

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv glipizidu na expresi a funkci endoglinu a s ním souvisejících biomarkerů endotelové dysfunkce u diabetu mellitu II. typu

Iva Vochozková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala PharmDr. Kataríně Tripské, Ph.D. za její podporu, trpělivost, přátelský přístup, odborné vedení a výbornou komunikaci při psaní celé této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za umožnění psaní diplomové práce na katedře biologických a lékařských věd, podporu a snadnou komunikaci. Poslední poděkování patří mé rodině za podporu a pomoc v průběhu 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

Iva Vochozková

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	8
POUŽITÉ ZKRATKY	10
1. ÚVOD	12
2. TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1 Endoglin	14
2.1.1 Struktura a exprese endoglinu	14
2.1.2 Regulace endoglinu	16
2.1.3 Signalizace a funkce endoglinu	17
2.1.4 Solubilní endoglin	19
2.2 Endotel	19
2.2.1 Endotelová dysfunkce	21
2.2.2 Úloha endoglinu v endotelové dysfunkci	23
2.2.3 Typy endotelových buněk používaných ve výzkumu kardiovaskulárního systému	24
2.3 Diabetes mellitus	26
2.3.1 Definice a typy	26
2.3.2 Úloha endoglinu u diabetu mellitu	29
2.4 Glipizid	29
2.4.1 Mechanismus účinku	30
2.4.2 Indikace, kontraindikace, nežádoucí účinky	31
2.5 Metody detekce endoglinu	33
2.5.1 Průtoková cytometrie	33
2.5.2 Adheze monocytů k endotelovým buňkám	35
2.5.3 PCR	36
2.5.4 ELISA	38
3. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE	42
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1 Typy buněk	43

4.2	Příprava vzorků	43
4.2.1	Rozmrazování buněk	43
4.2.2	Pasážování buněk.....	45
4.2.3	Premedikace buněk.....	46
4.3	Experimenty	50
4.3.1	Průtoková cytometrie	50
4.3.2	PCR	53
4.3.3	ELISA	57
4.3.4	Adheze monocytů k endotelovým buňkám	63
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	67
5.1	Proteinová exprese endoglinu a zánětlivých molekul.....	67
5.2	mRNA exprese endoglinu a transkripčních faktorů	70
5.3	mRNA exprese markerů zánětu	73
5.4	Analýza sEng.....	76
5.5	Adheze monocytů	77
6.	ZÁVĚR	78
7.	SEZNAM TABULEK	79
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
9.	SEZNAM GRAFŮ.....	81
10.	POUŽITÁ LETERATURA.....	82

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce: Vliv glipizidu na expresi a funkci endoglinu a sním souvisejících biomarkerů endotelové dysfunkce u diabetu mellitu II. typu

Autor: Iva Vochozková

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

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak glipizid ovlivňuje expresi a funkci endoglinu, jeho transkripčních faktorů a souvisejících biomarkerů endotelové dysfunkce, hladinu solubilního endoglinu a adhezi monocytů na lidské diabetické endotelové buňky koronárních artérií.

Metody: V této diplomové práci jsme pracovali s lidskými diabetickými endotelovými buňkami koronárních artérií. Ty jsme v různých časech a koncentracích premedikovali glipizidem. Pomocí průtokové cytometrie jsme měřili proteinovou expresi endoglinu a biomarkerů endotelové dysfunkce. Pomocí průtokové cytometrie jsme měřili také adhezi monocytů k endotelovým buňkám. ELISA metodou jsme detekovali hladiny solubilního endoglinu a pomocí PCR jsme měřili mRNA expresi endoglinu, jeho transkripčních faktorů a markerů zánětu.

Výsledky: Prokázali jsme, že premedikace 200 μ M koncentrací glipizidu vedla ke snížení proteinové exprese endoglinu po 24 i 48 hodinách. Po 24 hodinách došlo taktéž ke zvýšení proteinové exprese adhezní molekuly ICAM-1. Po premedikaci 100 μ M glipizidem došlo u adhezní molekuly VCAM-1 po 48 hodinách ke snížení proteinové exprese. Také jsme zjistili, že po 16 hodinové premedikaci 200 μ M glipizidem dochází ke snížení mRNA exprese transkripčních faktorů Sp1, HIF-1 α a markeru zánětu CCL2. Za stejných podmínek dochází naopak ke zvýšení mRNA exprese ICAM-1 a po 8 hodinové premedikaci dochází také ke zvýšení mRNA exprese E-selektinu. Ve zkoumaných

časech a koncentracích neměl glipizid signifikantní vliv na adhezi monocytů, ani na tvorbu sEng.

Závěr: Závěrem je že, glipizid ovlivňuje expresi endoglinu a souvisejících adhezních molekul a markerů, které jsou spojeny s endotelovou dysfunkcí. Snížení exprese endoglinu naznačuje možný terapeutický potenciál glipizidu v regulaci cévních funkcí. Aby bylo možné plně porozumět a potvrdit vliv glipizidu na endoglin a další aspekty endotelové dysfunkce, je nezbytné provést další podrobné *in vitro* a *in vivo* studie.

Klíčová slova: endoglin, endotelová dysfunkce, diabetes mellitus, glipizid

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Effect of glipizide on the expression and function of endoglin and related biomarkers of endothelial dysfunction in type II diabetes mellitus

Author: Iva Vochozková

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

Aim: The aim of this thesis was to determine how glipizide affects the expression and function of endoglin, its transcription factors and related biomarkers of endothelial dysfunction, soluble endoglin levels and monocyte adhesion to human diabetic coronary artery endothelial cells.

Methods: In this thesis we worked with human diabetic coronary artery endothelial cells. These were premedicated with glipizide at various times and concentrations. We measured protein expression of endoglin and biomarkers of endothelial dysfunction using flow cytometry. We also measured monocyte adhesion to endothelial cells using flow cytometry. We detected soluble endoglin levels by ELISA and measured mRNA expression of endoglin, its transcription factors and markers of inflammation by PCR.

