoru typu I (47). Receptor typu I pak může fosforylovat transkripční faktory Smad, které přenášejí signál do jádra, kde mohou ovlivnit transkripci genů (48, 49).

Eng nemá vnitřní kinázovou aktivitu a k navázání svých ligandů vyžaduje koexpresi receptorů typu I a typu II. Eng je schopen vytvořit komplex buď s receptorem ALK1 nebo ALK5, a tak může ovlivnit, která signální dráha Smad bude zpuštěna (50, 51). Vazba Eng na ALK1 vede k aktivaci signální dráhy ALK1/Smad1/5, která stimuluje proliferaci a migraci endotelových buněk (52). Naopak vazba Eng na ALK5 vede k aktivaci signální dráhy ALK5/Smad2/3, která inhibuje proliferaci a migraci endotelových buněk. Takovým způsobem Eng udržuje rovnováhu mezi signalizačními drahami, čímž reguluje, zda budou endotelové buňky v aktivovaném nebo klidovém stavu (Obr. 2) (53).

Fakt, že se Eng podílí na signalizaci prostřednictvím Smad2/3, může vést ke změnám v expresi a funkci endotelové syntázy oxidu dusnatého (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) v endotelových buňkách a následně k regulaci na oxidu dusnatém dependentní vazodilataci (54, 55).

Eng také hraje roli při hereditární hemoragické teleangiektázii typu 1 (Hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1, HHT1), což je autosomálně dominantní onemocnění charakterizované epistaxí (krváčením z nosu), teleangiektáziemi (rozšířenými kapilárami, které jsou viditelné na kůži) a multiorgánovou cévní dysplazií (56, 57).

Onemocnění je způsobeno mutacemi v genech pro Eng (HHT1) nebo ALK-1 (HHT2). HHT1 je spojena s vaskulárními abnormalitami v plicích, mozku a játrech (58). Dále byly změny v expresi Eng zaznamenány např. u nádorových onemocnění, zánětu, arteriální hypertenze, preeklampsii a diabetu (3, 4).



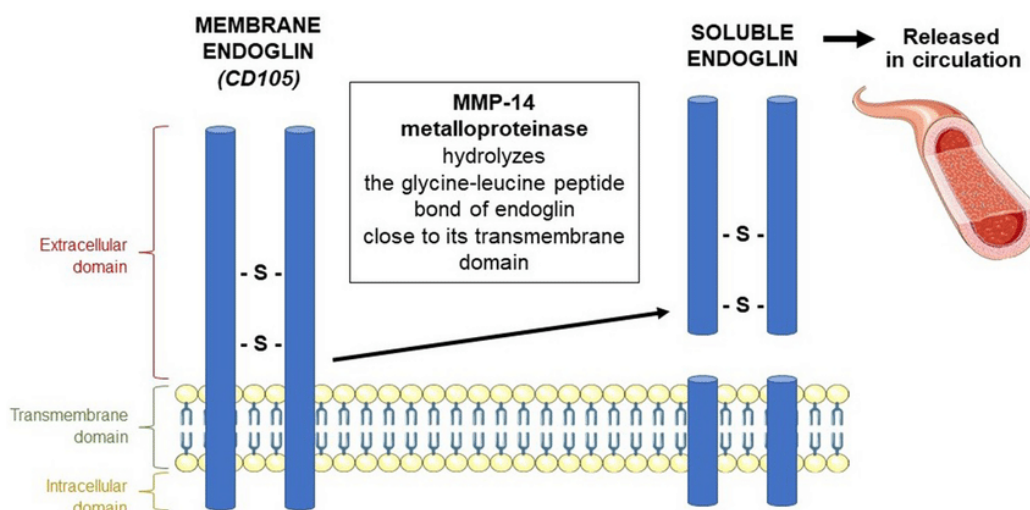
Obrázek 2: Signální dráhy endoglinu

Endoglin je koreceptorem z rodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β). Na buněčném povrchu se cirkulující TGF- β 1 a TGF- β 3 vážou na receptory TGF- β typu II a typu I (jako je ALK5 a ALK1). Endoglin váže molekuly TGF- β s vysokou afinitou pouze tehdy, když jsou ligandy připojeny k receptorům TGF- β typu II. Tvorba takových komplexů mezi endoglinem, TGF- β ligandy a TGF- β receptory typu I a II vede k fosforylaci ALK5 nebo ALK1. To vede k aktivaci signálních drah ALK5 a ALK1, které zahrnují fosforylaci SMAD proteinů (SMAD 1/5, 2/3 a 4) a jejich přenos do buněčného jádra (Nucleus). Tam fosforylované SMAD proteiny ovlivňují transkripční aktivitu a modifikují expresi genů (59).

3.1.4 Solubilní endoglin

sEng vzniká vlivem enzymatického štěpení m-Eng matrixovými metaloproteinázami (matrix metalloproteinase, MMP) (Obr. 3). Existují dva druhy MMP, které štěpí Eng – matrixová metaloproteináza 12 a 14 (MMP12 a MMP14) (60). Místo štěpení se nachází na aminokyselinách 586-587 což znamená, že se téměř celá extracelulární doména po proteolytickém štěpení uvolní do oběhu a cirkuluje v plazmě (60).

Zvýšené hladiny sEng byly pozorovány u arteriální hypertenze, (61) diabetes mellitus 2. typu (38), familiární hypercholesterolémie, (59) preeklampsie a obezity (61). Není však ale jisté, jakým způsobem se na patofyziologii těchto onemocnění podílí.



Obrázek 3: Vznik solubilního endoglinu

Solubilní endoglin (SOLUBLE ENDOGLIN) vzniká proteolytickým štěpením membránového endoglinu (MEMBRANE ENDOGLIN) působením metaloproteináz (MMP). Matrixová metaloproteináza 14 (MMP-14), převládající enzym zprostředkující uvolňování endoglinu, hydrolyzuje peptidovou vazbu glycin-leucin blízko jeho transmembránové domény (Transmembrane domain). V důsledku toho se dlouhá extracelulární doména (Extracellular domain) membránového endoglinu uvolňuje do oběhu (Released in circulation) a tvoří solubilní endoglin (59).

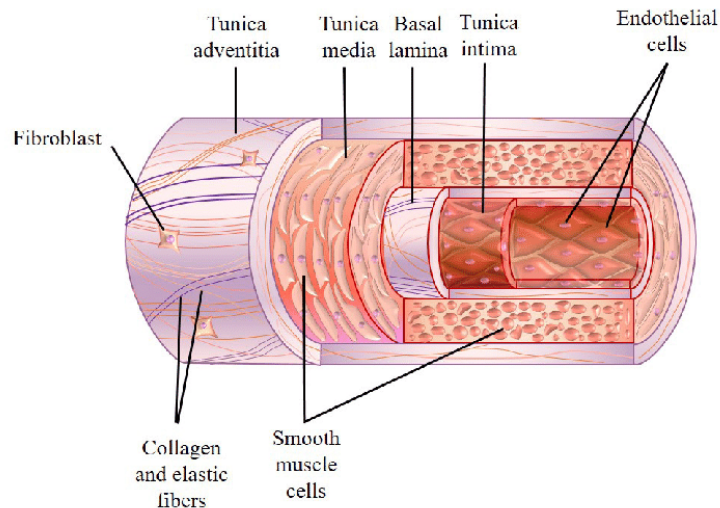
3.2 Endotel

3.2.1 Fyziologická funkce endotelu

Vaskulární endotel je složen z jednotné vrstvy endotelových buněk, která tvoří vnitřní buněčnou výstelku krevních a lymfatických cév (Obr. 4). Vzhledem k tomu, že je v neustálém přímém kontaktu s krví/lymfou a cirkulujícími buňkami, je jeho základní funkcí výměna plynů, elektrolytů a makromolekul mezi krví a orgány (7, 8).

Endotel ovlivňuje krevní koagulaci pomocí regulace exprese vazebných míst pro antikoagulační a prokoagulační faktory na buněčném povrchu. V klidovém stavu endoteliální buňky udržují optimální reologické vlastnosti krve podporou aktivity antikoagulačních drah, jako je dráha proteinu C nebo proteinu S (7). Dále je endotel hlavním aktérem v regulaci imunologických reakcí, vaskulárního tonu, zánětu a angiogeneze. Díky produkci inzulinotropních faktorů, růstových faktorů a enzymů je také důležitým endokrinním orgánem.

Jak je již výše uvedeno, endoteliální buňky řídí vaskulární tonus pomocí syntézy a sekrece relaxačních a kontrakčních faktorů (8). Mezi nejvýznamnější molekuly navozující vazodilataci patří oxid dusnatý, prostacykliny a hyperpolarizující faktor odvozený od endotelinu. Naopak vazokonstrikci navozuje endotelin 1, angiotensin II a prostaglandin H2 (62). Nerovnováha v syntéze a/nebo uvolňování těchto faktorů může vést k endoteliální dysfunkci a následnému rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (od hypertenze po aterosklerózu), popřípadě jejich přetrvávání (8, 63).



Obrázek 4: Stavba cévní stěny

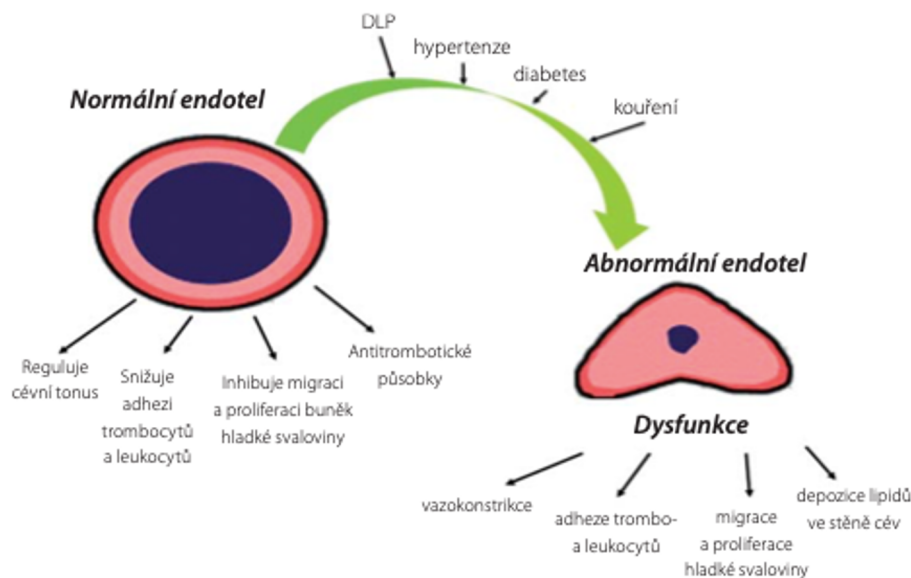
Na obrázku vidíme průřez krevní cévou. Tunica intima je tvořena monovrstvou endotelových buněk (Endothelial cells), které lemují všechny krevní cévy. Od buněk hladkého svalstva je oddělena bazální laminou (Basal lamina), na kterou navazuje tunica media, obsahující buňky hladké svaloviny (Smooth muscle cells). Poslední vrstvu představuje Tunica adventitia, která je tvořena kolagenními vlákny, elastickými vlákny (Collagen and elastic fibres) a fibroblasty (Fibroblast) (64).

3.2.2 Endotelová dysfunkce

Endotel zastupuje v organismu mnoho funkcí. Endoteliální dysfunkce znamená, že schopnost vykonávat jednu nebo více z těchto funkcí je snížena. Může docházet k změnám v působení endotelu směrem ke zvýšené vazokonstrikci, rozvoji zánětu a větší pravděpodobnosti vzniku krevních sraženin. Je spojena s většinou kardiovaskulárních onemocnění, jako je hypertenze, onemocnění koronárních tepen, chronické srdeční selhání, ischemická choroba dolních končetin, diabetes mellitus, chronické selhání ledvin a závažné virové infekce. Volné radikály mohou narušit homeostázu oxidu dusnatého (nitric oxide, NO), poškodit endotel a způsobit jeho zvýšenou permeabilitu, což umožňuje toxinům procházet do okolních tkání (Obr. 5) (9).

Ve většině případů lidské tělo přijímá z potravy dostatečný přísun antioxidantů, které volné radikály neutralizují. Pokud je ale organismus o antioxidanty ochuzen nebo pokud je přítomných příliš mnoho dalších rizikových faktorů, dochází k poškození endotelu. Mezi faktory, které mohou zvýšit počet volných radikálů v těle se řadí např. obezita, kouření, nedostatek spánku, akutní mikrobiální infekce, vysoký příjem cukru, fyzická nečinnost a expozice těžkým kovům (9). Endotel může být poškozený i vlivem probíhajících chronických onemocnění. Typicky se uvádí arteriální hypertenze, kde se endotel poškozuje mechanicky nebo diabetes mellitus a hypercholesterolémie, kde dochází k biochemickému poškození (10).

Dále také hypercholesterolémie a inzulinová rezistence přispívají k vzniku zánětu v cévní stěně a k zvýšené oxidaci lipoproteinů, k proliferaci buněk hladkého svalstva, buněčné adhezi a tvorbě trombů v cévách (65). U endotelových buněk, které byly vystaveny hyperglykémii, byla zjištěna snížená schopnost eNOS tvořit NO, hlavní vasodilatační mediátor. V řadě studií bylo potvrzeno, že endotelová dysfunkce má úzkou spojitost s aterosklerózou u diabetiků (66).



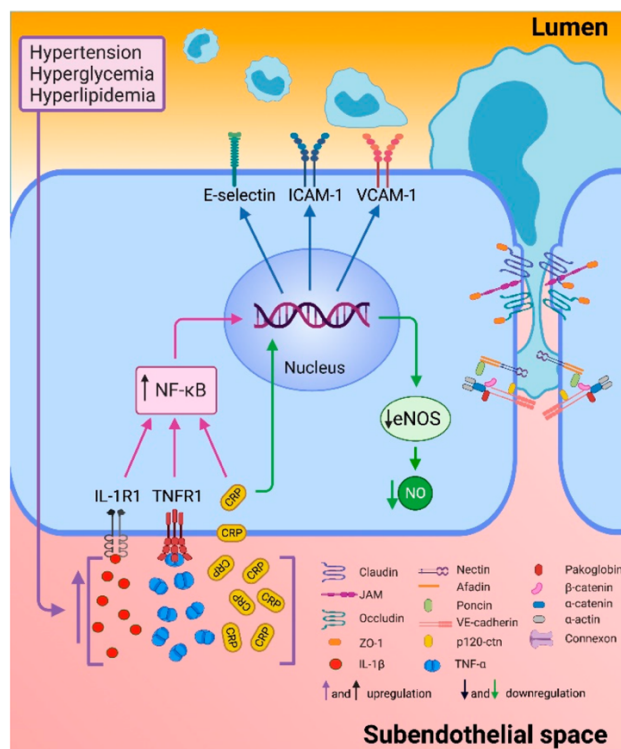
Obrázek 5: Vývoj endotelové dysfunkce ze zdravého endotelu.

Na obrázku vidíme vznik dysfunkčního endotelu (Abnormální endotel) z normálního zdravého endotelu vlivem působení rizikových faktorů (DLP – dyslipidémie, hypertenze, diabetes a kouření). Obrázek dále shrnuje základní funkce normálního endotelu a důsledky endotelové dysfunkce (67).

3.2.3 Biomarkery endotelové dysfunkce

Biomarkery endotelové dysfunkce mohou poskytovat více informací o riziku rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (68, 69). Z tohoto důvodu je důležité hledání nových biomarkerů, protože endotelová dysfunkce předchází a pravděpodobně i stimuluje rozvoj aterosklerotických plátů (70). Kardiovaskulární rizikové faktory způsobují zvýšenou produkci zánětlivých mediátorů, jako je tumor nekrotizující faktor alfa (tumor necrosis factor α , TNF- α), interleukin-1 (IL-1) a C-reaktivní protein (C-reactive protein, CRP). Tyto zánětlivé cytokiny se následně vážou na příslušné receptory, čímž se aktivuje NF- κ B, což následně vede k stimulaci transkripce adhezních molekul jako je E-selektin, intercelulární buněčná adhezní molekula-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule, ICAM-1) a vaskulární buněčná adhezní molekula-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VCAM-1) (Obr. 6) (71).

Hlavní příčinou většiny běžných kardiovaskulárních onemocnění je ateroskleróza, zánětlivý stav, který se vyvíjí postupně v průběhu mnoha let. Je charakterizován tvorbou plátu ve vnitřní výstelce tepen, což vede k jejich kornatění nebo zúžení. Během tohoto procesu jsou migrujícími buňkami vylučovány zánětlivé mediátory a matrixové metaloproteinázy, což napomáhá k progresi onemocnění, následné ruptuře plátu a rozvoji trombu. Různé studie ukázaly, že měření hladin ICAM-1, VCAM-1 a E-selektinu může poskytnout dobrý obraz o probíhajících zánětlivých procesech v endotelu. Dalším znakem endotelové dysfunkce a probíhající aterosklerózy je zvýšená adheze monocytů k endotelu. Bylo zjištěno, že endoteliální dysfunkce, která je spojována s rozvojem aterosklerózy, je také spojována se zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku (71).



Obrázek 6: Biomarkery endotelové dysfunkce

Rizikové faktory pro kardiovaskulární onemocnění (hypertenze, hyperglykémie a hyperlipidémie) způsobují endotelovou dysfunkci. Dochází ke zvýšení produkce interleukinu 1 (IL-1), tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α) a C reaktivního proteinu (CRP). Prozánětlivé cytokiny se vážou na jejich receptory a tím aktivují NF- κ B, který stimuluje transkripci selektinu-E, intercelulární adhezní molekuly-1 (ICAM-1) a vaskulární buněčné adhezní molekuly-1 (VCAM-1). CRP snižuje transkripci endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS), což vede ke snížení syntézy oxidu dusnatého (NO) (72).

3.2.4 Úloha endoglinu v endotelové dysfunkci

V mnohých *in vitro* a *in vivo* studiích byla prokázána signifikantní souvislost mezi expresí Eng a syntézou oxidu dusnatého. Změna exprese Eng pozitivně koreluje se změnou exprese eNOS, která je zodpovědná za syntézu NO. Ten lze pro jeho vasodilatační působení považovat za protektivní faktor pro ochranu endotelu (3, 54, 55).

K protichůdným výsledkům došly studie, kde se ukázalo, že zvýšená exprese Eng při navození zánětu vedla ke zvýšené adhezi a transendotelové migraci leukocytů (3). Pravděpodobně se tak děje z důvodu přítomnosti RGD oblasti (tripeptidová sekvence arginin-glycin-aspartát), která je schopna vázat integriny leukocytů (73).

Zároveň bylo také zjištěno, že adheze a transmigrační leukocytů byla snížena po přidání sEng. RGD oblast je obsažena i v sEng, protože je součástí extracelulární domény m-Eng, která sEng tvoří (73). Integriny leukocytů jsou tedy obsazeny sEng a nemohou se pak později navázat na m-Eng, který by podpořil adhezi a transmigrační leukocytů. Dále bylo taky zjištěno, že při stimulaci HUVEC sEng docházelo ke zvyšování prozánětlivých cytokinů NF- κ B a interleukinu 6 (3, 74).