Results: We demonstrated that premedication with 200 μ M concentration of glipizide led to a decrease in endoglin protein expression after 24 and 48 hours. The protein expression of the adhesion molecule ICAM-1 was also increased after 24 hours. After premedication with 100 μ M glipizide, the adhesion molecule VCAM-1 showed a decrease in protein expression after 48 hours. We also found that mRNA expression of the transcription factors Sp1, HIF-1 α and the inflammation marker CCL2 was reduced after 16 hours premedication with 200 μ M glipizide. In contrast, under the same conditions there is an increase in mRNA expression of ICAM-1 and after 8 hours premedication there is also an increase in mRNA expression of E-selectin. At the times and concentrations examined, glipizide had no significant effect on monocyte adhesion or sEng formation.

Conclusion: In conclusion, glipizide affects the expression of endoglin and related adhesion molecules and markers that are associated with endothelial dysfunction. The reduction in endoglin expression suggests a possible therapeutic potential of glipizide in the regulation of vascular function. Further detailed in vitro and in vivo studies are required to fully understand and confirm the effect of glipizide on endoglin and other aspects of endothelial dysfunction.

Keywords: endoglin, endothelial dysfunction, diabetes mellitus, glipizide

POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky	Význam zkratky česky
ALK 1-7	activin receptor like kinase 1-7	kináza 1-7 podobná aktivinovému receptoru
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BMP-9	bone morphogenetic protein 9	kostní morfogenetický protein 9
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	C-C motiv chemokinového ligandu 2
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CRP	C-reactive protein	C-reaktivní protein
D-HCAEC	diseased human coronary artery endothelial cells	lidské nemocné endotelové buňky koronárních artérií
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus type 1	diabetes mellitus I typu
DM2	diabetes mellitus type 2	diabetes mellitus II typu
DNA	deoxyribonucleotide acid	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetylsulfoxid
EC	endothelial cells	endoteliální buňky
ED	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkce
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzymově značený imunosorbentní test
ENG	Endoglinu	endoglin
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
FBS	fetal bovine serum	fetální hovězí sérum
FC	flow cytometry	průtoková cytometrie
FCS	forward scatter	přímý rozptyl
GDM	gestational diabetes mellitus	gestační diabetes mellitus
GLI	Glipizide	glipizid
HAEC	human aortic endothelial cells	lidské aortální endotelové buňky
HCAEC	human coronary artery endothelial cells	lidské endotelové buňky koronárních artérií
HHT	hereditary hemorrhagic telangiectasia	hereditární hemoragická telangiektázie
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 alpha	hypoxií indukovatelný faktor alfa
HMVEC	human microvascular endothelial cells	lidské mikrovaskulární endotelové buňky
HRP	horseradish peroxidase	křenová peroxidáza
Hsp90	heat shock protein 90	protein tepelného šoku 90
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	endotelové buňky lidské pupečnickové žíly
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	mezibuněčná adhezí molekula 1
IL1 β	interleukin 1 beta	interleukin 1 beta
KLF6	Kruppel-like factor 6	Kruppelovi podobný faktor 6
KVS	cardiovascular systém	kardiovaskulární systém
LDL	low density lipoprotein	lipoprotein s nízkou hustotou

L-Eng	long-endoglin	dlouhý endoglin
LXR	liver X nuclear factor	játrní X receptor
MM	master mix	master mix
MMP-14	matrix metalloproteinase 14	matricová metaloproteináza 14
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NF-κB	nuclear factor kappa B	nukleární faktor kappa B
NR1H3	nuclear receptor subfamily 1 group H member 3	nukleární receptor podrodiny 1 skupiny H člen 3
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
NOS3	nitric oxide synthase 3	syntáza oxidu dusnatého 3
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový tlumivý roztok
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězcová reakce
PD	Photodiode	fotodioda
PDZ motif	PDZ motif	PDZ motiv
PI	propidium iodide	propidium jodid
PMT	pohotomultiplier tube	fotonásobič
real-time PCR	real-time polymerase chain reaction	polymerázová řetězcová reakce v reálném čase
rcf	relative centrifugal force	relativní centrifugační síla
RELA	p65 subunit of nuclear factor kappa B	p65 podjednotka nukleárního faktoru kappa B
RGD	arginyl-glycyl-aspartic acid	arginin-glycin-asparágová kyselina
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
SELE	Selectin	selektin
sEng	soluble endoglinu	solubilní endoglin
S-Eng	short-endoglin	krátký endoglin
Smad	suppressor of mothers against decapentaplegic	Smad protein
Sp1	specific protein 1	specifický protein 1
SSC	side scatter	boční rozptyl
TGF-β	transforming growth factor beta	transformující růstový faktor beta
THP-1	human leukemia monocytic cell line	lidská monocytární leukemická buněčná linie
TNFα	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrotizující faktor alfa
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	vaskulární adhezní molekula 1
ZP	zona pellucida	zóna pellucida

1. ÚVOD

Endoglin je transmembránový glykoprotein, který se nachází na povrchu různých typů buněk, jako jsou endotelové buňky nebo buňky imunitního systému a je členem superrodiny transformujícího růstového faktoru beta (1). Pomáhá při regulaci proliferace a migrace endotelových buněk a hraje důležitou roli při udržování kardiovaskulární homeostázy (2). Jeho exprese na endotelových buňkách je regulována pomocí různých transkripčních faktorů, jako je například HIF-1 α , KLF-6, NF- κ B nebo LXR (3, 4). Endoglin je zároveň spojován i s řadou patologických procesů, jako je ateroskleróza, arteriální hypertenze, diabetes mellitus, fibróza, nádorový růst a další poruchy cévního systému (1, 5).

Endotel je složen z monovrstvy endotelových buněk a vystýlá vnitřní povrch cév. Tato vrstva buněk hraje klíčovou roli v udržování homeostázy v těle a má mnoho důležitých funkcí (6). Funkce endotelu zahrnují regulaci průtoku krve, srážení krve, regulaci propustnosti cév, účast na imunitních reakcích, angiogenezi nebo syntézu bioaktivních látek jako je oxid dusnatý, prostacykliny, endotelin a další. Když se naruší některá z těchto fyziologických funkcí, nastává endotelová dysfunkce (5, 7).