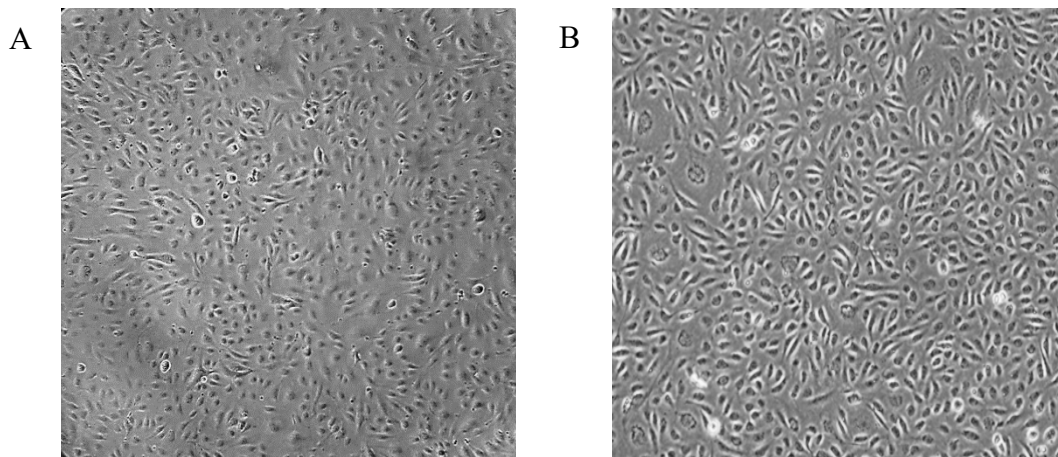
3.2.5 Typy endotelových buněk používaných ve výzkumu kardiovaskulárního systému

Vhodné a spolehlivé *in vitro* modely jsou důležité pro lepší pochopení molekulárních mechanismů, které jsou základem různých kardiovaskulárních patologických stavů a jsou i klíčem k následnému vývoji nových léčiv (75).

Kardiovaskulární systém se skládá z více typů buněk, které jsou všechny potřeba pro jeho správnou funkci jako celku. Dysfunkce, byť jen jednoho typu buněk, může vést k rozvoji různých onemocnění. Pro poznání patologického děje se jeví jako nejpřesnější řešení použití buněk, které byly izolované přímo z příslušné části nativní tkáně, tzv. primární kultury (75, 76). Jejich výhoda spočívá v jejich standardní morfologii a zachování si všech potřebných funkcí (77, 78). Naopak jejich nevýhodou je omezená životnost a jejich nižší dostupnost, protože se odebírají během operací nebo transplantací orgánů (75, 76). V průběhu posledních let se však proces získávání buněk z tkání, jako je pupečnicková žíla, aorta nebo koronární artérie stává dostupnějším. Přestože může být práce s primárními buňkami náročnější, poskytují výsledky, které přesněji reflektují *in vivo* podmínky (75).

Další možností je využití buněčných linií. Ty jsou tvořeny buňkami odvozenými od nativních buněk, které získaly navíc schopnost se neomezeně dělit a lze je tak opakovaně pasážovat (79, 80). Simulace fyziologických procesů není na buněčných liniích tolik přesná jako na primárních kulturách. Může tomu tak být z důvodu mutací a genetického přizpůsobování se během sérií kultivací (75, 76).

Mezi jedny z nejpoužívanějších buněk pro výzkum myokardu se řadí endotelové buňky lidské pupečnickové žíly (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) (Obr.7B). Různé tkáně v organismu obsahují odlišné typy endotelových buněk, přesto lze i tak HUVEC využít jako funkční model pro výzkum vlastností cévního endotelu a biologických drah zapojených do jeho funkce (81). Pro výzkum aterosklerózy jsou ale výhodnější buňky arteriální, protože ateroskleróza postihuje primárně tepenné řečiště a stavba žil a tepen se od sebe odlišuje (82, 83). Pro výzkum tohoto onemocnění se tedy často využívají lidské aortální endotelové buňky (human aortic endothelial cells, HAEC) (Obr. 7A), které produkují trombotické a antitrombotické faktory a také reagují na stimulaci TNF- α expresí ICAM-1, sníženou produkcí NO a endotelinu-1. Z tohoto důvodu se hodí kromě aterosklerózy i pro výzkum endoteliální dysfunkce a zánětu (84).



Obrázek 7: Typy buněk

A) Lidské aortální endotelové buňky HAEC (vlastní zdroj), B) Endotelové buňky lidské pupečnickové žíly HUVEC (85).

3.3 Hyperlipidémie – definice, klasifikace, projevy

3.3.1 Definice

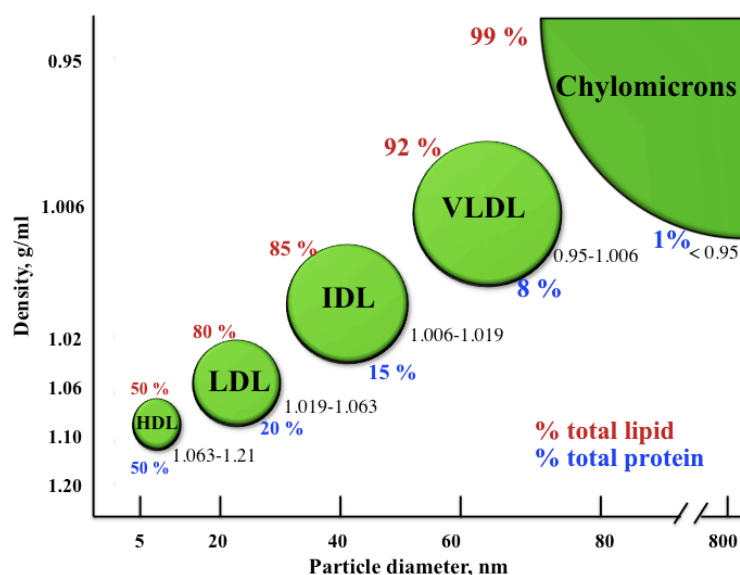
Hyperlipidémie je onemocnění charakterizované zvýšením jednoho nebo více plazmatických lipidů, včetně triglyceridů, cholesterolu, esterů cholesterolu, fosfolipidů a/nebo plazmatických lipoproteinů, včetně lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (very low density lipoproteins, VLDL) a lipoproteinů s nízkou hustotou (low density lipoproteins, LDL) (Obr. 8). Toto zvýšení plazmatických lipidů patří mezi hlavní rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění. Obvykle souvisí i se sníženými hladinami lipoproteinů s vysokou hustotou (high density lipoproteins, HDL) (11).

Chylomikrony jsou největší lipoproteiny (>100 nm v průměru). Jsou syntetizovány ve střevě a jejich úlohou je transport triglyceridů a cholesterolu z místa absorpce ve střevním epitelu do různých buněk těla (86).

VLDL lipoproteiny jsou částice o velikosti 30 až 90 nm, které transportují triglyceridy a cholesterol z jater do různých tkání. V plazmě jsou triglyceridy z VLDL hydrolyzovány na volné mastné kyseliny pomocí lipoproteinové lipázy za vzniku série menších lipoproteinů obohacených cholesterolem včetně lipoproteinů se střední hustotou (intermediate density lipoprotein, IDL) a LDL (86).

LDL představují konečný produkt (částice o velikosti 20 nm) katabolismu VLDL a jsou hlavními lipoproteiny transportujícími cholesterol v plazmě (86).

HDL jsou nejmenší (8–12 nm v průměru) z lipoproteinů. Jsou součástí procesu označovaného jako reverzní transport cholesterolu, kde HDL sbírá cholesterol z periferních tkání a transportuje jej přímo nebo nepřímo do jater k eliminaci (86).



Obrázek 8: Rozdíly mezi jednotlivými typy lipoproteinů.

Na svislé ose je znázorněná hustota částic (Density) a na vodorovné průměr částic (Particle diameter). Ze schématu vychází, že nejvíce triglyceridů (total lipid) obsahují chylomikrony (Chylomicrons) a nejvíce proteinů (Total protein) obsahují HDL lipoproteiny, které jsou dle některých studií považovány za kardioprotektivní (87).

3.3.2 Klasifikace hyperlipidemií

Hyperlipidémie lze rozdělit na:

A) Primární

Jejich příčinou je monogenní/polygenní genetický defekt, z tohoto důvodu jsou často označovány také jako familiární hyperlipidémie. Podrobnější klasifikace je uvedena níže na Obr.9 (88).

B) Sekundární

Na rozdíl od primárních hyperlipidemií jsou získané. Jsou způsobeny jiným přidruženým onemocněním, jako je například diabetes, nefritický syndrom, chronický alkoholismus, hypotyreóza nebo užíváním léků, jako jsou systémové kortikoidy, betablokátory a perorální antikoncepce. Sekundární hyperlipidémie spolu s významnou hypertriglyceridémií mohou způsobit pankreatitidu (88).

Fenotype	Excess Lipoproteins	Disease	CV Risk	Pancreatitis
I	Chylomicrons	Familial chylomicronemia syndrome	+	++
IIa	LDL	Familial hypercholesterolemia	++++	-
IIb	LDL + VLDL	Combined hyperlipidemia	++	-
III	Beta-VLDL (IDL)	Familial dysbetalipoproteinemia	++	+
IV	VLDL	Familial hypertriglyceridemia	+	++
V	VLDL + chylomicrons	Familial hypertriglyceridemia	+	++

Low-density lipoprotein (LDL), Very-low-density lipoprotein (VLDL), intermediate-density lipoprotein (IDL), cardiovascular (CV) risk. + = present, ++ = high, ++++ = very high, - = absent

Obrázek 9: Fredricksonova klasifikace hyperlipidémie a souvislost s manifestací kardiovaskulárních onemocnění a pankreatitid.

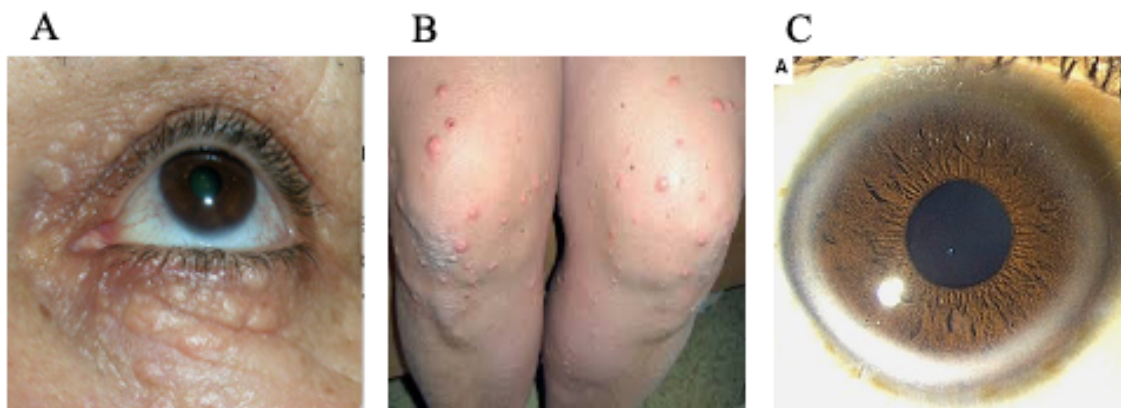
Obrázek znázorňuje, že nejvyšší kardiovaskulární riziko představuje fenotyp IIa, tedy familiární hypercholesterolemie. V případě pankreatitidy jsou nejrizikovější fenotypy V a IV, tedy familiární hypertriglyceridémie a také fenotyp I, představující familiární chylomicronémii (89).

3.3.3 Projevy

Hyperlipidémie nemá u většiny pacientů žádné zjevné příznaky. Obvykle je diagnostikována během preventivních prohlídek u lékaře nebo až v momentě, kdy se objeví cévní mozková příhoda nebo infarkt myokardu. U pacientů s dlouhodobě vysokou hladinou cholesterolu v krvi nebo u pacientů s familiárními formami hyperlipidémie se mohou vyvinout xantelasmata (Obr. 10A), což jsou depozita cholesterolu, která se tvoří v podkoží, zejména pod očima (88).

Současně se u pacientů s velmi vysokými hladinami lipidů může vyvinout xantomatóza (Obr. 10B). Projevuje se jako drobné léze, které vznikly vlivem zbytnění pojiva spolu s podkožním nahromaděním cholesterolu do jejich okolí (90).

Dále se může vyskytovat arcus lipoides corneae (Obr. 10C), šedobílá kružnice na okraji rohovky, přítomna obvykle oboustranně. Vzniká difuzí lipidů z přilehlých cév a vznikají tuková depozita v parenchymu samotné rohovky (91).



Obrázek 10: Projevy hyperlipidémie

A) Xantelasmata na očních víčkách (podkožní depozita cholesterolu) (92), B) Xantomatóza na dolních končetinách (90), C) Arcus lipoides corneae (depozita cholesterolu koncentrována do šedobílého prstence) (71).

3.3.4 Úloha endoglinu u hyperlipidémie

Jak již bylo zmíněno, hypercholesterolémie je rizikovým faktorem pro endotelovou dysfunkci a aterosklerózu. Pacienti s aterosklerózou nebo familiární hypercholesterolémií obvykle vykazují vysoké hladiny sEng, které se zvyšovaly spolu s hladinami celkového cholesterolu. Oxidační stres a zánět hrají velmi důležitou roli v patofyziologii jak endotelové dysfunkce, tak následné aterosklerózy. Prokázalo se, že přítomnost TNF- α (mediátoru zánětu) a indukce oxidačního stresu, vedou k nárůstu hladin sEng (93).

V jedné studii zahrnující myši krmené dietou bohatou na cholesterol, byly pozorované zvýšené hladiny cholesterolu a sEng spolu se zvětšenými aterosklerotickými pláty. Naopak, exprese m-Eng v aortách těchto myší byla snížena (94). Bylo také prokázáno, že spolu s progresí aterosklerózy se exprese Eng snižuje, co lze to vysvětlit inhibicí na Eng závislé TGF-beta signalizace (18).

Dle další práce, se podáváním atorvastatinu docílilo snížení hladin cholesterolu, redukce velikosti aterosklerotických plátů a také snížení hladin sEng a zároveň došlo ke zvýšení exprese m-Eng v aortě (95).

U buněk hladké svaloviny můžeme pozorovat v ložiscích zasažených aterosklerózou zvýšenou expresi Eng, zatímco u buněk zdravé cévní stěny je jeho exprese nižší. To naznačuje, že ke zvýšené expresi Eng u buněk hladké svaloviny dochází v reakci na cévní poranění, které je způsobeno hypercholesterolémií a oxidačním stresem (4, 96).

Eng může aktivací signálních kaskád také zvyšovat hladinu transkripčního faktoru EGR-1 (early growth response -1), který podporuje dělení buněk svaloviny cév a tvorbu kolagenu, což následně zvyšuje stabilitu aterosklerotického plátu, co naznačuje protektivní funkci Eng (18).

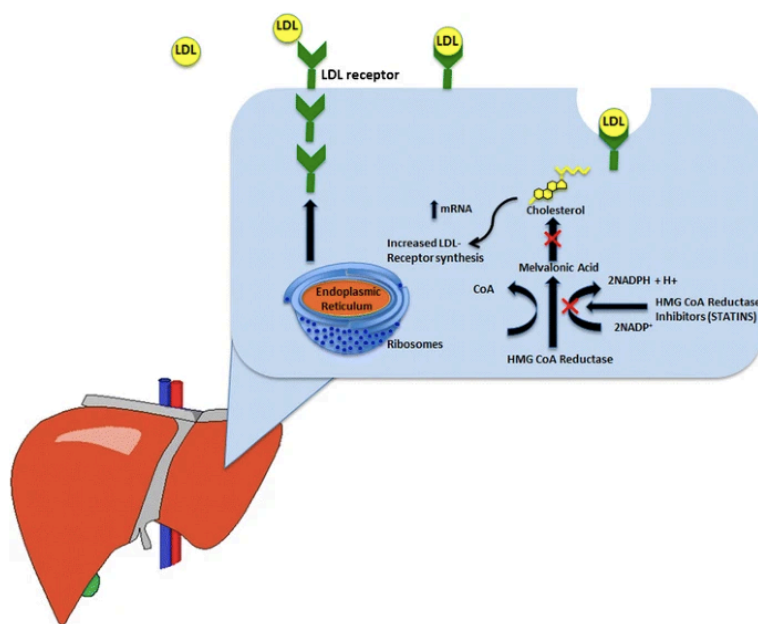
3.4 Atorvastatin

Atorvastatin je syntetický inhibitor 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reduktázy (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoA reduktáza), což je klíčový enzym pro syntézu cholesterolu. Statiny pomocí inhibice tohoto enzymu snižují syntézu cholesterolu v játrech, což má za následek zvýšenou regulaci povrchových LDL receptorů vedoucí ke zvýšenému vychytávání aterogenního LDL cholesterolu z plazmy (Obr. 11) (13).

Atorvastatin je užíván pro jeho schopnosti snižovat plazmatické hladiny VLDL cholesterolu, LDL cholesterolu, triacylglycerolů a apolipoproteinu B. V mnoha studiích byl také prokázán pozitivní vliv atorvastatinu na dlouhodobé snižování kardiovaskulárního rizika. V studii REVERSAL bylo dokázáno, že po 18měsíčním podávání atorvastatinu v maximálních dávkách (80mg) docházelo k redukci rozsahu aterosklerotického plátu, které bylo viditelné i na ultrazvukovém vyšetření (13).

Důležité je také zmínit tzv. pleiotropní účinky statinů (tzn. účinky, které nezahrnují hypolipidemický efekt). Řadí se mezi ně například účinky protizánětlivé, antiagregační, antiproliferační, antioxidantní a imunomodulační (12).

U atorvastatinu bylo prokázáno, že zvyšuje produkci NO zvýšením aktivity eNOS, čímž působí relaxačně na cévní stěnu. Pravděpodobně také pozitivně ovlivňuje endoteliální dysfunkci snížením tvorby volných kyslíkových radikálů a tlumí migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny cév. Podávání atorvastatinu má z dlouhodobého hlediska také pozitivní vliv na deformabilitu erytrocytů, čím dochází ke zlepšení reologických vlastností krve (13).



Obrázek 11: Mechanismus účinku atorvastatinu (statinů)

Statiny inhibují HMG-CoA reduktázu v játrech, čímž snižují intracelulární syntézu cholesterolu a vedou ke zvýšené syntéze LDL-receptorů (Increased LDL receptor synthesis). LDL receptory vážou LDL a odstraňují ho z krevního řečiště. V pravé části obrázku lze vidět jakým způsobem statiny (STATINS) zasahují do syntézy cholesterolu. Statiny inhibují HMG-CoA reduktázu (HMG-CoA reductase), čímž blokují syntézu kyseliny mevalonové (Mevalonic acid) a následně i cholesterolu (97).

3.4.1 Indikace, nežádoucí účinky, kontraindikace

Atorvastatin má dle FDA schválené tyto indikace:

1. Primární hyperlipidémie (heterozygotní familiární a nefamiliární) a smíšená dyslipidémie.
2. Hypertriglyceridémie
3. Primární dysbetalipoproteinémie
4. Homozygotní familiární hypercholesterolémie
5. Heterozygotní familiární hypercholesterolémie u pediatrických pacientů (po selhání režimových opatření)

Dále jej lze použít v rámci sekundární prevence u pacientů s vyšším množstvím rizikových faktorů nebo s onemocněním diabetes mellitus 2. typu (bez významného koronárního nálezu) na snížení pravděpodobnosti rozvoje infarktu myokardu, cévní mozkové příhody a anginy pectoris. Pacientům je podáván i v rámci terciární prevence za účelem předcházení opakovanému infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody (98).