Endotelová dysfunkce je charakterizována zhoršením cévní relaxace a zvýšením cévního odporu, který vede ke zvýšení krevního tlaku a poškození orgánů. Dysfunkce způsobuje přechod endotelu do zánětlivého stavu, který je charakteristický například zvýšenou vaskulární permeabilitou, produkcí prozánětlivých cytokinů, adhezních molekul a chemokinů. Endotelová dysfunkce je spojena s řadou kardiovaskulárních onemocnění, jako je hypertenze, chronické srdeční selhání, ischemická choroba srdeční či diabetes mellitus (7, 8).

Diabetes mellitus je onemocnění charakteristické zvýšenou hladinou glukózy v krvi, nedostatkem inzulínu nebo inzulínovou rezistencí. Projevuje se příznaky, jako jsou únava, hubnutí, zvýšená chuť k jídlu, časté močení nebo infekce (9). Nejčastěji se setkáváme s diabetes mellitus typu II, který je spojen hlavně s genetickými predispozicemi, obezitou a nesprávným životním stylem (10). S diabetes mellitus se pojí řada komplikací jako je neuropatie, nefropatie či retinopatie a může různými mechanismy přispívat ke vzniku endotelové dysfunkce (9).

Glipizid je perorální antidiabetikum ze skupiny derivátu sulfonylmočoviny a je používán k léčbě diabetes mellitus 2. typu (11). Jeho hlavním mechanismem účinku je stimulace sekrece inzulínu z β - buněk pankreatu, zvýšení periferního využití glukózy a potlačení produkce glukózy v játrech (12). Glipizid je ideálním lékem do kombinace léčiv v případě selhání monoterapie metforminem (11).

V této diplomové práci se budeme věnovat vlivu glipizidu na expresi a funkci endoglinu, jeho transkripčních faktorů, souvisejících biomarkerů endotelové dysfunkce, solubilního endoglinu a adhezi monocytů na lidské diabetické endotelové buňky koronárních artérií.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Endoglin

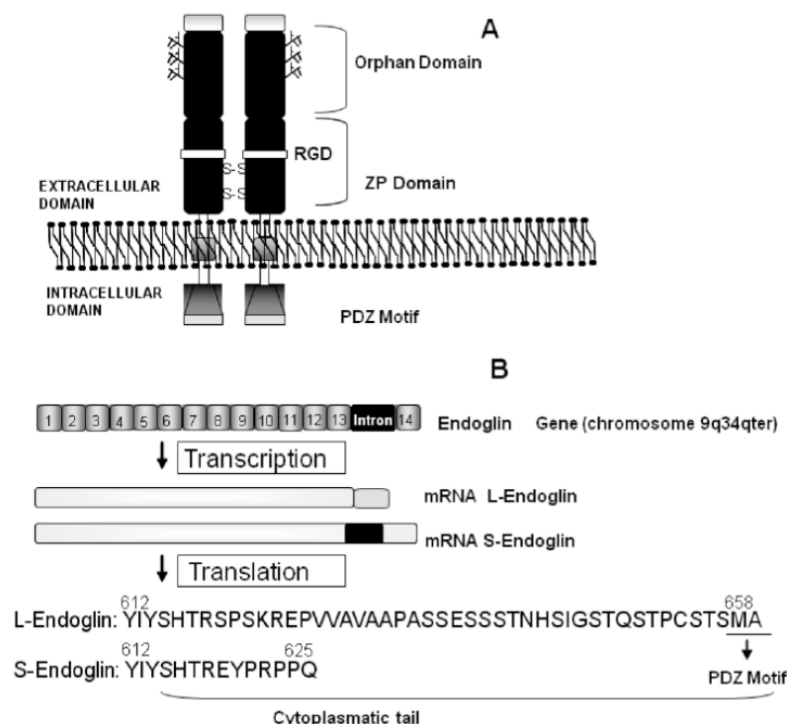
Endoglin neboli CD105 je koreceptorem superrodiny transformujícího růstového faktoru β (transforming growth factor β , TGF- β) (1).

2.1.1 Struktura a exprese endoglinu

Lidský endoglin má velikost 180 kDa a strukturně ho řadíme mezi homodimerní membránové glykoproteiny. Tvoří jej dvě podjednotky vázané disulfidickou vazbou a je schopný vazby s TGF- β 1, TGF- β 3, kostním morfogenetickým proteinem 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP-9), aktivinem a dalšími ligandy TGF- β nadrodiny (1, 2). TGF- β 1 a 3 jsou spolu s BMP9 nejdůležitějšími ligandy pro regulaci signalizace endoglinu v EC (13).

Endoglin je složen z extracelulární části, hydrofobní transmembránové a krátké intracelulární části. Intracelulární doména se vyznačuje serinovými a threoninovými zbytky a extracelulární část obsahuje osiřenou doménu a část zóna pellucida (zone pellucide, ZP). Tato zóna je zodpovědná za interakci protein-protein a část ZP tvoří arginin-glycin-asparagová kyselina (arginylglycylaspartic acid, RGD). RGD je základní rozpoznávací strukturou pro vazbu na integriny a jiné RGD receptory (2).

Endoglin existuje ve dvou izoformách: dlouhá (long endoglin, L-Eng) a krátká (short endoglin, S-Eng), které se liší afinitou k receptorům, úrovní jejich fosforylace a mají taky rozdílný počet aminokyselin v intracelulární doméně (obrázek 1) (1). Intracelulární doména L-Eng se skládá ze 47 aminokyselin, je vysoce fosforylována a přítomná hlavně v endoteliálních buňkách. Stimuluje převážně migraci, proliferaci a angiogenezi. Intracelulární doména S-Eng je složená pouze ze 14 aminokyselin. Je to minoritní forma, která naopak inhibuje migraci a proliferaci endotelových buněk, co vede k jejich stárnutí (13). V této práci se budeme věnovat převážně L-Eng, který je dominantní a jeho úloha je lépe prozkoumaná.



Obrázek 1: Schématické znázornění endoglinu

A) Endoglin je disulfidově vázaný a jeho extracelulární oblast obsahuje zónu pelucidu (ZP domain) a sirotčí doménu (orphan domain). Na obrázku je naznačena pozice RGD motivu a PDZ motivu. B) Obrázek vyobrazuje sestřihový mechanismus generující L a S endoglinu. Gen endoglinu obsahuje 15 exonů, prochází alternativním stříhem, který vede ke dvěma mRNA kódujícím L a S endoglin. Retence intronu mezi exonem 13 a 14 vede ke vzniku S-Eng. Translace pak vede ke dvěma odlišným izoformám, které se od sebe liší aminokyselinovým složením. Motiv PDZ je přítomen pouze v L-endoglinu (2, 14).