Ačkoliv je atorvastatin obvykle dobře snášen, jako s každou účinnou látkou se i s jeho užíváním pojí určitá rizika. Často se mohou objevit alergické reakce, nasofaringitida, hyperglykémie, bolesti hlavy, myalgie, abnormality jaterních testů a gastrointestinální obtíže (99). Nejzávažnějším nežádoucím účinkem, který byl u statinů pozorován je myopatie, která může progredovat až k rabdomyolýze. Rabdomyolýza je vzácný stav, při kterém dochází k poškození sarkolemy buněk kosterního svalstva, obsah svalových buněk se uvolní do krevního oběhu, což může vést až k akutnímu selhání ledvin (100). Rabdomyolýza se nejčastěji vyskytovala u pacientů užívajících cerivastatin (který byl následně stažen z trhu), popřípadě při současném užívání léčiv, které brání biodegradaci statinů prostřednictvím cytochromu P450. Dochází pak ke zvýšení plazmatických a tkáňových koncentrací statinů a jejich aktivních metabolitů na toxické hladiny (101).

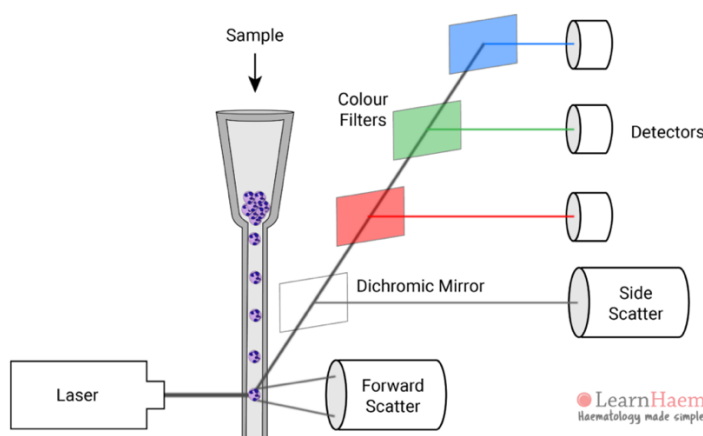
Mezi kontraindikace léčivých přípravků obsahující atorvastatin samozřejmě patří přecitlivělost na kteroukoli jejich složku. Ačkoliv se mezi kontraindikace řadí také aktivní onemocnění jater, přínosy hypolipidemické terapie u chronických jaterních onemocnění, jako je nealkoholické ztučnění jater a hepatitida, pravděpodobně převažují nad možnými riziky vycházejícími z léčby (98). Atorvastatin je kontraindikován během těhotenství, laktace, a u pacientek, které plánují otěhotnět. Toto riziko je nejvýznamnější v prvním trimestru těhotenství, proto současné doporučené postupy doporučují ukončit léčbu statiny alespoň 3 měsíce před otěhotněním. Nedávná metaanalýza však toto tvrzení zpochybnila a k přesnému posouzení poměru rizika a přínosu užívání statinů během těhotenství bude pravděpodobně zapotřebí další výzkum (98). Další kontraindikací je současné užívání antivirotik glekapreviru nebo pibrentasviru spolu s atorvastatinem (99).

3.5 Metody detekce endoglinu

3.5.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FC) je metoda umožňující rychlou analýzu a třídění buněk v suspenzi dle různých parametrů v rámci heterogenní populace. Výhodou FC je schopnost zanalyzovat velké množství buněk za krátký čas (102, 103).

Každá buňka je analyzována na základě rozptylu viditelného světla anebo fluorescence. Fluorescence, emitovaná z fluorescenční protilátky, je přímo úměrná množství protilátky navázané na buněčný povrch. Rozptyl viditelného světla je měřen ve dvou různých směrech – v přímém směru (Forward Scatter, FSC), ze kterého můžeme vyčíst relativní velikost buňky, a při úhlu 90° (Side Scatter, SSC), který udává vnitřní složitost nebo granularitu buňky (Obr. 12) (102). Rozptýlené světlo se po dopadu na detektor převede na elektrický impuls, který je následně vyhodnocován speciálním počítačovým programem. Výsledky se pak zobrazují nejčastěji jako bodové grafy, kde každá tečka představuje jednu buňku nebo pomocí histogramu (Obr.13) (104, 105).



Obrázek 12: Schéma vícebarevného průtokového cytometru

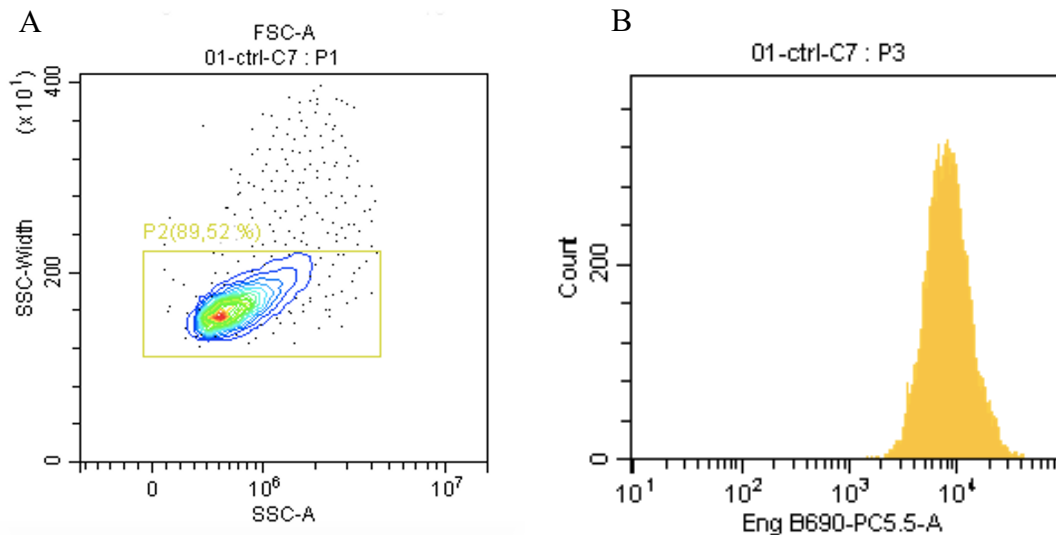
Každou buňku ze vzorku (Sample) procházející laserem (Laser) přístroj zaznamená jako událost. Pro každou událost se následně zaznamenává přímý rozptyl (Forward Scatter) a boční rozptyl (Side Scatter). Pokud je buňka fluorescenčně označena, laser excituje fluorofor a emitované světlo se zaznamená jako intenzita fluorescence. Aby přístroj detekoval specifickou vlnovou délku emitovanou fluoroforem, emitované světlo prochází řadou zrcadel (Dichromic Mirror) a filtrů (Colour filters), dokud nedosáhne příslušného detektoru (Detectors). Detektory jsou známy jako fotonásobiče (PMT) a detekují fluorescenci při určité vlnové délce (106, 107).

Průtokový cytometr se skládá ze třech hlavních částí – fluidiky, optiky a elektroniky.

1. Fluidika – zajišťuje průchod buněk ze vzorku konstantní rychlostí přes průtokovou komoru. Buňky jsou unášeny pomocí proudu fosfátem pufovaného fyziologického roztoku dál do přístroje. Pro seřazení buněk do jedné linie se využívá jev hydrodynamické fokusace, která umožní jednotlivý průchod buněk a zanalyzování každé buňky zvlášť (108).

2. Optika – obsahuje zdroje světla (lasery) a systém čoček, zrcadel a optických filtrů. Optika u procházejících buněk zachytí rozptýl záření/fluorescenci a přenáší jí na detektor. Nejčastěji používané lasery v tradičních průtokových cytometrech jsou 355 nm (ultrafialový), 405 nm (fialový), 488 nm (modrý), 561 nm (zelenožlutý), 640 nm (červený) (102, 108). Dále se v FC využívají dichroické filtry, které nasměrují fluorescenční světlo na pásmové filtry, které blokují určité vlnové délky a jiné propouštějí. Když je dichroický filtr umístěn pod správným úhlem, funguje jako zrcadlo, které umožňuje průchod specifickým vlnovým délkám a zároveň odráží ostatní. Správný typ a pořadí dichroických filtrů umožňuje detekci více signálů najednou (106).

3. Elektronika – zpracovává optické signály a transformuje je do grafické podoby, ze které lze následně vyhodnotit výsledky měření (108).



Obrázek 13: Dot plot a Histogram

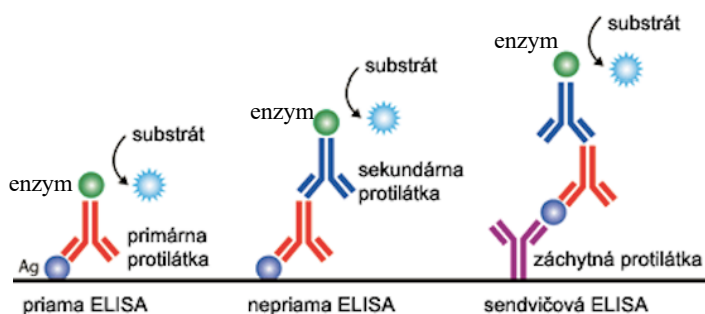
A) Obrázek znázorňuje tzv. dot plot (bodový graf), kde každý bod představuje jednu buňku. Umožňuje odlišit populaci buněk podle jejich velikosti (FSC) a granularity (SSC) (Vlastní výsledky). B) Obrázek znázorňuje histogram. Na ose x je vynesena fluorescence, osa y značí počet částic (Count), které odpovídají intenzitě světla. Signály se stejnou intenzitou se shromažďují ve stejném bodě. V ideálním případě se vytvoří jeden pík (Vlastní výsledky)

3.5.2 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je citlivá imunologická metoda využívající specifickou vazbu antigen-protilátka pro kvantitativní nebo kvalitativní stanovení různých molekul v biologických tekutinách. Velikou výhodou této metody je schopnost detekovat látky ve velmi nízkých koncentracích. Může se jednat například o proteiny, vitamíny, hormony a léčiva (109-112).

Obecný princip ELISA spočívá ve vysoce specifické interakci antigenů a protilátek. Jedna z nich je kovalentně navázaná na enzym, který zprostředkuje chemickou přeměnu substrátu v reakční směsi na barevný produkt. Intenzita zabarvení je úměrná množství antigenu ve vzorku. Na stanovení koncentrace antigenu ve vzorku je potřeba sestavit kalibrační křivku z různých standardů o známé koncentraci. Následně je měřena absorbance spektrofotometrem. Čím tmavší je barva vzorku, tím vyšší je koncentrace antigenu ve vzorku (111, 113, 114).

K měření se obvykle využívají 96jamkové mikrotitrační destičky. V závislosti na typu ELISA metody se vyžaduje přítomnost primární a/nebo sekundární detekční protilátky. Metodu ELISA lze použít v několika různých uspořádáních z nichž tři nejčastější jsou zobrazeny na Obr. 14 (109).



Obrázek 14: Přehled druhů ELISA

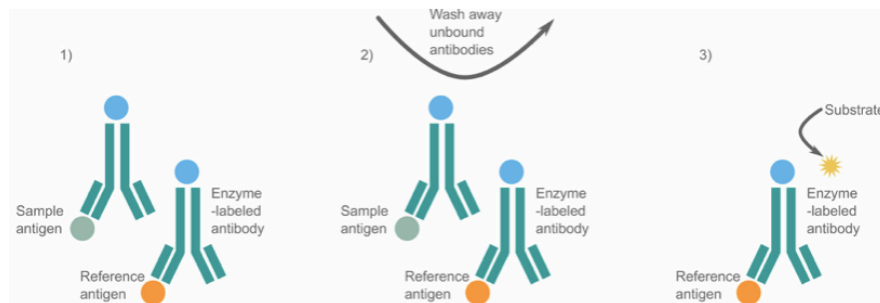
Na obrázku je znázorněn přehled tří ELISA metod – přímá, nepřímá a sendvičová ELISA. Ag = Antigen (115).

Přímá ELISA je vhodná pro detekci antigenů s vysokou molekulární hmotností (110). Antigen, který je přichycen na dno destičky, reaguje s primární detekční protilátkou označenou enzymem, který zreaguje se substrátem, čímž vzniká měřitelná barevná změna. Mezi výhody patří eliminace zkřížené reaktivity sekundárních protilátek, a i díky menšímu počtu kroků se jedná o rychlou metodu. Nevýhodou je nižší citlivost ve srovnání s jinými typy ELISA metod a relativně vysoké náklady (116, 117).

Nepřímá ELISA vyžaduje použití dvou protilátek. Antigen je opět navázaný na dno jamky, na který se naváže primární detekční protilátka. Na primární protilátku se naváže komplementární sekundární protilátka s konjugovaným enzymem. Výhodou této metody je vyšší citlivost v porovnání s přímou ELISOU, nižší cena a vyšší flexibilita. Nevýhodou je riziko zkřížené reaktivity mezi sekundárními protilátkami (116, 117).

U **sendvičové ELISA** se antigen nachází mezi dvěma protilátkami. Záchytná protilátka je navázaná na dno jamky a vycytává antigen ze vzorku, na který se naváže detekční protilátka značená enzymem. Tento typ ELISA má 2-5krát vyšší citlivost v porovnání s přímou a nepřímou ELISA. Je velmi specifická, protože na detekci jednoho antigenu se využívá dvou protilátek. Hlavní nevýhodou je časová náročnost a vyšší náklady (116, 117).

U **Kompetitivní ELISA** soutěží antigen z analyzovaného vzorku s referenčním známým antigenem o vazbu na specifické množství značené protilátky. 96jamková deska se potáhne referenčním antigenem a zbývající vazebná místa se zablokují. Vzorek, který obsahuje neznámou koncentraci antigenu, se inkubuje s definovaným množstvím protilátek. Následně se do potažených jamek přidá směs vzorku a protilátky a deska se nechá inkubovat. Protilátky, které se v předchozím kroku nenavázaly na vzorek antigenu, se nyní navážou na referenční antigen (krok 1 na obrázku 15). Deska se promyje a protilátky navázané na antigeny ve vzorku budou vymyty, protože nejsou imobilizovány na desce (krok 2 na obrázku 15). V posledním kroku se přidá substrát a měří se intenzita zabarvení reakčního produktu. Čím intenzivnější je barevná změna, tím méně antigenu bylo ve vzorku přítomno a naopak (Obr.15) (118).



Obrázek 15: Kompetitivní ELISA

V první části obrázku je znázorněna enzymem označená protilátka, která se váže na referenční antigen (reference antigen) a antigen vzorku (Sample antigen). Následně se deska promyje a protilátky, které nejsou přichycené k desce se tímto odstraní (Wash away unbound antibody). V posledním kroku se přidá substrát (Substrate), který způsobí barevnou změnu (118).

3.5.3 PCR

3.5.3.1 Obecné principy

Polymerázová řetězcová reakce (Polymerase chain reaction, PCR) je metoda, která umožňuje nakopírovat konkrétní úsek molekuly DNA nebo ribonukleové kyseliny (ribonucleic acid, RNA) (119). PCR je citlivá metoda, pro kterou stačí jen velmi malé množství vstupního vzorku, aby se vytvořil dostatečný počet kopií pro analýzu (120). Genetický materiál může být různého původu a z různých zdrojů jako například: krev, vlasy, mikroby nebo rostliny (121).

K provedení PCR testu je potřeba zajistit templátovou DNA, primery, nukleotidy a DNA polymerázu (Obr. 16). Jednotlivé složky se smíchají a spolu se vzorky se napipetují do 96jamkové

desky, v které se umístí do termocykléru. Ten opakuje cykly, při kterých dochází k amplifikaci DNA (122). DNA polymeráza je klíčový enzym, který váže jednotlivé nukleotidy a na základě komplementarity bází dotváří samotný produkt PCR (120). Nejčastěji se získává z termostabilní bakterie *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymeráza) (119). Primery jsou krátké jednovláknové úseky nasedající na komplementární sekvenci templátového řetězce, na které se následně naváže DNA polymeráza, sloužící k elongaci řetězce DNA (120, 121). Pokud je templátem RNA, je v prvním kroku nutný přepis do komplementární DNA (complementary DNA, cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy (123).

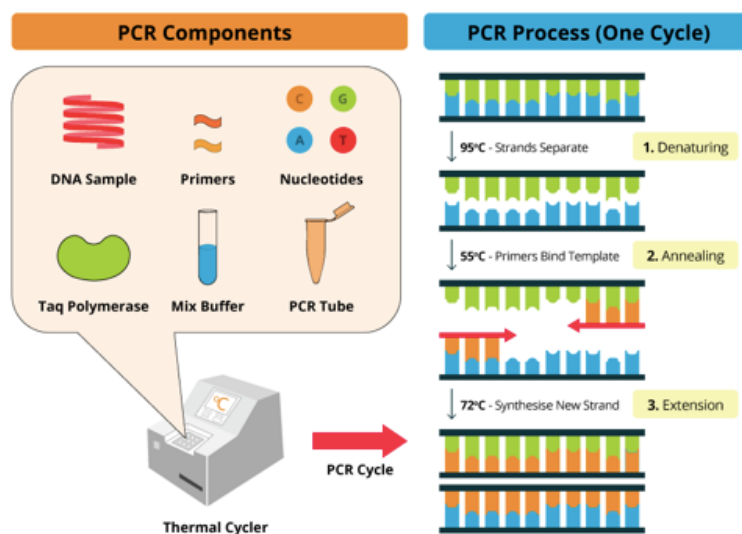
Každý cyklus má 3 základní kroky:

1. Denaturace – při teplotě 95 °C dochází k rozpadu vodíkových můstků, které drží obě vlákna DNA spolu. Na konci této fáze se z dvouvláknové DNA stává jednovláknová (124).

2. Hybridizace – teplota se snižuje na 55–72 °C, což umožní navázání specifických primerů na jedno vlákno templátové DNA. K úspěšné hybridizaci dochází jen na komplementárních úsecích primerů a vlákna nukleové kyseliny (124).

3. Elongace – teplota se zvyšuje na hodnotu 75–80°C. Při této teplotě je Taq polymeráza aktivní, a tedy schopná prodloužit primery a zabudovat nukleotidy do nově vznikajícího komplementárního řetězce DNA (124).

Tyto kroky představují jeden cyklus a každým dalším cyklem se počet molekul DNA zdvojnásobí (125, 126).