Endoglin je exprimován především na endotelových buňkách (endothelial cells, EC). Ve zdravých epiteliálních buňkách je endoglin zvýšeně exprimován během hojení ran, a u některých karcinomů (1, 13). Během krvetvorby je endoglin exprimován na hematopoetických kmenových buňkách. Endoglin je také exprimován na monocitech, vrozených imunitních buňkách, v adaptivním imunitním systému, fibroblastech, mezenchymálních kmenových buňkách a buněčných fibroblastech spojených s rakovinou (1, 2).

2.1.2 Regulace endoglinu

Gen lidského endoglinu je umístěn na chromozomu 9 a skládá se z exonů 1 až 8, 9A, 9B a 11 až 14. Endoglin má krátkou cytoplazmatickou doménu, která odráží jeho funkci jako koreceptoru modulujícího odpověď. Vyžaduje tak další receptory pro indukci signalizace (1, 15).

Regulace endoglinu nejčastěji probíhá pomocí TGF- β , BMP-9 a hypoxie. Stimulací endoteliálních buněk se spouští ligand-dependentní zvýšení exprese, a to vede ke zvýšení transkripce endoglinu. Endoglinová exprese na buněčném povrchu je pak regulována uvolněním receptoru (1, 2).

Hypoxie je jedním z nejlépe prozkoumaných induktorů exprese endoglinu a hypoxií indukovatelný faktor 1 alfa (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α) má zde zásadní roli (1). Když klesne saturace kyslíku, HIF-1 α se přesune do jádra a dimerizuje s HIF-1 β . Tento heterodimer se váže na část elementu v endoglinovém promotoru, a to vede k odezvě na hypoxii. Spolu se specifickým proteinem 1 (specific protein 1, Sp1) stimuluje expresi endoglinové mediátorové ribonukleové kyseliny (messenger ribonucleic acid, mRNA) a následnou syntézu proteinů (13, 16).

Expresi endoglinu je regulována i dalšími transkripčními faktory jako je například jaterní X receptor alfa (liver X receptor alpha, LXR α). LXR je spojen s metabolismem cholesterolu, kde se váže na oxysteroly a aktivuje expresi cílového genu (15, 17). V endoglinovém promotoru se váže na LXR responzivní element a aktivuje tak expresi endoglinu (18). Dalším transkripčním faktorem může být nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B), který má klíčovou roli v regulaci imunitního systému, buněčné diferenciaci, proliferaci a angiogenezi. Dále se za transkripční faktor endoglinu považuje také člen rodiny faktorů podobných Kruppelovi 6 (Kruppel-like factor 6, KLF6), který se váže na GC oblast promotoru a je schopen pozitivně regulovat expresi genů pro endoglin pomocí tzv. zinkových prstů (4). KLF6 může působit také jako koaktivátor NF- κ B. nebo může modulovat aktivitu signálních drah jako je TGF- β , a tím regulovat expresi endoglinu (19, 20).

2.1.3 Signalizace a funkce endoglinu

Receptory TGF- β dělíme do třech typů: receptory typu I, kam řadíme kinázy podobné aktivinovému receptoru 1-7 (activin receptor like kinase 1-7, ALK1-7), receptory typu II (TGF- β , BMPR2 a další) a receptory typu III, kam se řadí endoglin a betaglykan (21, 22).

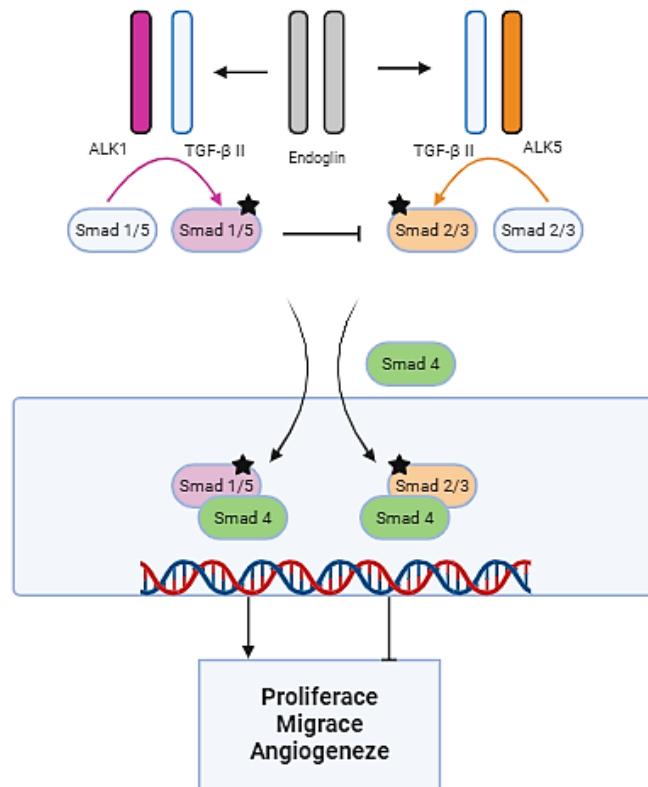
Receptory typu I a II tvoří komplex, zatímco receptor typu III může modulovat přenesený signál. Receptor typu II transfosforyluje a aktivuje receptor typu I (23). Aktivací receptoru typu I můžeme docílit fosforylace skupiny příbuzných proteinů Smad (Suppressor of Mothers against Decapentaplegic, Smad), které přenesou signál do jádra. Aby se mohl endoglin navázat na své ligandy, potřebuje spolupráci receptorů typu I a II. Podle toho, zda endoglin vytvoří komplex s ALK1 nebo ALK5, se aktivuje příslušná Smad signální dráha (22-24). Aktivace signální dráhy ALK1/Smad1/5 vede k proliferaci a migraci, zatímco aktivace ALK5/Smad2/3 této akce inhibuje (obrázek 2). Tímto mechanismem se udržuje rovnováha mezi signálními drahami a endoglin tak reguluje, zda jsou buňky v aktivním nebo klidovém stavu (24-26).

Většina funkcí endoglinu je spojována s TGF- β . Jelikož moduluje buněčné odpovědi TGF- β 1, aktivně se tak podílí na angiogenním procesu (14, 27).

Mutací v endoglinu nebo ALK1 dochází k hereditární hemoragické telangiektázii (HHT) (28). Je to autozomálně dominantní vaskulární porucha charakterizovaná telangiektáziemi (dilatace cév) a arteriovenózními malformacemi (v plicích, játrech a mozku). Zatímco mutace ALK1 vedou k HHT2, HHT1 je výsledkem mutací v externí doméně endoglinu (19, 25). Tyto mutace ve většině případů vedou k předčasným stop kodonům a zkráceným endoglinovým proteinům. Mutované proteiny mohou být chybně složeny, jsou nestabilní a nedostanou se na buněčný povrch (29). U heterozygotních myší exprimujících endoglin se objevují vaskulární abnormality jako je HHT. Kromě narušené angiogeneze mají také zhoršenou regulaci vaskulárního tonu závislou na syntéze endoteliálního oxidu dusnatého (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) (14, 25).

Endoglin je taktéž vysoce exprimován v nádorovém endotelu a protilátky proti endoglinu byly použity k vyvolání antiangiogenních účinků a k zacílení aktivovaných

endoteliálních buněk v různých modelech nádorových myší. Provedené studie s použitím různých protilátek proti endoglinu odhalily zvýšené hladiny v různém spektru nádorů. Vysoké hodnoty endoglinu byly objeveny například v nádorovém endotelu tlustého střeva, prsu, mozku, plic, prostaty či děložního čípku. Tato skutečnost potvrzuje, že endoglin má v angiogenezi klíčovou roli (14, 24).



Obrázek 2: Endoglin a signální dráhy TGF-β

Poté co endoglin vytvoří komplex s receptorem TGF-β typu II se aktivuje receptor TGF-β typu I (ALK1 nebo ALK5), který fosforyluje transkripční faktory Smad 1/5 nebo Smad 2/3 (označeno hvězdou). V dalším kroku vytvoří tyto transkripční faktory komplex se Smad 4 a přemístí se do jádra, kde aktivují transkripci. Aktivací signální dráhy ALK1/Smad1/5 dojde ke zvýšení proliferace, migrace a angiogeneze, zatímco aktivace dráhy ALK5/Smad2/3 tyto procesy inhibuje (23, 26) (obrázek vytvořený autorkou). ALK1 a 5 – kináza podobná aktivinovému receptoru 1 a 5, TGF-β II – transformující růstový faktor β typu II.

2.1.4 Solubilní endoglin

Solubilní endoglin (soluble endoglin, sEng) je tvořen extracelulární doménou membránového endoglinu. Solubilní forma vzniká proteolytickým štěpením membránových izoform, ve kterém hraje zásadní roli membránová metaloproteináza 14 (matrix metalloproteinase 14, MMP-14). Tato metaloproteináza štěpí vazbu glycin-leucin v pozici 586 a uvolňuje tak extracelulární doménu do plazmy (2).

sEng se vyskytuje v systémové cirkulaci při stavech jako je aktivace endotelu nebo naopak zánět stárnutí či poškození endotelu. Z toho důvodu byly zvýšené hladiny solubilní formy nalezeny v moči, plasmě a séru pacientů s různými patologickými stavy, jako je preeklampsie, ateroskleróza a u některých typů nádorů. Vysoké hladiny můžeme pozorovat také u pacientů s infarktem myokardu, diabetem nebo hypertenzí (1, 25, 30).

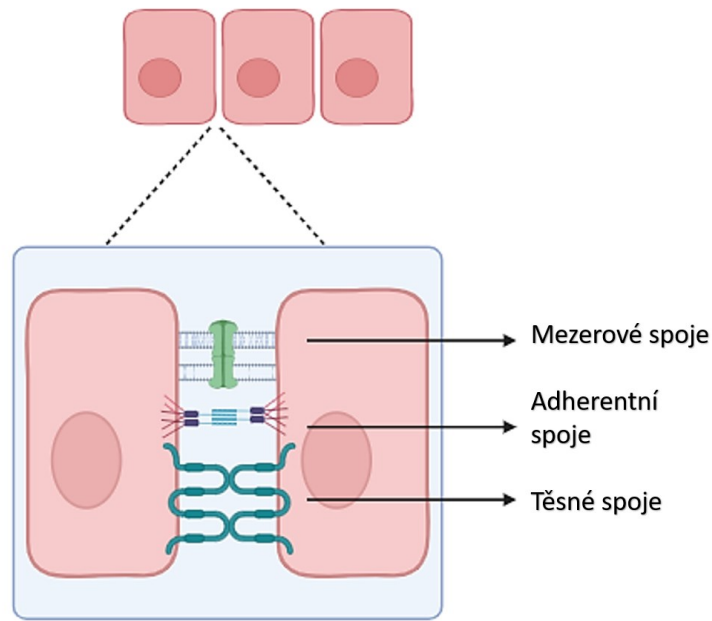
Zvýšené uvolňování sEng je důsledkem také například hypoxie a děložní ischemie. sEng je nejen biomarkerem onemocnění, ale také antiangiogenním faktorem u preeklampsie (31). Toto onemocnění se vyznačuje hypertenzí a proteinurií ve třetím trimestru těhotenství. sEng spolupracuje s rozpustnou formou receptoru 1 pro vaskulární endotelový růstový faktor na indukcii dysfunkce EC (8). Mechanismus antiangiogenního účinku sEng spočívá v inhibici aktivace eNOS zprostředkovanou TGF- β 1 v EC (2, 31).

Inhibice aktivace eNOS vede ke snížení produkce NO a zabránění vazodilatace a angiogeneze. To naznačuje, že sEng narušuje vaskulární remodelaci a udržování, které později mohou vést k abnormalitám (2).