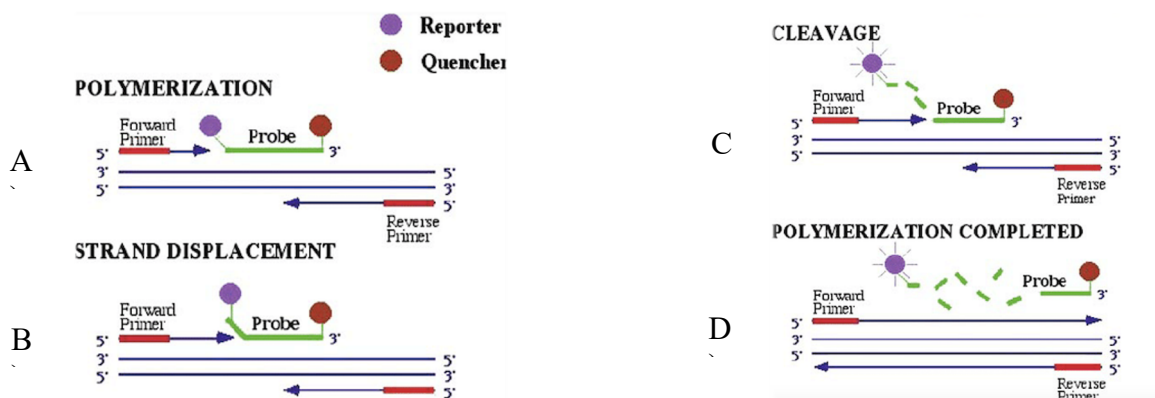
Obrázek 16: Schéma PCR

Na levé straně obrázku se nacházejí komponenty potřebné pro PCR (PCR Components), které zahrnují vzorek DNA (DNA sample), primery (primers), nukleotidy (nukleotides), Taq polymerázu (Taq polymerase), pufr (mix buffer) a zkumavky na PCR (PCR tubes), kde se komponenty smíchají a napipetují do 96jamkové desky, která se vloží do termocykléru (Thermal cycler). Přístroj pracuje v cyklech (PCR cycle) a jeden cyklus má 3 fáze. První fáze – denaturace (denaturing) – dojde k rozvolnění dvouvláknové DNA (strands separate) vlivem vysoké teploty. Druhá fáze – hybridizace (Annealing) – teplota se sniží na 55 °C, což umožní nasednutí primeru na vlákno (primers bind template). Třetí fáze – elongace (extension) – dochází k prodlužování nového vlákna (synthesise new strand) při teplotě 72°C (127).

3.5.3.2 Real time kvantitativní RT-PCR

Jedná se o modifikaci původní metody PCR pro jednodušší kvantifikaci sledovaného úseku DNA. Měření PCR v koncovém bodě nevypovídá o množství sledovaných molekul v původním vzorku, udává jen informaci o její přítomnosti/nepřítomnosti (123, 128). Oproti klasické metodě, kde se vyhodnocoval až výsledný produkt pomocí elektroforézy, je při qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, kvantitativní reverzní transkripce s polymerázovou řetězovou reakcí) analyzován a zaznamenáván každý amplifikační cyklus v reálném čase (128, 129). Během prvních cyklů je signál fluorescence malý a splývá s pozadím. S přibývajícím počtem cyklů se zvyšuje i množství produktu a signál exponenciálně vzrůstá. Počet cyklů k dosažení prahové hodnoty pro detekci se nazývá CT hodnota (Cycle threshold) (123).

Využívá se tzv. sond (fluorescenčně značených oligonukleotidů, např. TaqMan) vybavených fluoforem (reporter) a zhášecem (quencher). Do té doby, co je sonda v celku, fluorescenční signál produkovaný fluoforem je tlumený zhášecem (Obr. 17). Během prodlužování komplementárního vlákna DNA Taq polymeráza způsobí rozdělení sondy, tedy je rozdělen i fluofof a zhášec. Následně začne fluofof vyzařovat signál, který je zachycený termocyklérem. Množství zachyceného signálu je přímo úměrné vytvořenému produktu (123). Tento proces probíhá v termocykléru vybaveném optickým zařízením, čímž je možné spojit detekci a amplifikaci do jednoho kroku (130).



Obrázek 17: Princip sondy TaqMan

Sonda (Probe) se skládá z 25 až 30 nukleotidů. Na 5 konci je označena fluorescenčním reportérovým (Reporter) barvivem (například 6-karboxyfluorescin – FAM) a na 3 konci zhášecím (Quencher) barvivem (například 6-karboxy-tetramethyl-rhodamin- TAMRA). Během prodlužování komplementárního vlákna DNA Taq polymeráza způsobí rozdělení sondy, dojde k rozdělení reportéru a quencheru a následně začne reportér vyzařovat fluorescenční signál, který je zachycený termocyklérem (131).

Na kvantifikaci a zvýšení přesnosti výsledků se využívají tzv. housekeeping geny. Jedná se o geny, které jsou přepisovány konzistentně ve všech buňkách napříč jejich vývojovými cykly. Neměly by být ovlivněny různými experimentálními podmínkami a jejich produkty jsou zásadní pro esenciální funkce buňky (132).

4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem atorvastatin v různých koncentracích a časech ovlivňuje expresi a funkci endoglinu, jeho transkripčních faktorů (KLF6, RELA, NR1H3, SP1, HF1H), biomarkerů zánětu/endotelové dysfunkce (eNOS, CCL2) a hladiny solubilního endoglinu u lidských endotelových buněk z aorty, u kterých byla indukovaná hyperlipidémie pomocí kyseliny palmitové.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Příprava vzorků

5.1.1 Rozmrazování buněk

Na začátku bylo potřeba nahřát želatinu a médium pro HAEC (PromoCell, kat.č.: C-12271) na 37 °C ve vodní lázni. Nahřívání ve vodní lázni trvalo cca 20 minut.

Složení 0,1% želatiny:

- 95 ml sterilního PBS (*phosphate-buffered saline = fosfátový tlumivý roztok*)
- 5 ml 2% želatiny

Složení HAEC média:

- 200 ml EBM-2 (*endothelial cell growth basal medium = základní médium pro růst endotelových buněk*)
- 22 ml FBS (*fetal bovine serum = fetální hovězí sérum*)
- 800 μ l FGF (*fibroblast growth factor = fibroblastový růstový faktor*)
- 80 μ l hydrokortizonu
- 200 μ l VEGF (*vascular endothelial growth factor = cévní endoteliální růstový faktor*)
- 200 μ l R3-IGF (*recombinant insulin-like growth factor = rekombinantní růstový faktor podobný inzulínu*)
- 200 μ l kyseliny askorbové
- 200 μ l hEGF (*human epidermal growth factor = lidský epidermální růstový faktor*)
- 200 μ l GA-1000 (*gentamicin sulfát, amfotericin*)

V dalším kroku jsme do petriho misky (60 cm²) napipetovaly 1,5 ml želatiny. Poklepáním o dlaň jsme dosáhly rovnoměrného pokrytí celého povrchu nádoby. Následně jsme kultivační nádobu vložily na 20 minut do inkubátoru (teplota 37 °C, 5% CO₂). Po uplynutí času jsme přebytečnou želatinu odsály, přidaly 8 ml média pro HAEC a petriho misku jsme vrátily zpět do inkubátoru.

Buňky, uchovávané v mrazáku při -80 °C, jsme rozmrazily ve vodní lázni (37°C) tak, aby v kryozkoumavce zůstala jen malá kulička ledu. Po vyjmutí petriho misky z inkubátoru jsme obsah kryozkoumavky přenesly pipetou do petriho misek s připraveným médiem. Petriho misku s buňkami jsme vrátily zpět do inkubátoru, kde se inkubovala po dobu 2 dnů.

5.1.2 Pasážování

Aby byly buňky vhodné na pasážování, je potřeba, aby bylo dno kultivační nádoby pokryté buňkami alespoň z 80 %. Z tohoto důvodu každému pasážování předcházela kontrola kultivačních nádob pod mikroskopem.

Když byly buňky dostatečně narostlé, daly jsme si do vodní lázně nahřát enzym akutázu, PBS, PBS s 2% FBS a médium pro naše buňky.

Do každé kultivační nádoby (12 nebo 6jamkové desky) jsme pipetou přidaly želatinu, kterou bylo potřeba rozprostřít po povrchu celého dna. Do 6jamkových desek, které jsme používaly na PCR, jsme pipetovaly do každé jamky 600 μ l želatiny a do 12jamkových desek, které jsme využívaly na průtokovou cytometrii, 400 μ l želatiny. Nádoby jsme vložily do inkubátoru na 20 minut.

Poté bylo nutné z petriho misek s buňkami odsát staré médium a přidat 3 ml PBS, kterým jsme opláchly kultivační desky. Všechny nádoby jsme propláchly stejným způsobem, abychom zachovaly konzistentní podmínky pro všechny buňky a aby byly následné experimenty co nejpřesnější. Následně jsme PBS odsály. Tento postup jsme zopakovaly, aby došlo k dostatečnému odstranění mrtvých buněk a zbytku média. V dalším kroku jsme k buňkám přidaly 1,5 ml enzymu akutázy, která slouží k oddělení buněk ze dna nádoby. Kultivační nádoby jsme vložily do inkubátoru na 5 minut, kde jsme nechaly enzym působit.

Mezitím jsme z nově připravených kultivačních nádob odsály želatinu a do každé jamky ve 12jamkové kultivační nádobě přidaly 400 μ l nahřátého média. V případě 6jamkové nádoby jsme přidávaly do každé jamky 900 μ l nahřátého média.

Po 5 minutách jsme petriho misky s buňkami vyndaly z inkubátoru. Pod mikroskopem bylo potřeba zkontrolovat, že proběhlo oddělení buněk od dna. Pokud byly buňky zakulacené a pohybovaly se volně v roztoku, tak odloučení od dna proběhlo v pořádku. Následně jsme napipetovaly do každé jamky 3ml PBS s 2 % FBS na zastavení aktivity enzymu. Petriho misku jsme propláchly pipetou a obsah přenesly do 15ml falkonky. Do petriho misek jsme znovu přidaly 3 ml PBS s 2 % FBS a obsah přenesly do stejné falkonky. Falkonku jsme vložily do centrifugy a centrifugovaly 3 minuty při 300 rcf.

Po centrifugaci buňky sedimentovaly na dno zkumavky a vytvořily tzv. peletku. Supernatant nad buňkami jsme odsály pomocí vakuové odsávačky a každou peletku jsme resuspendovaly v novém médiu. Následně jsme do každé jamky nově připravených kultivačních nádob napipetovaly 100 μ l připravené buněčné suspenze. V posledním kroku jsme desku popsaly názvem buněk, datem, číslem pasáže, svým podpisem a vložily do inkubátoru.

5.1.3 Příprava zásobního roztoku kyseliny palmitové

Nejprve jsme 0,0641 g kyseliny palmitové (P5585-10G, Merck, Německo) rozpustily ve 2,5 ml 100% ethanolu pro dosažení koncentrace 100 mM. Roztok jsme následně smíchaly s 22,5 ml 10% hovězího sérového albuminu bez mastných kyselin v PBS. Směs jsme zahřívaly 1 hodinu při 50 °C. Na konci jsme získaly zásobní roztok kyseliny palmitové o koncentraci 10 mM.

Kontrolní vehikulum jsme připravily smícháním 2,5 ml 100% ethanolu s 22,5 ml 10% hovězího sérového albuminu bez mastných kyselin v PBS a zahříváním po dobu 1 hodiny při 50°C. Všechny zásobní roztoky byly skladovány při -20 °C.

5.1.4 Premedikace buněk

5.1.4.1 Premedikace na průtokovou cytometrii

1. Experimentální design

První experimentální design sloužil k výběru vhodné koncentrace kyseliny palmitové pro další experimenty.

Do čtyř falkonek jsme si připravily premedikační roztoky dle koncentrací uvedených v Tabulce 1. Do každé falkonky jsme napipetovaly potřebný objem média a příslušného léčiva/vehikula. Kontrola obsahovala kromě média i vehikulum, aby se při experimentu eliminoval jeho vliv. Z kultivačních nádob s buňkami jsme odsály staré médium, desku jsme vhodně popsaly a z falkonek napipetovaly příslušné premedikační roztoky do jamek (objem jamky = 500 μ l). Vzorky jsme nechaly inkubovat 24 a 48 hodin.

1. Skupina kontrolní (Ctrl) – Neobsahovala účinné látky, pipetovaný objem vehikula byl 35 μ l (odpovídá nejvyšší koncentraci kyseliny palmitové), skupina zahrnovala 6 kultivačních jamek.

2. Skupina kyseliny palmitové 100 μ M (PA 100 μ M) – koncentrace PA byla 100 μ M, pipetovaný objem zásobního roztoku byl 35 μ l, skupina zahrnovala 6 kultivačních jamek

3. Skupina kyseliny palmitové 50 μ M (PA 50 μ M) – koncentrace PA byla 50 μ M. Pipetovaný objem byl 10 μ l. Tato skupina zahrnovala 3 kultivační jamky.

4. Skupina kyseliny palmitové 25 μ M (PA 25 μ M) – koncentrace PA byla 25 μ M. Pipetovaný objem byl 6,25 μ l. Tato skupina zahrnovala 4 kultivačních jamek

Tabulka 1: Přehled skupin vzorků pro exp. design 1.

číslo vzorku	název vzorku	premedikace	protilátka
1	<i>Neznačené buňky</i>	vehikulum	žádná
2	<i>PI</i>	čisté medium	PI
3	<i>Eng</i>	vehikulum	Eng
4-6	<i>Ctrl</i>	vehikulum	Eng
7-9	<i>PA 100 μM</i>	PA 100 μ M	Eng
10-12	<i>Ctrl</i>	vehikulum	PI, Eng
13-15	<i>PA 100 μM</i>	PA 100 μ M	PI, Eng
16-18	<i>PA 50 μM</i>	PA 50 μ M	PI, Eng
19-22	<i>PA 25 μM</i>	PA 25 μ M	PI, Eng

Ctrl = kontrola, *PI* = propidium jodid, *Eng* = Endoglin, *PA* = kyselina palmitová

Zásobní roztok kyseliny palmitové měl koncentraci 10 mM = 10 000 μ M

Při výpočtu objemů jsme vždy počítaly s jednou jamkou navíc pro pohodlnější pipetování.

Výpočet objemu PA 100μM

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

$$V_2 = \frac{100 \mu\text{M} \cdot 3500 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 35 \mu\text{l}$$

Výpočet objemu PA 25μM

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

$$V_2 = \frac{25 \mu\text{M} \cdot 2500 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 6,25 \mu\text{l}$$

Výpočet objemu PA 50μM

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

$$V_2 = \frac{50 \mu\text{M} \cdot 2000 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 10 \mu\text{l}$$

Výpočet objemu vehikula pro kontrolu

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

$$V_2 = \frac{100 \mu\text{M} \cdot 3500 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 35 \mu\text{l}$$

2. Experimentální design

Druhý experimentální design sloužil k výběru vhodného času kultivace a vhodné koncentrace atorvastatinu.

Do čtyř falkonek jsme si připravily premedikační roztoky dle koncentrací uvedených v Tabulce 2. Dále jsme postupovaly obdobně jako u experimentálního designu 1. Vzorky jsme nechaly inkubovat 24 hodin.

1. Skupina kontrolní (Ctrl) – Neobsahovala účinné látky, pipetovaný objem DMSO byl 7 μl (odpovídá nejvyšší koncentraci atorvastatinu), skupina zahrnovala 6 kultivačních jamek.

2. Skupina atorvastatinu 5 μM (ATV 5μM) – koncentrace ATV byla 5 μM. Pipetovaný objem byl 1 μl. Tato skupina zahrnovala 3 kultivační jamky.

3. Skupina atorvastatinu 10 μM (ATV 10μM) – koncentrace ATV byla 10 μM. Pipetovaný objem byl 2 μl. Tato skupina zahrnovala 3 kultivační jamky.

4. Skupina atorvastatinu 20 μM (ATV 20μM) – koncentrace ATV byla 20 μM, pipetovaný objem zásobního roztoku byl 9 μl, skupina zahrnovala 8 kultivačních jamek.

Tabulka 2: Přehled skupin vzorků pro exp. design 2.

číslo vzorku	název vzorku	premedikace	protilátka
1	Neznačené buňky	vehikulum	žádná
2	PI	čisté medium	PI
3	Eng	vehikulum	Eng
4-6	Ctrl	vehikulum	Eng
7-9	ATV 20 μM	ATV 20 μM	Eng
10-12	Ctrl	vehikulum	PI, Eng
13-15	ATV 5 μM	ATV 5 μM	PI, Eng
16-18	ATV 10 μM	ATV 10 μM	PI, Eng
19-23	ATV 20 μM	ATV 20 μM	PI, Eng

Eng = Endoglin, Ctrl = kontrola, ATV = atorvastatin, PI = propidium jodid,

Zásobní roztok atorvastatinu měl koncentraci 10 mM = 10 000 μM

Výpočet objemu ATV 5

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

$$V_2 = \frac{5 \mu\text{M} \cdot 2000 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 1 \mu\text{l}$$

Výpočet objemu ATV 10

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

$$V_2 = \frac{10 \mu\text{M} \cdot 2000 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 2 \mu\text{l}$$

Výpočet objemu ATV 20

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

$$V_2 = \frac{20 \mu\text{M} \cdot 4500 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 9 \mu\text{l}$$

Výpočet objemu vehikula pro kontrolu

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

$$V_2 = \frac{20 \mu\text{M} \cdot 3500 \mu\text{l}}{10\,000 \mu\text{M}} = 7 \mu\text{l}$$

3. Experimentální design

V tomto experimentálním designu jsme již pracovali s koncentracemi atorvastatinu a kyseliny palmitové, které se jeví jako nejslibnější v předchozích experimentech. Rozhodly jsme se pro kyselinu palmitovou o koncentraci 25 μM a atorvastatin o koncentraci 5 μM .

Do čtyř falkonek jsme si připravily premedikační roztoky dle koncentrací uvedených v Tabulce 3. Dále jsme postupovaly jako v experimentálním designu 1. Vzorky jsme nechaly inkubovat 24 hodin.

1. Skupina kontrolní (Ctrl) – Neobsahovala účinné látky, pipetovaný objem vehikula byl 7,5 μl a 1,5 μl DMSO, skupina zahrnovala 5 kultivačních jamek.

2. Skupina atorvastatinu 5 μM (ATV 5 μM) – koncentrace ATV byla 5 μM , pipetovaný objem zásobního roztoku ATV byl 1,5 μl a vehikula 7,5 μl , skupina zahrnovala 5 kultivačních jamek

3. Skupina atorvastatinu 5 μM a kyseliny palmitové 25 μM (ATV 5 μM + PA 25 μM) - koncentrace ATV byla 10 μM . Pipetovaný objem ATV byl 1,5 μl a PA 7,5 μl . Tato skupina zahrnovala 5 kultivačních jamek.

4. Skupina kyseliny palmitové 25 μM (PA 25 μM) – koncentrace PA byla 25 μM . Pipetovaný objem byl 6,25 μl zásobního roztoku PA a 2,5 μl DMSO. Tato skupina zahrnovala 4 kultivační jamky.

Tabulka 3: Přehled skupin vzorků pro exp. design 3.