2.2 Endotel

Endotel je tvořen jednou vrstvou dlaždicových endoteliálních buněk (EC). Podle toho, zda jsou v přímém kontaktu s krví nebo lymfou je můžeme rozdělit na vaskulární a lymfatické endoteliální buňky. Tyto buňky vystýlají cévy celého oběhového systému a regulují tok tekutin a látek (32, 33). Mezi EC se nacházejí mezibuněčná spojení a adhezní struktury tvořené transmembránovými adhezními molekulami. Adhezní

molekuly jsou propojené se sítí cytoplazmatických a cytoskeletárních proteinů a společně se podílí na komunikaci mezi buňkami a řízení vaskulární permeability buněk. Mezibuněčné spoje můžeme rozdělit do tří typů: těsné spoje, adhezní spoje a mezerové spoje (obrázek 3) (32).



Obrázek 3: Mezibuněčné spojení EC

Obrázek znázorňuje typy mezibuněčného spojení. Mezerové spoje umožňují přímou výměnu iontů a malých molekul mezi buňkami. Mezi adhezními spoji se nachází adhezní molekuly VE-kadherín a nektin, které se vážou na adhezní molekuly sousedních buněk a zajišťují tak adhezi mezi buňkami. Centrálními složkami těsných spojů jsou transmembránové proteiny kladudin a okludin. Těsné spoje zabraňují nekontrolovatelné difuzi látek mezi buňkami (34) (obrázek vytvořený autorkou).

Endotel je endokrinní orgán, který má v organismu mnoho funkcí. Mezi nejdůležitější funkce vaskulárního endotelu patří filtrace tekutin, hemostáza, kontrola trombolýzy a trombózy, tonu krevních cév a s tím související regulace průtoku krve. Mezi další funkce můžeme zařadit například transport hormonů nebo interakci leukocytů a trombocytů s cévní stěnou (6, 30).

Jak už bylo zmíněno, endotelové buňky za fyziologických podmínek zabraňují trombóze, a to prostřednictvím antikoagulačních a antiagregačních mechanismů. Jeden ze způsobů kontroly srážecích systémů endoteliálních buněk je regulace exprese vazebných míst pro antikoagulační a prokoagulační faktory. Ve fyziologickém stavu endotelové buňky podporují aktivitu antikoagulačních drah a udržují tak homeostázu v různých orgánech. Jestliže je rovnováha narušena, může to mít význam v řadě patologických stavů (1, 5).

Endoteliální buňky jsou zdrojem mnoha různých regulačních látek. Jednou z nejdůležitějších regulačních látek je oxid dusnatý (nitrogen oxide, NO). NO vzniká z L-argininu působením NO syntázy a difunduje do buněk hladkého svalstva cév, kde způsobuje vazodilataci. Má funkci nejen jako relaxační faktor, ale také přispívá k inhibici agregace krevních destiček prostřednictvím stimulace aktivace guanylátcyklázy nebo inhibicí kalciových kanálů. NO má také vliv na adhezi monocytů na endotel. Regulací exprese adhezních molekul nebo ovlivněním aktivace integrinu na povrchu EC může snižovat adhezi monocytů k EC, což může vést k různým patologiím endotelu (5, 35). NO má mnoho ochranných funkcí jako je například omezení vaskulárního zánětu, proliferace vaskulárního hladkého svalstva či produkce tkáňových faktorů (5, 6).

Endotelové buňky mohou také uvolňovat faktory jako je endotelin 1, angiotensin II a superoxid, které vyvolávají nebo přispívají k vyvolání konstriktce. Tyto faktory spolu s NO a dalšími látkami hrají důležitou roli ve vaskulárním růstu a při regulaci vaskulárního tonu. Dysfunkce těchto systémů pak může vést ke kardiovaskulárním onemocněním (7, 8).

2.2.1 Endotelová dysfunkce

Endotelová dysfunkce (endothelial dysfunction, ED) je charakterizována především snížením biologické dostupnosti vazodilatátorů jako je NO, zvýšenou vaskulární permeabilitou, produkcí prozánětlivých cytokinů a adhezních molekul, zvýšenou produkcí chemokinů, adhezí leukocytů k endotelu a agregací trombocytů (7). Tyto poruchy endotelu způsobují prozánětlivé, proliferativní a prokoagulační prostředí,

které může vést ke vzniku aterosklerózy. S rozvojem aterosklerózy pak souvisí další kardiovaskulární onemocnění jako například arteriální hypertenze, chronické srdeční selhání, diabetes mellitus typu II a další. Kardiovaskulární rizikové faktory vedou ke zvýšené produkci zánětlivých mediátorů jako je nekrotizující faktor alfa (tumor necrosis factor alfa, TNF- α), interleukin-1 (IL-1) a C-reaktivní protein (CRP). Těto prozánětlivé cytokiny se vážou na příslušné receptory a to vede k aktivaci NF- κ B, po které následuje stimulace transkripce adhezních molekul E-selektinu, mezibuněčné adhezní molekuly 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) a vaskulární buněčné adhezní molekuly 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) (obrázek 4) (8).

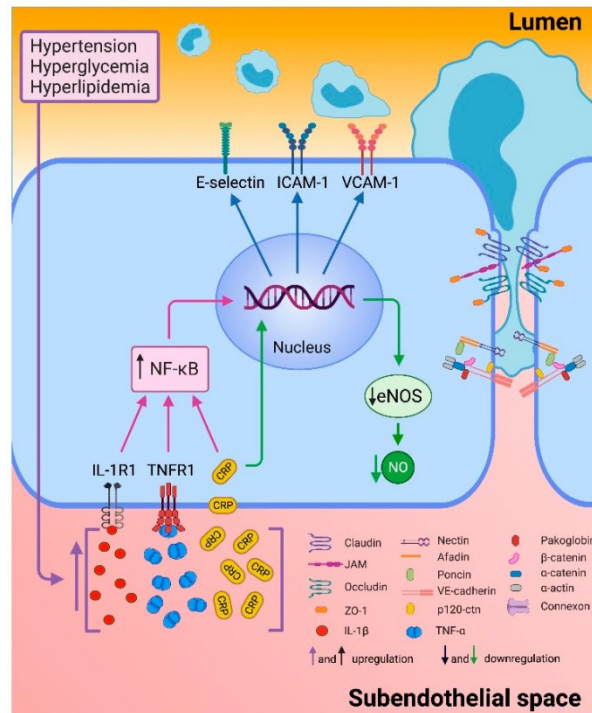
V průběhu zánětlivých procesů je integrita endotelu snižena a to může vést k oslabení mezibuněčných spojů a migraci leukocytů do subendotelového prostoru. Selektiny jsou zodpovědné za zachycení a rolování leukocytů na povrchu vaskulárních EC. E-selektin je exprimovaný na povrchu EC aktivovaných zánětlivými cytokiny. Na povrchu EC se v klidovém stavu nevyskytuje. Dalším ukazatelem ED je P-selektin, který je syntetizován a ukládán v sekrečních granulech krevních destiček, z nichž se může po stimulaci zánětlivými mediátory přemístit na povrch EC. Jeho exprese byla prokázána i v poškozeném endotelu aterosklerotického plátu, což naznačuje, že zvýšenou expresi P-selektinu můžeme považovat za indikátor ED (33).