číslo vzorku	název vzorku	premedikace	protilátka
1	<i>Neznačené buňky</i>	vehikulum	žádná
2	<i>PI</i>	čisté medium	PI
3	<i>Eng</i>	vehikulum	Eng
4-8	<i>Ctrl</i>	vehikulum	PI, Eng
9-13	<i>ATV 5 μM</i>	ATV 5 μM	PI, Eng
14-18	<i>ATV 5 μM + PA 25 μM</i>	ATV 5 μM + PA 25 μM	PI, Eng
19-22	<i>PA 25 μM</i>	PA 25 μM	PI, Eng

Neznačené B. = *neznačené buňky*, *Ctrl* = *kontrola*, *PI* = *propidium jodid*, *Eng* = *Endoglin*, *PA* = *kyselina palmitová*, *ATV* = *atorvastatin*

Výpočet objemu PA 25 μ M

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{25\mu\text{M} * 2500\mu\text{l}}{10\,000\mu\text{M}} = 6,25\ \mu\text{l}$$

Výpočet objemu ATV 5 μ M

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{5\mu\text{M} * 3000\mu\text{l}}{10\,000\mu\text{M}} = 1,5\ \mu\text{l}$$

Výpočet objemu ATV 5 μ M + PA 25 μ M

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{5\mu\text{M} * 3000\mu\text{l}}{10\,000\mu\text{M}} = 1,5\ \mu\text{l ATV}$$

Výpočet objemu DMSO

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{5\mu\text{M} * 3000\mu\text{l}}{10\,000\mu\text{M}} = 1,5\ \mu\text{l}$$

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{25\mu\text{M} * 3000\mu\text{l}}{10\,000\mu\text{M}} = 7,5\ \mu\text{l PA}$$

Výpočet objemu vehikula

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{25\mu\text{M} * 3000\mu\text{l}}{10\,000\mu\text{M}} = 7,5\ \mu\text{l}$$

5.1.4.2 Treatment na PCR

Do třech falkonek jsme si připravily premedikační roztoky dle vypočítaných koncentrací. Do každé falkonky jsme napipetovaly 5000 μ l média a příslušné léčivo/vehikulum dle Tabulky 4. Objem jedné jamky=1000 μ l. Dále jsme postupovaly jako v experimentálním designu 1. První sérii vzorků jsme nechaly inkubovat 8 hodin, druhou sérii 16 hodin.

1. Skupina kontrolní (kontrola) – Neobsahovala účinné látky, pipetovaný objem DMSO byl 2,5 μ l, vehikula 12,5 μ l, skupina zahrnovala 4 kultivační jamky.

2. Skupina atorvastatinu (ATV) – koncentrace atorvastatinu byla 5 μ M, pipetovaný objem zásobního roztoku byl 2,5 μ l, vehikula 12,5 μ l. Skupina zahrnovala 4 kultivační jamky.

3. Skupina atorvastatinu a kyseliny palmitové (ATV+PA) – koncentrace atorvastatinu byla 5 μ M, kyseliny palmitové 25 μ M. Pipetovaný objem byl u atorvastatinu 2,5 μ l a u kyseliny palmitové 12,5 μ l. Tato skupina zahrnovala 4 kultivační jamky.

Tabulka 4: Experimentální design buněk, pipetované objemy

Skupina	DMSO	ATV 5 μ M	Vehikulum	PA 25 μ M
Kontrola	2,5 μ l	x	12,5 μ l	x
ATV	x	2,5 μ l	12,5 μ l	x
ATV+PA	x	2,5 μ l	x	12,5 μ l

ATV = atorvastatin, PA = kyselina palmitová, DMSO= dimethylsulfoxid

Výpočet objemu DMSO

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

$$V_2 = \frac{5\,000\mu\text{l} \cdot 5\mu\text{M}}{10\,000\mu\text{M}} = 2,5\ \mu\text{l}$$

Výpočet objemu vehikula

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

$$V_2 = \frac{5\,000\mu\text{l} \cdot 25\mu\text{M}}{10\,000\mu\text{M}} = 12,5\ \mu\text{l}$$

Výpočet objemu ATV 5 μ M

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

$$V_2 = \frac{5\,000\mu\text{l} \cdot 5\mu\text{M}}{10\,000\mu\text{M}} = 2,5\ \mu\text{l}$$

Výpočet objemu ATV 5 μ M a PA 25 μ M

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

$$V_2 = \frac{5\,000\mu\text{l} \cdot 5\mu\text{M ATV (25}\mu\text{M PA)}}{10\,000\mu\text{M}} =$$

$$V_{(\text{ATV})} = 2,5\ \mu\text{l}, V_{(\text{PA})} = 12,5\ \mu\text{l}$$

5.2 Průtoková cytometrie

Z 12jamkových desek jsme odsály médium, přidaly 500 μ l PBS a pomalu jsme propláchly povrch misek. Potom jsme PBS odsály odsávačkou v laminárním boxu. Tento postup jsme zopakovali pro preciznější promytí. Následně jsme k buňkám přidaly 150 μ l enzymu akutáza. Mírným pohybem jsme akutázu rozprostřeli po celém povrchu misek a nechaly jsme je 5 minut inkubovat.

Po 5 minutách jsme k akutáze přidaly 100 μ l PBS s 2% FBS. Směs akutázy a PBS s 2% FBS jsme resuspendovaly pipetou a přenesly do 96jamkové desky se dnem ve tvaru „V“. Desku jsme vložily do centrifugy při 300 rcf po dobu 3 minut a vzniklý supernatant jsme odsály odsávačkou. Peletky vzniklé na dně jamek jsme resuspendovaly poklepáním desky o tvrdý povrch a do každé jamky jsme napipetovaly 200 μ l PBS se 2% FBS a znovu nechaly zcentrifugovat (300 rcf, 3 minuty). Tento proces jsme opakovaly 2krát.

Po druhém resuspendování peletky jsme do každé jamky napipetovaly 100 μ l odpovídající primární protilátky s navázaným fluoroforem. Jednotlivé protilátky jsme naředily podle Tabulky 5. Tento proces probíhal za tmy, aby nedošlo k excitaci vzorků. Dále jsme si připravily mastermix, který obsahoval smíchané protilátky v PBS s 2% FBS (Tabulka 6). Následně jsme desku inkubovaly

ve tmě v lednici při 4 °C po dobu 30 minut. Po půl hodině jsme desku znovu vložily do centrifugy (300 rcf, 3 minuty), supernatant odsály a peletku znovu resuspendovaly poklepáním desky o tvrdý povrch. Odsáním supernatantu jsme odstranily přebytečné protilátky, které se nenačázaly na buňky.

Tabulka 5: Příprava jednobarevných kontrol

Název	Protilátka na jamku	PBS na jamku
Eng	1 µl	99 µl
PI	0,5 µl	99,5 µl

Eng=endoglin; PI= propidium jodid, PBS= phosphate buffered saline (fosfátový tlumivý roztok)

Tabulka 6: Příprava mastermixu pro exp. design 1

Příprava mastermixu		
	Protilátka/ PBS na 1 jamku v µl	Protilátka/ PBS na 13 jamek v µl
Eng	1	13
PI	0,5	6,5
PBS	98,5	1280,5

Eng=endoglin; PI = propidium jodid, PBS =phosphate buffered saline (fosfátový tlumivý roztok). Tabulka znázorňuje přípravu mastermixu pro experimentální design 1. Pro ostatní dva experimentální designy jsme vypočítaly potřebné objemy podle počtu použitých jamek.

V dalším kroku jsme do každé jamky přidaly 200 µl PSB s 2% FBS, desku jsme opět zcentrifugovaly při 300 rcf, 3 minuty, odsály jsme supernatant a tento krok jsme ještě jednou zopakovaly. Nakonec jsme k peletce přidaly 150 µl PBS a vzorky byly připravené na měření pomocí cytometru (CytoFlex LX, Beckman Coulter, Kalifornie, USA).

Získané výsledky jsme vyhodnotily v programu (CytExpert Acquisition and Analysis Software) verze 2.4, Beckman Coulter, Kalifornie, USA) a exportovaly je do aplikace Excel. Z naměřených hodnot jsme vypočítaly % kontroly.

Výsledky jsme dále zpracovávaly v programu GraphPad Prism 9 (verze 9.1.0; GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA).

5.3 PCR

Den před experimentem jsem vložila chloroform, isopropylalkohol a 75% ethanol do mrazáku. 75% ethanol jsme si připravily z 96% ethanolu.

Výpočet přípravy 75 % ethanolu

$$V_1 * 75\% \text{ ethanol} = V_2 * 96\% \text{ ethanol}$$

$$V_2 = \frac{50\text{ml} * 75\%}{96\%} = 39 \text{ ml } 96\% \text{ ethanolu} + 11 \text{ ml vody}$$

Před začátkem experimentu bylo nutné nahřát roztok PBS ve vodní lázni na alespoň 20 minut.

Všechny 6jamkové desky jsme propláchly 500 μ l nahřátého PBS a následně ho odsály odsávačkou. Tento krok jsme zopakovaly, abychom odstranily co nejvíce původního média.

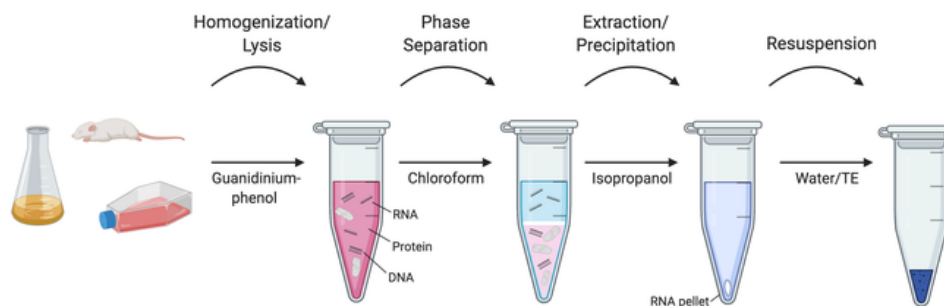
Dále jsme do každé jamky přidaly 0,5 ml Trizolu – TRI Reagent™ Solution (AM9738, Invitrogen, USA), který narušil buněčnou strukturu a dojde k uvolnění DNA, RNA a proteinů. Kultivační nádoby jsme nechaly po dobu 5 minut stát za občasného promíchání.

V dalším kroku jsme do vhodně popsaných 1,5 ml mikrocentrifugačních PCR clean zkumavek přenesly 0,5 ml této směsi z každé jamky.

Vzorky jsme zhomogenizovaly v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Dále jsme ke každému vzorku přidaly 100 μ l studeného chloroformu, protřepaly je a následně ještě zvortexovaly po dobu 10 s. Po pětiminutovém stání jsme vzorky zcentrifugovaly při 4°C a otáčkách 12 000 rpm po dobu 15 min. Po centrifugaci bylo možné pozorovat oddělující se fáze s prstencem DNA tvořícím mezifázi.

Do nové sady vhodně označených mikrocentrifugačních zkumavek jsme napipetovaly 5 μ l GenElute™-LPA (56575-1ML, Merck, Německo) pro zvýšení stability RNA a dále jsme do nich přenesly horní vrstvu z původních zkumavek. Poté jsme přidaly 250 μ l studeného isopropylalkoholu a vzorky jsme promíchaly. Nechaly jsme je stát 10 minut při pokojové teplotě a následně jsme vzorky zcentrifugovaly při 4°C a 12 000 rpm po dobu 10 minut. Po centrifugaci jsme isopropylalkohol opatrně odsály a k peletkám vzniklým na dně jsme přidaly 0,5 ml 75 % ethanolu. Každou zkumavku jsme 10 sekund promíchaly pomocí vortexu.

Ethanol jsme odsály a peletky nechaly vyschnout. Potom jsme je rozpustily ve 20 μ l vody pro injekce (aqua pro injectione, API), zvortexovaly a vložily na 20 minut do ledničky. Celý proces extrakce RNA je znázorněn na Obrázku 18.



Obrázek 18: Extrakce RNA

Obrázek znázorňuje celý proces izolace RNA. V prvním kroku dojde k rozpadu buněk (*Lysis*) a uvolnění DNA a RNA. Po přidání chloroformu a vytřepávání se oddělí 3 vrstvy (*Phase Separation*) – vodní, která obsahuje RNA, mezifáze obsahující DNA a spodní organická vrstva. Odebráním vodní vrstvy a následným přidáním isopropanolu dojde k precipitaci RNA (*Precipitation*) za vzniku pelety (*RNA pellet*). Peleta se nechá vysušit a poté se rozpustí ve vodě pro injekce – API (*water*) (133).

Po extrakci následovalo měření koncentrace RNA ve vzorcích pomocí spektrofotometru (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Německo). Na přístroji jsme nastavily faktor zředění 1.000, jednotky: ng/μl a lid factor: 40. Vzorky jsme měřily v objemu 1,5 μl. Nejprve byla potřeba změřit tzv. slepý vzorek (API), aby se odstranil vliv vehikula při měření. Po každém vzorku jsme důkladně otřely optickou plochu buničinou.

Po měření koncentrace následoval přepis RNA do cDNA. Vzorky jsme naředily do 0,2 ml PCR clean mikrozkumavek na koncentraci 100 ng/μl v objemu 10 μl podle Tabulky 7. Následně jsme si podle Tabulky 8 připravily mastermix pro reverzní transkripci (MM RT). Do 0,2 ml mikrozkumavek jsme napipetovaly 10 μl připraveného MM RT. Vzorky jsme zcentrifugovaly a následně vložily do termocykléru (Biometru TOne 96G, Analytik Jena, Německo). Po skončení přepisu jsme vzorky naředily na koncentraci 5 ng/μl přidáním 180 μl API.

V posledních krocích jsme si připravily dvě mikrocentrifugační zkumavky, v kterých jsme si připravili mastermix na PCR dle Tabulky 9. Následně jsme do každé jamky pipetovaly směs složenou z 5 μl master mixu a 0,5 μl primeru (oba TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, USA).

Nakonec jsme pipetovaly vzorky v objemu 4,5 μl do jamek v duplikátech (Tabulka 10). 96jamkovou desku jsme přelepily fólií a nechaly zcentrifugovat 2 minuty při 1000 rpm. Po centrifugaci byla deska připravená na samotný experiment. Vložily jsme jí do termocykléru (QuantStudio™ Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA) a naměřené výsledky jsme exportovaly do excelu a dále vyhodnocovaly v programu GraphPad Prism 9 (verze 9.1.0; GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA).

Tabulka 7: Ředění RNA

8h-ctrl 1	312,5	3,20	6,80
8h-ctrl 2	342	2,92	7,08
8h-ctrl 3	340	2,94	7,06
8h-ctrl 4	-	-	-
8h-5 ATV 1	148,5	6,73	3,27
8h-5 ATV 2	310	3,23	6,77
8h-5 ATV 3	-	-	-
8h-5ATV 4	330	3,03	6,97
8h-PA 1	258	3,88	6,12
8h-PA 2	330	3,03	6,97
8h-PA 3	352,5	2,84	7,16
8h-PA 4	335	2,99	7,01
16h-ctrl 1	138	7,25	2,75
16h-ctrl 2	413	2,42	7,58
16h-ctrl 3	442,5	2,26	7,74
16h-ctrl 4	447,5	2,23	7,77
16h-5 ATV 1	403	2,48	7,52
16h-5 ATV 2	406	2,46	7,54
16h-5 ATV 3	371	2,70	7,30
16h-5 ATV 4	309	3,24	6,76
16h-ATV+PA 1	361	2,77	7,23
16h-ATV+PA 2	368	2,72	7,28
16h-ATV+PA 3	360	2,78	7,22
16h-ATV+PA 4	377	2,65	7,35

Kontroly (Ctrl) jsou znázorněny šedou barvou. Číselný údaj 8h/16h vyjadřuje dobu kultivace. Vzorky 8h-ctrl 4 a 8h-5 ATV 3 nebyly k měření použity, protože došlo k odsátí peletky. Ctrl= kontrola, PA=kyselina palmitová, 5ATV=atorvastatin 5 μ M, ATV+PA=atorvastatin 5 μ M + kyselina palmitová 25 μ M

Tabulka 8: Příprava Mastermixu na reverzní transkripci

	množ. μ l	nadb. μ l	Celkový objem (μ l)
Voda bez nukleáz	4,2	4,536	117,9
Pufr pro reverzní transkripci	2	2,16	56,2
Náhodné primery pro reverzní transkripci	2	2,16	56,2
Mix deoxynukleotidtrifosfátů	0,8	0,864	22,5
Reverzní transkriptáza.	1	1,08	28,1

Tabulka znázorňuje složení mastermixu na reverzní transkripci.

Tabulka 9: Příprava Mastermixu na PCR

	Objem na jeden vzorek [μ l]	Celkový objem pro 22 vzorků [μ l]
MM	5	240
Primer	0,5	24

MM-Master mix

Tabulka 10: Rozložení vzorků na desce pro PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CTRL 1 8H	CTRL 2 8H	CTRL 3 8H	ATV 1 8H	ATV 2 8H	ATV 4 8H	P+A 1 8H	P+A 2 8H	P+A 3 8H	P+A 4 8H	x	x
B	CTRL 1 8H	CTRL 2 8H	CTRL 3 8H	ATV 2 8H	ATV 2 8H	ATV 4 8H	P+A 1 8H	P+A 2 8H	P+A 3 8H	P+A 4 8H	x	x
C	CTRL 1 16H	CTRL 2 16H	CTRL 3 16H	CTRL 4 16H	ATV 1 16H	ATV 2 16H	ATV 3 16H	ATV 4 16H	P+A 1 16H	P+A 2 16H	P+A 3 16H	P+A 4 16H
D	CTRL 1 16H	CTRL 2 16H	CTRL 3 16H	CTRL 4 16H	ATV 1 16H	ATV 2 16H	ATV 3 16H	ATV 4 16H	P+A 1 16H	P+A 2 16H	P+A 3 16H	P+A 4 16H
E	CTRL 1 8H	CTRL 2 8H	CTRL 3 8H	ATV 1 8H	ATV 2 8H	ATV 4 8H	P+A 1 8H	P+A 2 8H	P+A 3 8H	P+A 4 8H	x	x
F	CTRL 1 8H	CTRL 2 8H	CTRL 3 8H	ATV 1 8H	ATV 2 8H	ATV 4 8H	P+A 1 8H	P+A 2 8H	P+A 3 8H	P+A 4 8H	x	x
G	CTRL 1 16H	CTRL 2 16H	CTRL 3 16H	CTRL 4 16H	ATV 1 16H	ATV 2 16H	ATV 3 16H	ATV 4 16H	P+A 1 16H	P+A 2 16H	P+A 3 16H	P+A 4 16H
H	CTRL 1 16H	CTRL 2 16H	CTRL 3 16H	CTRL 4 16H	ATV 1 16H	ATV 2 16H	ATV 3 16H	ATV 4 16H	P+A 1 16H	P+A 2 16H	P+A 3 16H	P+A 4 16H

Vzorky jsme pipetovaly v duplikátech zvlášť pro každý primer. A-D – primer 1, E-H – primer 2. Ctrl= kontrola, 8 H/16 H= čas kultivace, ATV=atorvastatin 5mM, P+A= kyselina palmitová 25mM a atorvastatin 5mM, x = prázdná jamka

5.4 Sendvičová ELISA

Vzorky pro tento experiment jsme si odebraly před průtokovou cytometrií. Konkrétně jsme si odebraly 2x150 μ l supernatantu do mikrocentrifugačních zkumavek a uložily je do mrazáku (-80 °C) až do ELISA experimentu. Den před experimentem jsme si vyndaly vzorky z mrazáku, přenesly je do ledničky (4 °C). Dále bylo nutné připravit roztok záchytné primární protilátky. K dispozici jsme měly roztok protilátky o koncentraci 360 μ g/ml a potřebovaly jsme 12 ml roztoku s koncentrací 2 μ g/ml.

Výpočet množství záchytné primární protilátky:

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

$$V_2 = \frac{12000 \mu\text{g} \cdot 2 \mu\text{g/ml}}{360 \mu\text{g/ml}} = 66,7 \text{ ml}$$

Do 15 ml falkonky jsme napipetovaly 12 ml PBS, z toho jsme odebraly 66,7 μ l PBS a přidaly 66,7 μ l roztoku primární protilátky. Tento postup jsme zvolili pro co nejpřesnější napipetování objemů. Ještě ten den jsme potáhly 96jamkovou desku roztokem zachytné primární protilátky v PBS. Do každé jamky jsme napipetovaly 100 μ l roztoku. Desku jsme přelepily a nechaly přes noc inkubovat při pokojové teplotě za stálého míchání (RT, 500 rpm).

V den experimentu jsme si připravily promývací roztok (Wash buffer, WB). 20 ml koncentrovaného WB jsme přidaly ke 480 ml deionizované vody, abychom dostaly výsledný objem 500 ml.

Následně jsme si připravily roztok reagenčního činidla (Reagent diluent, RD). 8 ml koncentrovaného RD (10% BSA) jsme přidaly do 72 ml roztoku PBS, aby výsledný objem odpovídal 80 ml.

Ve chvíli, kdy jsme měly všechny potřebné roztoky připravené, jsme rychlým švihem do umyvadla vylily roztok z mikrotitrační destičky a promyly všechny jamky 250 μ l WB pomocí multikanálové pipety. Tento proces jsme provedly celkem třikrát. Po promytí jsme do jamek přidaly 250 μ l RD, desku jsme přelepily a inkubovaly při pokojové teplotě za stálého míchání (RT 500 rpm) 1 hodinu.

V dalším kroku jsme jamky znovu třikrát promyly WB. Takto jsme si připravily mikrodestičku, do které jsme v dalším kroku pipetovaly naše vzorky a kalibrační řadu.

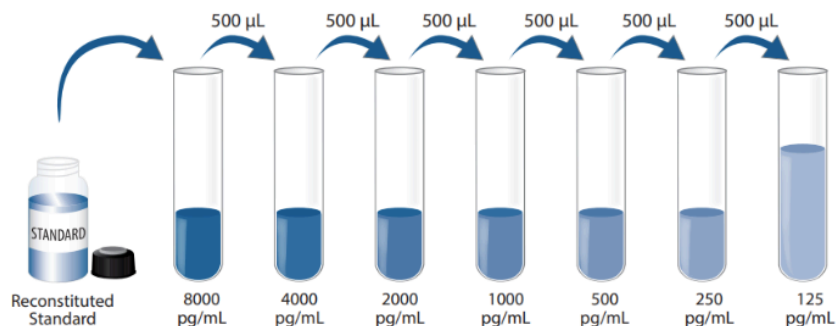
Pro vytvoření kalibrační řady jsme měly k dispozici zásobní roztok standardu o koncentraci 380 ng/ml a potřebovaly jsme získat roztok 1000 μ l roztoku o koncentraci 8 ng/ml.

Výpočet množství standardu:

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

$$V_2 = \frac{1000 \mu\text{l} \cdot 8 \text{ng/ml}}{380 \text{ng/ml}} = 21 \mu\text{l}$$

Kalibrační řadu jsme vytvořily ředěním standardu do mikrozkušavek. Do první kalibrační mikrozkušavky jsme napipetovaly 1000 μ l RD a do všech ostatních (2. – 8. mikrozkušavka) 500 μ l RD. Z první mikrozkušavky jsme odebraly 21 μ l RD, přidaly 21 μ l standardu o koncentraci 380 ng/ml a promíchaly pomocí vortexu. V dalším kroku jsme do každé následující mikrozkušavky přenesly 500 μ l z předchozí mikrozkušavky (Obr.19). Poslední mikrozkušavka obsahovala už jen čistý RD a byla využita jako slepý vzorek.



Obrázek 19: Sériové ředění

Příklad sériového ředění ze zásobního roztoku standardu (Reconstituted standard) pro vytvoření kalibrační řady. V prvním kroku se k 979 µl RD (Reagent diluent; reagenční činidlo) přidá 21 µl standardu, který představuje první bod kalibrační rady. Následně se v každém dalším kroku odebere 500 µl z předcházející mikrozkušavky a přidá se k 500 µl RD, až dokud nevznikne roztok o koncentraci 125 pg/ml. Poslední mikrozkušavka se samotným RD slouží jako slepý vzorek (134).

Vzorky do desky jsme pipetovaly v duplikátech. Do prvních dvou sloupců jsme napipetovaly 50 µl RD a 50 µl naředěných standardů taktéž v duplikátech. Do zbylých jamek jsme pipetovaly 50 µl RD a 50 µl vzorku (Tabulka 11). Desku jsme zalepily a nechaly inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě za stálého míchání (RT 500 rpm).

Po 2 hodinách jsme desku třikrát promyly WB. Pro další postup bylo potřeba připravit roztok detekční protilátky. K dispozici jsme měly roztok protilátky o koncentraci 9 µg/ml a potřebovaly jsme 12 ml roztoku s koncentrací 0,05 µg/ml.

Výpočet množství detekční sekundární protilátky:

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

$$V_2 = \frac{12000 \mu\text{g} \cdot 0,05 \mu\text{g/ml}}{9 \mu\text{g/ml}} = 66,7 \text{ ml}$$

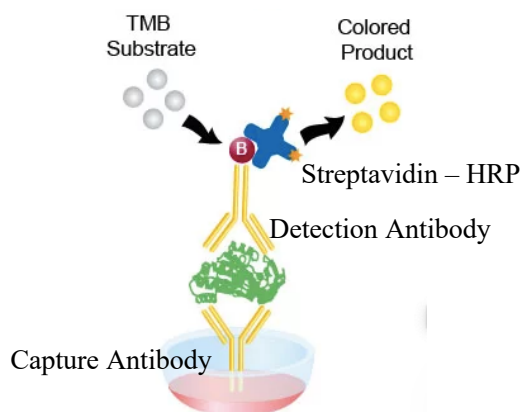
Do 15 ml falkonky jsme napipetovaly 12 ml RD, 66,7 µl RD jsme odebraly a přidaly 66,7 µl roztoku detekční protilátky. V dalším kroku jsme přidaly do jamek 100 µl detekční protilátky. Desku jsme přelepily a nechaly inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě za stálého míchání (RT, 500 rpm).

Po uplynutí 2 hodin jsme všechny jamky znovu třikrát promyly WB. Pro další kroky bylo potřeba si připravit roztok streptavidinu-HRP v RD (Obr. 20). Požadovaná koncentrace byla udána jako 200násobné zředění zásobního roztoku. Na základě poměru jsme si vypočítaly, že potřebujeme přidat 60 µl streptavidinu-HRP.

Výpočet roztoku Streptavidin-HRP:

$$x = \frac{12000\mu\text{l}}{200} = 60\mu\text{l}$$

Následně jsme tedy odebraly 60 μl z 12ml roztoku RD a napipetovaly jsme tam 60 μl streptavidinu – HRP.



Obrázek 20: Příklad využití Streptavidinu u ELISA

Obrázek znázorňuje využití systému několika protilátek. Úplně dole se nachází záchytná protilátka (*Capture Antibody*), na kterou se váže detekční protilátka (*Detection Antibody*) s navázaným enzymem. V tomto případě se využil komplex streptavidin-biotin, který zvyšuje limit detekční citlivosti. Na protilátku je připojen biotin, na který se silnou vazbou váže streptavidin, ke kterému se váže do dalších vazebných míst enzym nebo fluorofor (135, 136)

Do všech jamek jsme následně přidaly 100 μl roztoku Streptavidin-HRP, destičku jsme zalepily fólií a inkubovaly jí ve tmě 20 minut při pokojové teplotě za stálého míchání.

Po uplynutí času jsme desku znovu třikrát promyly WB. Po promytí jsme do jamek napipetovaly 100 μl tetramethylbenzidinu, který sloužil jako substrát. Po přidání substrátu jsme destičku znovu zalepily a nechaly inkubovat 20 minut ve tmě při pokojové teplotě za stálého míchání (RT, 500 rpm). Po přidání substrátu proběhla barevná reakce, jejímž výsledkem byla modrá barva.

Po 20 minutách jsme do jamek napipetovaly 50 μl roztoku kyseliny sírové, která reakci zastavila. Po přidání kyseliny sírové došlo k barevné změně z modré na žlutou. Desku jsme jemně poklepaly o dlaň a vzorky šly měřit.

Měřily jsme optickou hustotu každé jamky pomocí spektrofotometru (Synergy HTX Multi-mode reader, BioTek, USA) při vlnové délce 450 nm a 540 nm.

Tabulka 11: Rozložení vzorků na desce na ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0	0	K1	K1	ATV3	ATV3	PA1	PA1
B	125	125	K2	K2	ATV4	ATV4	PA2	PA2
C	250	250	K3	K3	ATV5	ATV5	PA3	PA3
D	500	500	K4	K4	ATV/PA1	ATV/PA1	PA4	PA4
E	1000	1000	K5	K5	ATV/PA2	ATV/PA2		
F	2000	2000	K6	K6	ATV/PA3	ATV/PA3		
G	4000	4000	ATV1	ATV1	ATV/PA4	ATV/PA4		
H	8000	8000	ATV2	ATV2	ATV/PA5	ATV/PA5		

První dva sloupce zahrnují kalibrační řadu v jednotkách pg/ml.

K1-K6= kontrola, ATV 1-5= atorvastatin, ATV/PA 1-5 = atorvastatin + kyselina palmitová, PA 1-4= kyselina palmitová. Všechny vzorky i kalibrační řadu jsme pipetovaly v duplikátech.

Nejprve jsme z výsledných hodnot absorbancí při 540nm a 450nm vytvořily tabulku tak, že jsme odečetly hodnoty koncentrací při 540nm od hodnot při 450nm (Tabulka 12). Rozdíl jednotlivých hodnot nám opravil optické nedokonalosti desky.

Tabulka 12: Rozdíl naměřené optické hustoty při 540 nm a 450 nm.

A	0,241	0,242	0,493	0,498	0,493	0,477	0,452	0,454
B	0,308	0,297	0,422	0,418	0,408	0,409	0,418	0,41
C	0,386	0,376	0,473	0,465	0,403	0,405	0,418	0,436
D	0,522	0,537	0,435	0,428	0,353	0,354	0,398	0,404
E	0,832	0,812	0,493	0,467	0,378	0,386		
F	1,472	1,387	0,457	0,449	0,388	0,401		
G	2,479	2,502	0,493	0,493	0,393	0,414		
H	3,785	3,808	0,51	0,496	0,404	0,412		

Vzorky odpovídají rozložení viz tabulka 11

Následně bylo nutné odečíst naměřené hodnoty od slepého vzorku, který nám eliminuje vliv vehikula (Tabulka 13). V dalším kroku jsme hodnoty duplikátů z předchozí tabulky zprůměrovaly (Tabulka 14). Zprůměrované hodnoty jsme vložily do online softwaru Assayfit Pro, který nám sestavil kalibrační křivku, na základě které jsme získaly výsledné koncentrace vzorků (Tabulka 15).

Tabulka 13: Odčítání optické hustoty od slepého vzorku

A	-0,0005	0,0005	0,2515	0,2565	0,2515	0,236	0,2105	0,2125
B	0,0665	0,0555	0,1805	0,1765	0,1665	0,168	0,1765	0,1685
C	0,1445	0,1345	0,2315	0,2235	0,1615	0,164	0,1765	0,1945
D	0,2805	0,2955	0,1935	0,1865	0,1115	0,113	0,1565	0,1625
E	0,5905	0,5705	0,2515	0,2255	0,1365	0,145		
F	1,2305	1,1455	0,2155	0,2075	0,1465	0,16		
G	2,2375	2,2605	0,2515	0,2515	0,1515	0,173		
H	3,5435	3,5665	0,2685	0,2545	0,1625	0,171		

Od každé hodnoty jsem odečetla hodnotu slepého vzorku (0,2415). Rozložení vzorků odpovídá tabulce 11.

Tabulka 14: Finální hodnoty optické hustoty

A	0,0000	0,254	0,2435	0,2115
B	0,0610	0,1785	0,167	0,1725
C	0,1395	0,2275	0,1625	0,1855
D	0,2880	0,19	0,112	0,1595
E	0,5805	0,2385	0,1405	
F	1,1880	0,2115	0,153	
G	2,2490	0,2515	0,162	
H	3,5550	0,2615	0,1665	

Tato tabulka zahrnuje zprůměrované hodnoty duplikátů po odečtení slepého vzorku

Tabulka 15: Výsledná koncentrace z online softwaru Assayfit Pro

A		466.475251315	448.353274776	392.322623538
B	94.9646133177	332.983669527	311.840797754	321.986366469
C	260.045539584	420.499438622	303.491282757	345.726235262
D	524.419127749	353.870760895	205.979633107	297.899521008
E	998.848099014	439.681237481	261.964091402	
F	1979.59391532	392.322623538	285.710685768	
G	4018.00644349	462.171115849	302.560759589	
H	7992.16962715	479.349561518	310.91527833	

Výsledky jsme dále zpracovávaly v statistickém programu GraphPad Prism 9 (verze 9.1.0; GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA).

6. VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky v této práci uvádíme jako medián s mezikvartilovým rozpětím. Hladinu statistické významnosti (p) jsme stanovily pomocí Mann-Whitney nebo Kruskal-Wallis testu. Za statisticky významný rozdíl se považuje hodnota $p \leq 0,05$. V případě, že hodnota statisticky významná nebyla, je označena symbolem „ns“, přičemž platí, že $p > 0,05$.

Statisticky významné hodnoty se označují symbolem „*“, přičemž platí, že: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

K vyhodnocení výsledků jsme používaly statistický program GraphPad Prism 9 (verze 9.5.1; GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA).

6.1 Proteinová exprese endoglinu

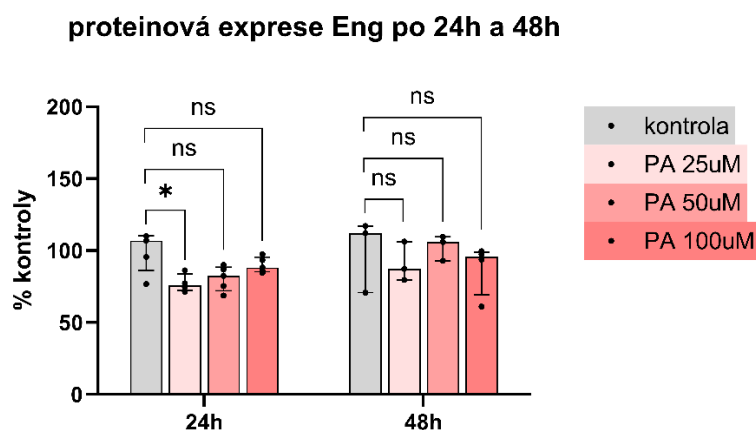
a) kyselina palmitová

Proteinovou expresi Eng jsme detekovaly průtokovou cytometrií. Nejprve jsme si stanovily koncentrace a časy inkubace dle odborné literatury, při kterých jsme očekávaly pravděpodobné změny v hladinách proteinů (137). U kyseliny palmitové (PA) jsme použily řadu koncentrací 25 μ M, 50 μ M a 100 μ M a měření jsme provedly po 24 a 48 hodinách.

V případě 24 hodinové inkubace u koncentrace 25 μ M PA bylo prokázáno signifikantní ($p \leq 0,05$) snížení proteinové exprese Eng v porovnání s kontrolou. Z tohoto důvodu jsme tuto koncentraci vybraly pro další experimenty. Koncentrace 50 μ M a 100 μ M vůči kontrole nevykazovaly signifikantní změny ($p > 0,05$) (Graf 1).

U proteinové exprese Eng po 48 hodinách jsme nezaznamenaly v žádných koncentracích signifikantní ($p > 0,05$) změnu oproti kontrole.

Graf 1: Proteinová exprese Eng po 24h a 48h



Graf znázorňuje míru proteinové exprese Eng v kontrolní skupině a ve skupinách PA 25 μ M, PA 50 μ M a PA 100 μ M. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n = 3-5$, Kruskal-Wallis test, přičemž platí že $ns p > 0,05$ a $* p \leq 0,05$. PA= kyselina palmitová

Byla publikována studie, ve které se zkoumala exprese Eng u diabetických myší krměných olejem z vaječného žloutku, jehož jednou ze složek je kyselina palmitová. V této studii docházelo ke zvýšení exprese Eng, což je oproti námi naměřeným hodnotám protichůdný výsledek (138).

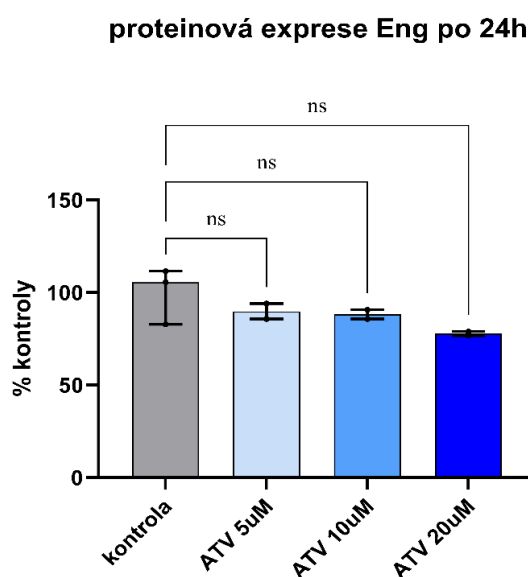
Může tomu tak být z vícero důvodů. Jedním z nich může být složení oleje z vaječného žloutku, který kromě kyseliny palmitové obsahuje i kyselinu olejovou a linolenovou, zatímco my jsme používaly jenom kyselinu palmitovou. Dále byl náš experiment prováděn na zdravých aortálních buňkách, ale zkoumaným myším byl indukován diabetes, což mohlo také ovlivnit výsledky.

b) Atorvastatin

Podobně jako v předchozím případě jsme si stanovily koncentrace a čas, při kterých jsme předpokládaly změny v proteinové expresi Eng. U atorvastatinu (ATV) jsme použily řadu koncentrací 5 μ M, 10 μ M a 20 μ M a měření jsme provedly po 24 hodinách.

Ani u jedné z koncentrací ATV nebyla detekována po 24 hodinách žádná signifikantní změna (Graf 2), ale u vyšších koncentrací jsem pomocí cytometru zaznamenaly vyšší počet mrtvých buněk, a proto jsme pro další experimenty zvolily koncentraci 5 μ M.

Graf 2: Proteinová exprese Eng po 24h



Graf znázorňuje míru proteinové exprese Eng v kontrolní skupině a ve skupinách ATV 5 μ M, ATV 10 μ M a ATV 20 μ M. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n = 2-3$, Kruskal-Wallis test, přičemž platí že $ns p > 0,05$. ATV= atorvastatin

U námi naměřených výsledků v proteinové expresi Eng po 24 hod premedikaci ATV ve vybraných koncentracích nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna.