Dalším typickým znakem aktivovaného endotelu je zvýšená exprese VCAM-1. VCAM-1 je exprimovaný aktivovanými EC, které byly aktivovány prozánětlivými cytokiny, reaktivními formami kyslíku (reactive oxygen species, ROS) nebo oxidovaným lipoproteinem s nízkou hustotou (low density lipoprotein, LDL). Je klíčovým regulátorem adheze leukocytů a transendotelové migrace a jeho exprese byla zjištěná v místech, kde se typicky vyskytuje ateroskleróza (33, 35).

Stimulací EC prozánětlivými cytokiny se také zvyšuje exprese ICAM-1. Solubilní forma ICAM-1 byla detekována v plazmě pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a také korelovala se závažností onemocnění. Tato zjištění tedy naznačují, že jak ICAM-1, tak jeho rozpustná forma mohou být cennými biomarkery odrážejícími vývoj ED a aterosklerózy (8, 36).

Dalším projevem ED je snížená biologická dostupnost NO důsledkem snížené produkce eNOS anebo zvýšené eliminace NO prostřednictvím ROS. eNOS je důležitým

enzymem udržující správnou funkci endotelu. Když je jeho aktivita snížena, může to vést k rozvoji ED (34, 36).



Obrázek 4: Biomarkery endotelové dysfunkce

Endotelová dysfunkce může být způsobena hypertenzí, hyperglykemií a hyperlipidemií, což vede ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů IL-1β, TNF-α a CRP. Tyto cytokiny se poté vážou na příslušné receptory a dochází k aktivaci NF-κB, který stimuluje transkripci biomarkerů endotelové dysfunkce (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1). Kromě toho CRP také snižuje transkripci eNOS, což vede ke snížení produkce NO (28, 33). IL-1β – interleukin 1 beta, TNF-α – tumor nekrotizující faktor alfa, CRP – c-reaktivní protein, NF-κB – nukleární faktor kappa B, ICAM-1 – mezibuněčná adhezni molekula 1, VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezni molekula 1, eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého, NO – oxid dusnatý

2.2.2 Úloha endoglinu v endotelové dysfunkci

Několik studií poukázalo na rozdílné úlohy endoglinu v ED. Endoglin ovlivňuje signalizaci TGF-β a studie *in vitro* naznačují, že zvyšuje eNOS ovlivněním proteinů Smad. Smad2/3 je klíčovou složkou signální dráhy TGF-β a endoglin je koexprimován se

Smad2, fosforylovaným Smad2/3 a eNOS v aterosklerotických lézích u myši (26, 35, 37). Endoglin interaguje s eNOS a stabilizuje jej podporou jeho spojení s proteinem tepelného šoku 90 (heat shock protein 90, Hsp90). Tato interakce zajišťuje správnou aktivitu eNOS a produkci NO. V EC s deficitem endoglinu jsou hladiny proteinu eNOS sníženy v důsledku sníženého biologického poločasu proteinu eNOS (30, 31, 38, 39). Spojení mezi eNOS a Hsp90 je v těchto buňkách narušeno a v důsledku toho produkce NO klesá a vytváří se více superoxidu. (28, 30). Nevázaný eNOS a narušená myogenní odpověď jsou časnými událostmi v patogenezi HHT1 (33). Z toho vyplývá, že endoglin má roli při regulaci aktivity eNOS, ovlivňuje vaskulární tonus, biologickou dostupnost NO a celkové kardiovaskulární zdraví (28, 30).

Na druhé straně některé studie ukazují, že zvýšená exprese endoglinu při zánětlivých stavech vede ke zvýšené adhezi a transendotelové migraci leukocytů. V některých *in vitro* a *in vivo* studiích bylo popsáno, že membránový endoglin interaguje také prostřednictvím RGD peptidu s leukocytárními integriny (40). Mohl by se tak podílet na zánětlivé infiltraci leukocytů a adhezi trombocytů na endotel prostřednictvím integrinů (37, 40). Bylo také zjištěno, že přítomnost oxysterolů nebo vaskulární stres, zvyšují transkripci endoglinu zvýšením transkripčních faktorů KLF6, LXR a NF-κB. Zvýšené hladiny endoglinu byly zaznamenány i u pacientů s arteriální hypertenzí a diabetes mellitus (16, 40, 41).

2.2.3 Typy endotelových buněk používaných ve výzkumu kardiovaskulárního systému

Abychom mohli identifikovat události v kardiovaskulárním systému, potřebujeme spolehlivé *in vitro* a *in vivo* modely. Pochopení, jak fungují nejen fyziologické ale i patogenní procesy jako je zánět, metabolické, strukturní změny a genetické faktory je klíčem k úspěšné terapii (16, 41, 42).

Kardiovaskulární systém (cardiovascular system, KVS) z velké části tvoří právě endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva. Jejich spolupráce je důležitá ke správné činnosti KVS a naopak dysfunkce některého z typu buněk může vést k různým patologiím (43). Nejlepší metodou pro pochopení mechanismů patologie je přímá

analýza buněk postiženého orgánu. Buňky izolované z nativní tkáně mají zachovanou svou buněčnou morfologii, ale často jsou méně dostupné, drahé a mohou mít omezenou životnost (44, 45).