V jiné studii na HUVEC bylo zaznamenáno zvýšení exprese Eng po podávání ATV v koncentraci 1 μ M, 3 μ M a 5 μ M (139).

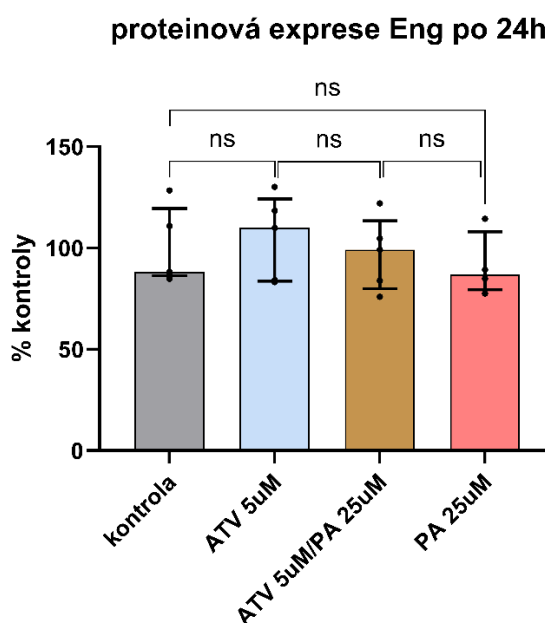
K rozdílným výsledkům jsme mohly dojít kvůli odlišnému experimentálnímu designu a jinému typu použitých buněk. Náš experiment probíhal na zdravých aortálních buňkách, ale ve zmiňované studii byly použity buňky z pupečnickové žíly, které byly premedikovány pomocí TNF- α .

c) *ATV s PA*

Dále jsme pracovaly se zvolenými koncentracemi PA 25 μM a ATV 5 μM . Měření jsme provedly po 24 hodinách.

Ani u jedné ze skupin nebyla po 24 hodinách detekovaná signifikantní ($p > 0,05$) změna v proteinové expresi Eng oproti kontrole, stejně tak nebyla zaznamenána signifikance ($p > 0,05$) při porovnávání jednotlivých skupin mezi sebou (Graf 3).

Graf 3: Proteinová exprese Eng po 24h



Graf znázorňuje míru proteinové exprese Eng v kontrolní skupině a ve skupinách ATV 5 μM , ATV 5 μM /PA 25 μM , PA 25 μM navzájem. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n = 4-5$, Mann-Whitney test, přičemž platí že $ns p > 0,05$. ATV - atorvastatin, PA - kyselina palmitová

Při experimentu, kdy jsme sledovaly vliv atorvastatinu na hyperlipidémii indukovanou pomocí kyseliny palmitové, jsme nezaznamenaly žádné signifikantní výsledky, ani u skupiny se samotnou kyselinou palmitovou. To mohlo být způsobené vyšším mezikvartilovým rozpětím v porovnání s prvním experimentem, kdy byla k premedikaci použita jenom kyselina palmitová.

V literatuře jsme našly jenom jednu obdobnou studii, ve které byl zaznamenán nárůst proteinové exprese endoglinu po podávání atorvastatinu v dávce 100mg/kg myším na západní dietě (dieta bohatá na tuky) (139).

Za pozorované rozdíly může být zodpovědný fakt, že výše zmíněná studie byla prováděna *in vivo*, zatímco co my jsme pracovaly *in vitro*. Západní dieta také obsahuje další složky, než jednom kyselinu palmitovou a v neposledním řadě se lišila i koncentrace a čas expozice atorvastatinu (2 měsíce vs 24 hodin).

6.2 mRNA exprese endoglinu a jeho transkripčních faktorů

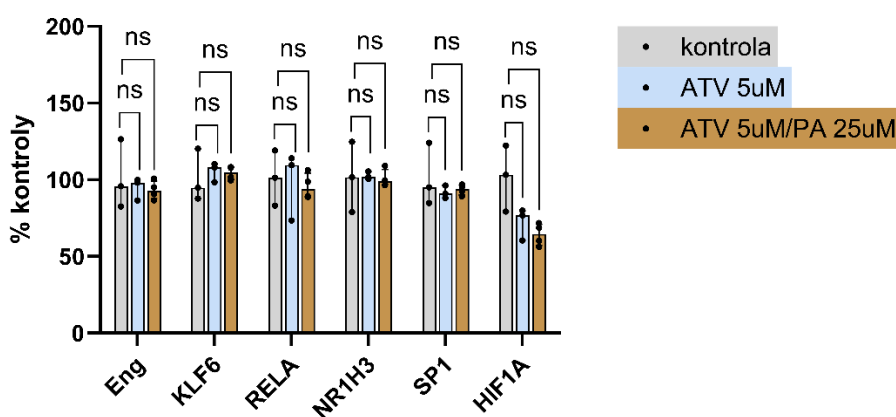
a) Premedikace 8 hodin

Pomocí metody qRT-PCR jsme měřily mRNA expresi Eng a jeho vybraných transkripčních faktorů.

Po osmi hodinové premedikaci nebyl prokázán žádný signifikantní ($p > 0,05$) vliv na expresi Eng a jeho transkripčních faktorů KLF6, RELA, NR1H3, SP1 a HIF1A u samostatně použitého ATV, tak ani u ATV/PA v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 4).

Graf 4: mRNA exprese Eng a transkripčních faktorů po 8h

mRNA exprese Eng a transkripčních faktorů po 8h

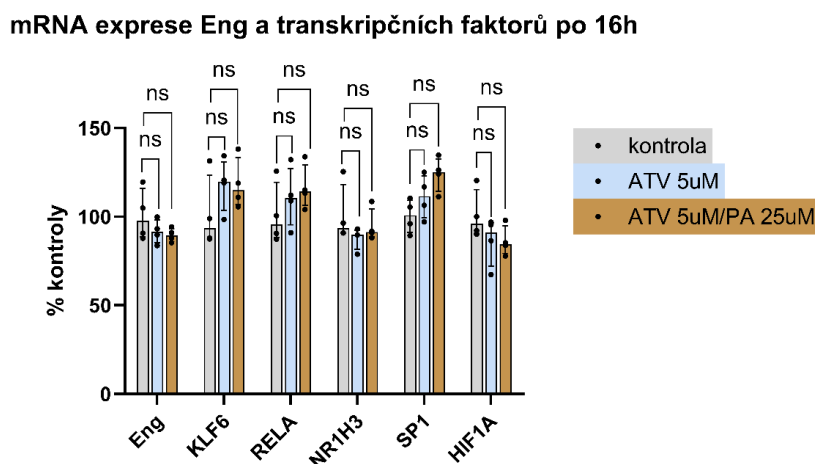


Graf znázorňuje míru mRNA exprese endoglinu a jeho transkripčních faktorů v kontrolní skupině, ve skupině ATV 5 μ M a ve skupině s ATV 5 μ M/PA 25 μ M po osmi hodinové premedikaci. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n = 3-4$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že $ns p > 0,05$. Eng – endoglin, KLF6=faktor 6 podobný Kruppelovi (Kruppel – like factor 6), RELA= podjednotka nukleárního faktoru kappa B fosforylovaná na uhlíku 65 (Nuclear factor kappa B subunit phosphorylated on carbon 65) NR1H3= člen 3 podrodiny jaderných receptorů 1 skupiny H (Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member), SP1= specifický protein 1 (Specific protein 1), HIF1A=hypoxií indukovatelný faktor 1 alfa (Hypoxia-inducible factor 1 alpha), ATV= atorvastatin, PA= kyselina palmitová.

b) Premedikace 16 hodin

Ani po šestnácti hodinové kultivaci nedošlo u buněk stimulovaných ATV nebo ATV/PA k žádné signifikantní ($p > 0,05$) změně mRNA exprese Eng ani jeho transkripčních faktorů oproti kontrolní skupině (Graf 5).

Graf 5: mRNA exprese Eng a transkripčních faktorů po 16h



Graf znázorňuje míru mRNA exprese endoglinu a jeho transkripčních faktorů v kontrolní skupině a ve skupině ATV 5 μ M a ATV 5 μ M/PA 25 μ M po šestnácti hodinové kultivaci. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n = 3-4$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že $ns p > 0,05$. Eng= endoglin, KLF6=faktor 6 podobný Kruppelovi (Kruppel – like factor 6), RELA= podjednotka nukleárního faktoru kappa B fosforylovaná na uhlíku 65 (Nuclear factor kappa B subunit phosphorylated on carbon 65) NR1H3= člen 3 podrodiny jaderných receptorů 1 skupiny H (Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member), SP1= specifický protein 1 (Specific protein 1), HIF1A=hypoxií indukovatelný faktor 1 alfa (Hypoxia-inducible factor 1 alpha), ATV= atorvastatin, PA= kyselina palmitová.

V dané koncentraci a použitých časech, jsme nepozorovaly u žádné skupiny signifikantní změnu v mRNA expresi endoglinu nebo jeho transkripčních faktorů. Naměřené výsledky odpovídaly výsledkům pozorovaným na úrovni proteinové exprese, a protože jsme nezaznamenaly žádnou změnu v expresi Eng, tak fakt, že se neměnily ani jeho transkripční faktory nebyl překvapivý.

Odlíšných výsledků bylo dosaženo v již zmíněné studii, kdy byly HUVEC buňky stimulované prostřednictvím TNF- α a atorvastatinu. Po 24hodinové kultivaci autoři zaznamenali vzestup mRNA exprese endoglinu u skupiny premedikované 5 μ M atorvastatinem s TNF- α (139). Za tyto rozdíly jsou pravděpodobně zodpovědné již zmíněné faktory, a sice použití jiného typu buněk, rozdílných časů premedikace a jiný způsob stimulace buněk (TNF- α vs PA).

Jiná studie, která byla prováděna na stejných buňkách jako jsme používaly v této diplomové práci, zkoumala vliv oxysterolu na expresi Eng a jeho transkripčních faktorů. Autoři prokázali, že stimulace pomocí oxysterolu vedla k zvýšeným hladinám mRNA exprese Eng a transkripčních faktorů KLF6, RELA a NR1H3 (38). V této práci byly ale buňky stimulované 7-ketocholesterolem, což je v porovnání s kyselinou palmitovou jiný typ látky, s odlišným mechanismem účinku, jímž působí na lidské zdraví, a proto jsou pozorované rozdíly očekávatelné.

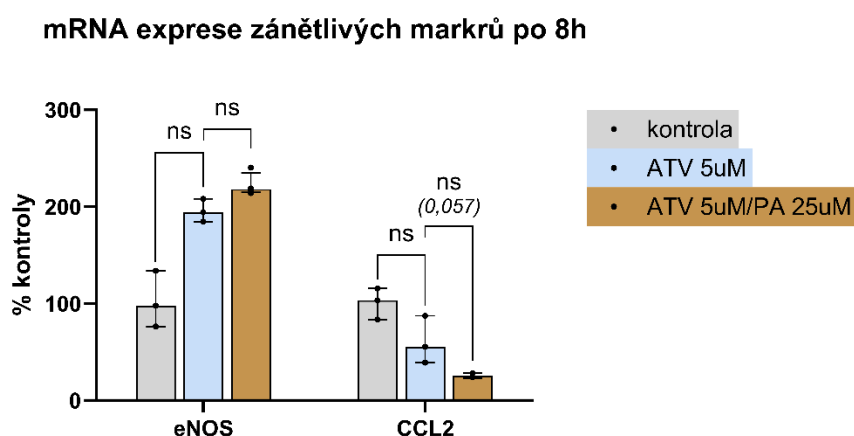
6.3 mRNA exprese zánětlivých markerů

a) Premedikace 8 hodin

Skupina buněk premedikovaná atorvastatinem nevykazovala signifikantní ($p > 0,05$) změnu exprese mRNA zánětlivého markeru CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2) v porovnání s kontrolou. V případě eNOS se mRNA exprese u stejných skupin taktéž signifikantně ($p > 0,05$) nezměnila.

Při porovnání skupiny premedikované ATV se skupinou ATV/PA nebyla zaznamenána signifikantní ($p > 0,05$) změna v mRNA expresi ani u zánětlivého markeru CCL2, ani u eNOS (Graf 6).

Graf 6: mRNA exprese zánětlivých markerů po 8h



Graf znázorňuje míru mRNA exprese zánětlivých markerů v kontrolní skupině a ve skupině ATV 5 μ M a ATV 5 μ M/PA 25 μ M po osmi hodinové kultivaci. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n = 3-4$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že ns $p > 0,05$. ATV= atorvastatin, PA= kyselina palmitová, eNOS=endoteliální syntáza oxidu dusnatého (endothelial nitric oxide synthase), CCL2= monocytární chemotaktický protein 1 (C-C motif chemokine ligand 2).

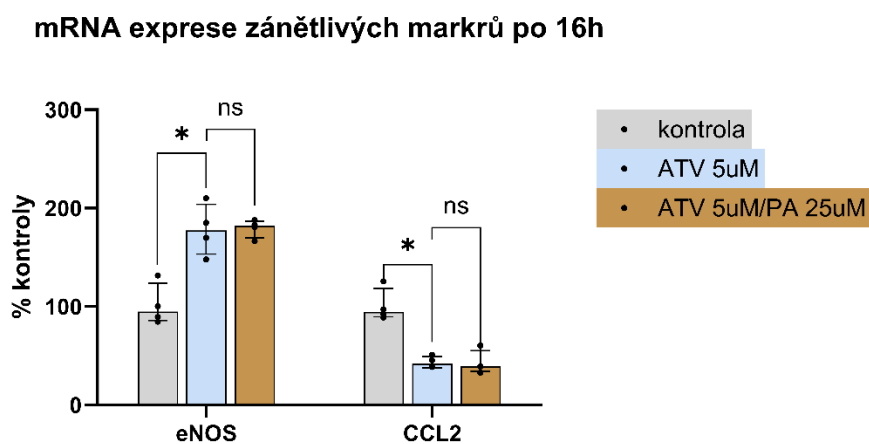
b) Premedikace 16 hodin

Po delší inkubaci byl zaznamenán signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) v mRNA expresi eNOS u skupiny ATV 5 μ M v porovnání s kontrolou. To značí, že by 5 μ M ATV mohl potenciálně zvyšovat expresi eNOS, jakožto protektivního faktoru pro ochranu endotelu. Mezi skupinami ATV a ATV/PA nebyl signifikantní ($p > 0,05$) rozdíl.

Co se týká CCL2, v případě skupiny se samotným ATV došlo s signifikantnímu poklesu ($p \leq 0,05$) mRNA exprese. Můžeme tedy předpokládat, že by ATV mohl mít vliv na snížení exprese CCL2.

Při porovnání skupiny ATV se skupinou ATV/PA nebyla zaznamenána signifikantní ($p > 0,05$) změna (Graf 7).

Graf 7: mRNA exprese zánětlivých markerů po 16h



Graf znázorňuje míru mRNA exprese zánětlivých markerů v kontrolní skupině a ve skupině ATV 5 μM a ATV 5 μM /PA 25 μM po šestnácti hodinové kultivaci. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n = 3-4$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že ns $p > 0,05$ a * $p \leq 0,05$.

ATV=atorvastatin, PA=kyselina palmitová, eNOS=endoteliální syntáza oxidu dusnatého (endothelial nitric oxide synthase), CCL2=monocytární chemotaktický protein 1 (C-C motif chemokine ligand 2)

mRNA exprese se u zánětlivých markerů měnila podle očekávání. eNOS produkuje oxid dusnatý, který působí vasodilatačně a tím působí na endotel protektivně. CCL2, též známý jako monocytární chemotaktický protein 1, je prozánětlivý chemokin, který sehrává roli v imunitním systému tím, že přitahuje monocyty (a jiné leukocyty) do místa zánětu. Podílí se tedy na různých onemocněních včetně aterosklerózy (140).

K podobným závěrům v případě eNOS došla studie, kde se porovnávaly mRNA exprese eNOS u dvou skupin myších samic krměných vysokotučnou dietou. Jedna skupina byla léčena atorvastatinem a druhá dostávala pouze vysokotučnou dietu bez jakékoliv léčby. Výsledkem bylo signifikantní zvýšení eNOS u myší, které byly léčeny atorvastatinem oproti neléčené skupině (141).

V případě CCL2 byla publikována jiná studie, kde byly na 44 pacientech se stabilní anginou pectoris ověřovány protizánětlivé účinky atorvastatinu. Po 10 týdnech užívání 20mg atorvastatinu byl u pacientů zaznamenán signifikantní pokles CCL2 oproti kontrolní skupině bez atorvastatinu (142).

6.4 Analýza solubilního endoglinu

Pomocí metody ELISA jsme měřily hladinu sEng po 24 hodinové premedikaci HAEC u skupin kontrola, ATV 5 μ M, ATV 5 μ M/PA 25 μ M a PA 25 μ M.

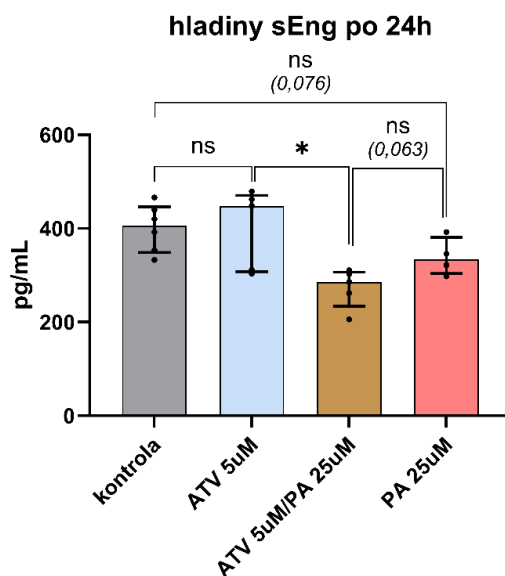
Zjistily jsme, že v tomto čase a o této koncentraci neměl 5 μ M ATV signifikantní ($p > 0,05$) vliv na hladinu sEng v porovnání s kontrolou.

Při porovnání kontrolní skupiny se skupinou PA 25 μ M jsme zaznamenaly hraniční hodnotu p ($p=0,076$), při které jsme pozorovaly klesající trend sEng oproti kontrole (Graf 8).

Při porovnání skupiny ATV s ATV 5 μ M/PA 25 μ M byl ale zaznamenán signifikantní ($p \leq 0,05$) pokles hladin sEng.

U skupiny vzorků premedikovaných ATV 5 μ M/PA 25 μ M nebyla detekovaná signifikantní ($p > 0,05$) změna v porovnání se skupinou PA 25 μ M, ale zaznamenaly jsme hraniční hodnotu p ($p=0,063$).

Graf 8: Hladiny sEng po 24h



Graf znázorňuje míru hladin sEng v kontrolní skupině a ve skupinách kontrola, ATV 5 μ M, ATV μ M/PA 25 μ a, PA 25 μ M. Výsledky jsou vyjádřené jako koncentrace [pg/ml], $n = 4-5$, Mann-Whitney test, přičemž platí že $ns p > 0,05$ a $* p \leq 0,05$. ATV= atorvastatin, PA= kyselina palmitová.

K podobným závěrům dospěla studie s aterosklerotickými myšmi, u kterých došlo po léčbě statiny k poklesu sEng (95).

Naopak, zvýšení sEng po premedikaci atorvastatinem v koncentraci 5 μ M po 24h bylo dosaženo v jiné studii na HUVEC buňkách, co mohlo být způsobeno použitím jiného typu buněk, rozdílných časů premedikace a jiného způsobu stimulace buněk (139).

7. ZÁVĚR

Výsledky prokázaly, že u buněk, u kterých byla indukovaná hyperlipidémie prostřednictvím samotné kyseliny palmitové, neměl atorvastatin ve sledovaných časech a zvolených koncentracích zásadní vliv na expresi endoglinu ani jeho transkripčních faktorů, ale na druhou stranu zásadně ovlivnil mRNA expresi souvisejících biomarkerů zánětu eNOS a CCL2.

Na definitivní potvrzení anebo vyvrácení faktu, že endoglin sehrává roli u hyperlipidémie léčené atorvastatinem, jsou potřebné další *in vitro* a *in vivo* studie.

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled skupin vzorků pro exp. design 1.....	35
Tabulka 2: Přehled skupin vzorků pro exp. design 2.....	37
Tabulka 3: Přehled skupin vzorků pro exp. design 3.....	38
Tabulka 4: Experimentální design buněk, pipetované objemy.....	40
Tabulka 5: Příprava jednobarevných kontrol.....	41
Tabulka 6: Příprava mastermixu pro exp. design 1	41
Tabulka 7: Ředění RNA	44
Tabulka 8: Příprava Mastermixu na reverzní transkripci	44
Tabulka 9: Příprava Mastermixu na PCR	45
Tabulka 10: Rozložení vzorků na desce pro PCR	45
Tabulka 11: Rozložení vzorků na desce na ELISA	49
Tabulka 12: Rozdíl naměřené optické hustoty při 540 nm a 450 nm.	49
Tabulka 13: Odčítání optické hustoty od slepého vzorku.....	50
Tabulka 14: Finální hodnoty optické hustoty	50
Tabulka 15: Výsledná koncentrace z online softwaru Assayfit Pro	50

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura endoglinu	11
Obrázek 2: Signální dráhy endoglinu	14
Obrázek 3: Vznik solubilního endoglinu	15
Obrázek 4: Stavba cévní stěny	16
Obrázek 5: Vývoj endotelové dysfunkce ze zdravého endotelu	17
Obrázek 6: Biomarkery endotelové dysfunkce	18
Obrázek 7: Typy buněk	20
Obrázek 8: Rozdíly mezi jednotlivými typy lipoproteinů.	21
Obrázek 9: Fredricksonova klasifikace hyperlipidémie a souvislost s manifestací kardiovaskulárních onemocnění a pankreatitid.	22
Obrázek 10: Projevy hyperlipidémie	23
Obrázek 11: Mechanismus účinku atorvastatinu (statinů)	24
Obrázek 12: Schéma vícebarevného průtokového cytometru	26
Obrázek 13: Dot plot a Histogram	27
Obrázek 14: Přehled druhů ELISA	28
Obrázek 15: Kompetitivní ELISA	29
Obrázek 16: Schéma PCR	30
Obrázek 17: Princip sondy TaqMan	31
Obrázek 18: Extrakce RNA	43
Obrázek 19: Sériové ředění	47
Obrázek 20: Příklad využití Streptavidinu u ELISA	48

10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Proteinová exprese Eng po 24h a 48h	52
Graf 2: Proteinová exprese Eng po 24h	53
Graf 3: Proteinová exprese Eng po 24h	54
Graf 4: mRNA exprese Eng a transkripčních faktorů po 8h.....	55
Graf 5: mRNA exprese Eng a transkripčních faktorů po 16h.....	56
Graf 6: mRNA exprese zánětlivých markerů po 8h	57
Graf 7:mRNA exprese zánětlivých markerů po 16h	58
Graf 8: Hladiny sEng po 24h	59

11. POUŽITÁ LITERATURA

1. Jeng KS, Sheen IS, Lin SS, Leu CM, Chang CF. The Role of Endoglin in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6).
2. Frank C, McDonald D, Lieber R, Sabiston P. Biochemical heterogeneity within the maturing rabbit medial collateral ligament. *Clin Orthop Relat Res.* 1988(236):279-85.
3. Vicen M, Igreja Sa IC, Tripska K, Vitverova B, Najmanova I, Eissazadeh S, et al. Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(6):2405-18.
4. Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;224(1):4-11.
5. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007;454(3):345-59.
6. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004;93(1):105-13.
7. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-69.
8. Feletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease.* San Rafael (CA)2011.
9. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):1983-92.
10. Karetová.
Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárných chorob. *Internal Medicine for practice.* 2002.
11. Karr S. Epidemiology and management of hyperlipidemia. *Am J Manag Care.* 2017;23(9 Suppl):S139-S48.
12. Sizar O, Khare S, Jamil RT, Talati R. Statin Medications. *StatPearls. Treasure Island (FL)2024.*
13. MUDr. Karel Urbánek PD, Doc. MUDr. Richard Češka C. Atorvastatinum. *Remedia.* 2009.
14. Meurer SK, Weiskirchen R. Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
15. Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol.* 2007;365(3):694-705.
16. Garcia-Pozo L, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodriguez T, Garcia-Monzon C. [Endoglin: structure, biological functions, and role in fibrogenesis]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008;100(6):355-60.
17. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1990;265(15):8361-4.
18. Bot PT, Hofer IE, Sluijter JP, van Vliet P, Smits AM, Lebrin F, et al. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke.* 2009;40(2):439-47.
19. St-Jacques S, Forte M, Lye SJ, Letarte M. Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod.* 1994;51(3):405-13.

20. Meurer S, Wimmer AE, Leur EV, Weiskirchen R. Endoglin Trafficking/Exosomal Targeting in Liver Cells Depends on N-Glycosylation. *Cells*. 2019;8(9).
21. Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, et al. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*. 1992;22(2):393-7.
22. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol*. 1993;23(9):2340-5.
23. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, et al. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res*. 2008;103(12):1383-92.
24. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*. 2003;5(5):410-21.
25. Oujo B, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Curr Mol Med*. 2013;13(8):1345-57.
26. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood*. 1998;92(12):4677-90.
27. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(46):43799-808.
28. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A, Bernabeu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34486-94.
29. Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Gonzalez-Nunez M, Llano E, et al. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. 2012;126(22):2612-24.
30. Gallardo-Vara E, Blanco FJ, Roque M, Friedman SL, Suzuki T, Botella LM, et al. Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis*. 2016;19(2):155-71.
31. Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, et al. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9500-5.
32. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo 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):4001-10.
33. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023-.
34. Patel M, Horgan PG, McMillan DC, Edwards J. NF-kappaB pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Transl Res*. 2018;197:43-56.
35. Poma P. NF-kappaB and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
36. Legrand-Poels S, Schoonbroodt S, Matroule JY, Piette J. Nf-kappa B: an important transcription factor in photobiology. *J Photochem Photobiol B*. 1998;45(1):1-8.
37. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*. 2008;412(3):477-84.

38. Vicen M, Vitverova B, Havelek R, Blazickova K, Machacek M, Rathouska J, et al. Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro. *FASEB J.* 2019;33(5):6099-114.
39. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(1):266-71.
40. Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci.* 2007;14(5):543-53.
41. Reichert CO, de Freitas FA, Levy D, Bydlowski SP. Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. *Vitam Horm.* 2021;116:409-36.
42. Brownfoot FC, Hannan N, Onda K, Tong S, Kaitu'u-Lino T. Soluble endoglin production is upregulated by oxysterols but not quenched by pravastatin in primary placental and endothelial cells. *Placenta.* 2014;35(9):724-31.
43. Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, Bernabeu C, Marceau G, Saru JP, et al. Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod.* 2008;78(6):968-75.
44. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004;23(20):4018-28.
45. Krekeler G, Schilli W, Lenz P. [Supported dentures in the periodontally damaged residual dentition in combination with enosseous implantations]. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1977;32(4):315-7.
46. Townson SA, Martinez-Hackert E, Greppi C, Lowden P, Sako D, Liu J, et al. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem.* 2012;287(33):27313-25.
47. Paauwe M, ten Dijke P, Hawinkels LJ. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(4):421-35.
48. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7(4):327-39.
49. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390(6659):465-71.
50. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267(27):19027-30.
51. Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(6):233-51.
52. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis.* 2008;11(1):79-89.
53. Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E, Goumans MJ, Heldin CH, et al. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392(3):283-8.
54. Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, et al. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res.* 2005;96(6):684-92.
55. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 2004;18(3):609-11.
56. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI, Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 1995;333(14):918-24.

57. Prigoda NL, Savas S, Abdalla SA, Piovesan B, Rushlow D, Vandezande K, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *J Med Genet.* 2006;43(9):722-8.
58. Schoonderwoerd MJA, Goumans MTH, Hawinkels L. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules.* 2020;10(2).
59. Margioula-Siarkou G, Margioula-Siarkou C, Petousis S, Margaritis K, Vavoulidis E, Gullo G, et al. The role of endoglin and its soluble form in pathogenesis of preeclampsia. *Mol Cell Biochem.* 2022;477(2):479-91.
60. Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(10):4141-50.
61. Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JJ, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med.* 2010;8:86.
62. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitis GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:302-12.
63. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(2):168-75.
64. Ng HY, Lee KA, Kuo CN, Shen YF. Bioprinting of artificial blood vessels. *Int J Bioprint.* 2018;4(2):140.
65. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
66. Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(3):183-98.
67. MUDr. Michal Vrablík PD, Michaela Janotová, MUDr. Eva Motyková, MUDr. Martina Prusíková, III. interní klinika 1. LF UK a VFN P. Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Med praxi* 2011; 8(3): 119–12. 2011.
68. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003;108(16):1917-23.
69. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation.* 2003;108(17):2041-8.
70. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
71. Kaur R, Singh V, Kumari P, Singh R, Chopra H, Emran TB. Novel insights on the role of VCAM-1 and ICAM-1: Potential biomarkers for cardiovascular diseases. *Ann Med Surg (Lond).* 2022;84:104802.
72. Medina-Leyte DJ, Zepeda-Garcia O, Dominguez-Perez M, Gonzalez-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
73. Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, et al. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood.* 2013;121(2):403-15.
74. Varejckova M, Gallardo-Vara E, Vicen M, Vitverova B, Fikrova P, Dolezelova E, et al. Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF-kappaB and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sci.* 2017;175:52-60.

75. Lippi M, Stadiotti I, Pompilio G, Sommariva E. Human Cell Modeling for Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
76. Marx V. Cell-line authentication demystified. *Nat Methods.* 2014;11(5):483-8.
77. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(3):443-50.
78. Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res.* 2006;5(4):862-78.
79. Wistuba, II, Behrens C, Milchgrub S, Syed S, Ahmadian M, Virmani AK, et al. Comparison of features of human breast cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res.* 1998;4(12):2931-8.
80. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 2000;24(3):227-35.
81. Cao Y, Gong Y, Liu L, Zhou Y, Fang X, Zhang C, et al. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *J Appl Toxicol.* 2017;37(12):1359-69.
82. Torres-Vazquez J, Kamei M, Weinstein BM. Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):43-59.
83. Deng DX, Tsalenko A, Vailaya A, Ben-Dor A, Kundu R, Estay I, et al. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ Res.* 2006;98(2):200-8.
84. Donnini D, Perrella G, Stel G, Ambesi-Impombato FS, Curcio F. A new model of human aortic endothelial cells in vitro. *Biochimie.* 2000;82(12):1107-14.
85. Human Umbilical Vein Endothelial Cells [updated 14.5.2024. Available from: <https://www.stemcell.com/products/human-umbilical-vein-endothelial-cells.html>.
86. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984;25(12):1277-94.
87. Lipoproteins for Lipid Transport [Available from: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Fundamentals_of_General_Organic_and_Biological_Chemistry_\(LibreTexts\)/24%3A_Lipid_Metabolism/24.02%3A_Lipoproteins_for_Lipid_Transport](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Fundamentals_of_General_Organic_and_Biological_Chemistry_(LibreTexts)/24%3A_Lipid_Metabolism/24.02%3A_Lipoproteins_for_Lipid_Transport).
88. . SGFA. Review Article on Hyperlipidemia: Types, Treatments and New Drug Targets. *Biomed Pharmacol J* 2014;7(2).
89. Mainieri F, La Bella S, Chiarelli F. Hyperlipidemia and Cardiovascular Risk in Children and Adolescents. *Biomedicines.* 2023;11(3).
90. MUDr. Eva Motyková MMV, Ph.D., Centrum preventivní kardiologie IikLUaV, Praha, . Eruptivní xantomatóza. *Med praxi* 2012; 9(2): 82. 2012.
91. MUDr. Eva Tůmová dMMV, CSc., Centrum preventivní kardiologie IikLUaV, Praha. Arcus lipoides corneae. *Med praxi* 2013; 10(11–12): 395.
92. Dyslipidémie [Cerebrovaskulární manuál]. Available from: <https://www.manual-cmp.cz/dyslipidemie/>.
93. Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Nachtigal P. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis.* 2015;243(2):383-8.
94. Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Brcakova E, Kudlackova Z, et al. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J.* 2011;75(7):1747-55.

95. Rathouska J, Vecerova L, Strasky Z, Slanarova M, Brckova E, Mullerova Z, et al. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 2011;64(1):53-9.
96. Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2000;153(2):323-35.
97. Agarwala A, Kulkarni S, Maddox T. The Association of Statin Therapy with Incident Diabetes: Evidence, Mechanisms, and Recommendations. *Curr Cardiol Rep.* 2018;20(7):50.
98. McIver LA, Siddique MS. Atorvastatin. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2024.
99. Atorvastatin Krka 10mg [Available from: <https://mediately.co/cz/drugs/YTEzJD2LJZY7Q0Blvkg7nQa5dx/atorvastatin-krka-10mg-potahovana-tableta>].
100. Doležal MT. Rabdomyolýza jako nežádoucí účinek statinů. *Remedia.* 2009.
101. Banga JD. [Myotoxicity and rhabdomyolysis due to statins]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2001;145(49):2371-6.
102. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5 1 -5 1 11.
103. Nusse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutat Res.* 1997;392(1-2):109-15.
104. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-76.
105. Wilkerson MJ. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012;42(1):53-71.
106. Understanding the instrumentation basics [Available from: <https://www.abcam.com/en-cz/technical-resources/guides/flow-cytometry-guide/understanding-the-instrumentation-basics>].
107. Flow Cytometers [Available from: <https://www.learnhaem.com/courses/flow-cytometry/lessons/flow-cytometers/>].
108. Zuzana ŠINKOROVÁ LZR, Univerzita obrany krFvzh, Hradec Králové. UPLATNĚNÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE VE VOJENSKÉ MEDICÍNĚ A RADIOBIOLOGII [Available from: <https://mmsl.cz/pdfs/mms/2008/04/08.pdf>].
109. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol.* 2013;133(9):e12.
110. Hornbeck P. Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Chapter 2:Unit 2 1.
111. Engvall E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem.* 2010;56(2):319-20.
112. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005;51(12):2415-8.
113. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond).* 2016;77(7):C98-101.
114. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2017;1592:79-94.
115. ELISA - POPIS METODY [Available from: https://www.kbg.fpvai.ukf.sk/LMB/VLMB/elisa_popis.html].
116. Hornbeck P, Winston SE, Fuller SA. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Curr Protoc Mol Biol.* 2001;Chapter 11:Unit11 2.

117. Mahmood Ahmad Khan¹ JA, Department of Biochemistry SDtbU, Ghaziabad, U.P.,India *Correspondence to: Dr Juhi Aggarawal. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Basic Principle And Clinical Significance In The Field Of Medical Research. 2022.
118. An introduction to the different types of ELISA tests [Available from: <https://www.integra-biosciences.com/china/en/blog/article/types-of-elisa-tests>].
119. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. Natl Med J India. 1992;5(3):115-9.
120. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol. 2013;133(3):1-4.
121. Powledge TM. The polymerase chain reaction. Adv Physiol Educ. 2004;28(1-4):44-50.
122. Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase chain reaction : basic protocols. Methods Mol Biol. 1993;15:1-29.
123. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006;27(2-3):95-125.
124. Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR). StatPearls. Treasure Island (FL)2024.
125. Killelea T, Ralec C, Bosse A, Henneke G. PCR performance of a thermostable heterodimeric archaeal DNA polymerase. Front Microbiol. 2014;5:195.
126. Yamagami T, Ishino S, Kawarabayasi Y, Ishino Y. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. Front Microbiol. 2014;5:461.
127. Polymerase Chain Reaction: 4 Components [Available from: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/pcr-principle>].
128. S. Wadlea b, *,1, M. Lehnerta,1, S. Rubenwolfa, R. Zengerlea,b,c, F. von Stetten. Real-time PCR probe optimization using design of experiments approach. 2016.
129. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. J Mol Endocrinol. 2005;34(3):597-601.
130. C. Löfström MHJ, T. Hansen, M.S.R. Søndergaard, J. Hoorfar. 9 - Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens. High Throughput Screening for Food Safety Assessment Biosensor Technologies, Hyperspectral Imaging and Practical Applications Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2015:Pages 219-48.
131. The principles of real time PCR using TaqMan [Available from: https://www.researchgate.net/figure/The-principles-of-real-time-polymerase-chain-reaction-PCR-using-TaqMan-chemistry-The_fig2_9065527].
132. Zainuddin A, Chua KH, Abdul Rahim N, Makpol S. Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. BMC Mol Biol. 2010;11:59.
133. RNA Extraction Without a Kit [Available from: <https://www.addgene.org/protocols/kit-free-rna-extraction/>].
134. DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM Human Endoglin/CD105 [Available from: https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy1097.pdf?_ga=2.38967211.963785544.1715700799-1291451283.1715700798].
135. Sandwich ELISA Protocol [Available from: <https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/>].

136. Signal enhancement in ELISA: Biotin-streptavidin technology against gold nanoparticles 2016 [Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658361216300439>].
137. Zhu W, Yang G, Chen N, Zhang W, Gao Q, Li T, et al. CTRP13 alleviates palmitic acid-induced inflammation, oxidative stress, apoptosis and endothelial cell dysfunction in HUVECs. *Tissue Cell*. 2024;86:102232.
138. Ili P, Sari F. Egg yolk oil accelerates wound healing in streptozotocin induced diabetic rats. *Biotech Histochem*. 2023;98(2):94-111.
139. Zemankova L, Varejckova M, Dolezalova E, Fikrova P, Jezkova K, Rathouska J, et al. Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(3):403-13.
140. Barker CE, Thompson S, O'Boyle G, Lortat-Jacob H, Sheerin NS, Ali S, et al. CCL2 nitration is a negative regulator of chemokine-mediated inflammation. *Sci Rep*. 2017;7:44384.
141. Nachtigal P, Pospisilova N, Vecerova L, Micuda S, Breckova E, Pospisilova K, et al. Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(3):265-74.
142. Mirjanic-Azaric B, Rizzo M, Sormaz L, Stojanovic D, Uletilovic S, Sodin-Semrl S, et al. Atorvastatin in stable angina patients lowers CCL2 and ICAM1 expression: pleiotropic evidence from plasma mRNA analyses. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1526-31.