Druhým typem buněk používaných při KVS studiích jsou buněčné linie. Tento typ buněk může projít opakovaným pasážováním a jejich výhodou může být rychlá proliferace a snadnější pěstování v kultuře. Na rozdíl od primárních buněk se ale buněčné linie často geneticky a fenotypově liší od svého tkáňového původu a vykazují výrazné morfologické změny. Mohou jim například chybět některé funkční markery, které si primární buňky zachovávají (45, 46).

Vaskulární EC hrají velmi důležitou roli při regulaci vaskulárního tonu, aterogenezi a angiogenezi. Většina studií používá primární arteriální a venózní endoteliální buňky izolované například z pupečnickové žíly (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), aorty (human aortic endothelial cells, HAEC), koronárních arterií (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) (obrázek 5) nebo mikrovaskulární endotelové buňky (human microvascular endothelial cells, HMVEC) (47, 48).

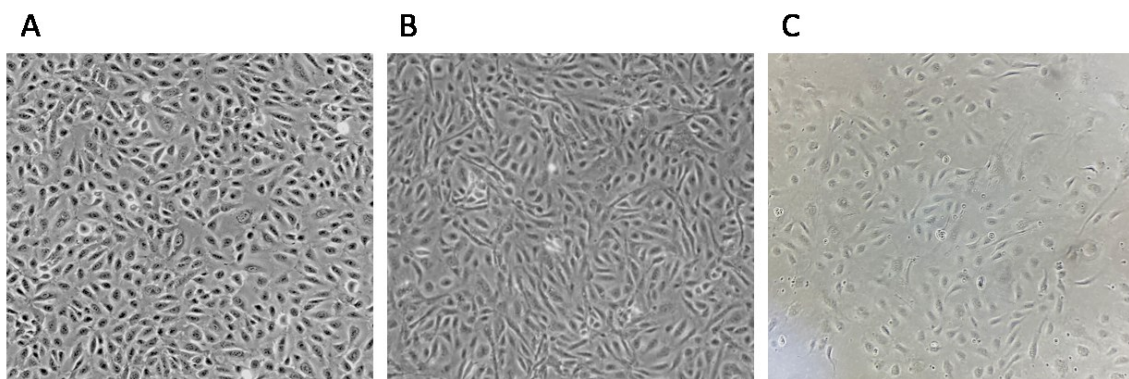
HUVEC jsou jedním z nejpoužívanějších modelů pro studium vaskulárního endotelu a biologických drah zapojených do jeho funkce. HUVEC jsou užívané jak v monokultivaci, tak i v kokultivaci s jinými typy buněk jako jsou leukocyty anebo buňky hladkého svalstva (44, 49). Používají se pro studium široké škály biologických procesů a onemocnění jako je zánět, apoptóza, preeklampsie, ateroskleróza nebo genetické mutace. Venózní a arteriální EC mají ale odlišný původ a vykazují různé vlastnosti. EC žil vykazují vyšší ochranu proti ED v porovnání s buňkami v arteriích, což znamená, že například HAEC jsou pro studium aterosklerózy oproti HUVEC vhodnější (44, 50).

HAEC jsou často využívány ve výzkumu aterosklerózy (50). Produkují vazoaktivní látky jako je NO nebo endotelin a také antitrombotické a trombotické faktory. Na TNF- α reagují produkcí cytokinů a modulací exprese buněčných adhezních molekul. Tyto vlastnosti umožňují studium mechanismů ED, aterosklerózy a zánětu (50, 51).

Dalším typem buněk jsou HCAEC. HCAEC jsou využívány pro studium angiogeneze, migrace buněk a především při studiích transportu glukózy (43, 52).

V našem výzkumu jsme používali konkrétně diabetické lidské endotelové buňky koronárních artérií (diseased human coronary artery endothelial cells, D-HCAEC). D-HCAEC jsou izolovány od lidských dárců, u kterých byl diagnostikován diabetes mellitus typu II (52). Diabetické kultury mohou být použity například pro experimentální aplikace při diabetickém kardiovaskulárním farmaceutickém vývoji nebo vaskulární patologii, včetně aterosklerózy (49, 53).

HMVEC jsou nejčastěji izolované z kůže, plic nebo srdce. Mají typickou dlažební strukturu a exprimují klasické markery EC. Používáme je ke studiu angiogeneze, zánětu, hojení ran a mezibuněčné komunikace (54).



Obrázek 5: Typy endotelových buněk používané ve výzkumu KVS

A) HUVEC (endotelové buňky lidské pupečnickové žíly) (55), B) HAEC (lidské aortální endotelové buňky) (50, 56), C) D-HCAEC (lidské nemocné endoteliální buňky koronárních artérií) (obrázek vytvořený autorkou).

2.3 Diabetes mellitus

2.3.1 Definice a typy

Diabetes mellitus (DM) je skupina metabolických onemocnění, která se vyznačuje zvýšenou hladinou glukózy v krvi v důsledku poruch účinku či sekrece inzulínu (9, 56).

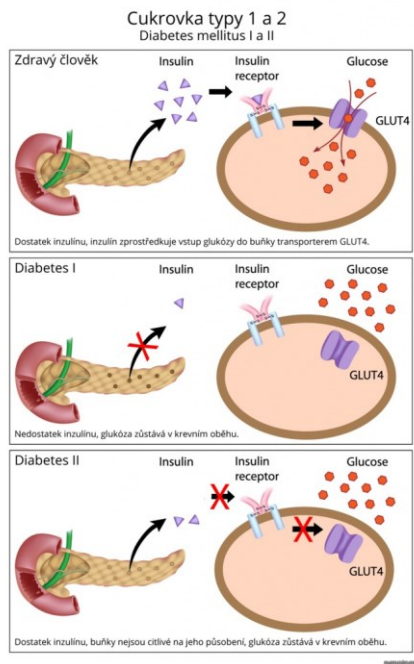
DM můžeme rozdělit na 4 základní typy: diabetes mellitus typu I (DM1), diabetes mellitus typu II (DM2), gestační diabetes a další specifické typy.

DM1 je imunitně podmíněný a vyskytuje se u 5-10% diabetiků (57). U této formy diabetu dochází k destrukci β -buněk pankreatu vlivem autoprotilátek proti inzulínu, dekarboxyláze kyseliny glutamové, tyrozinofosfatáze IA-2 a také autoprotilátek proti ostrůvkovým buňkám. Rychlost destrukce buněk závisí na mnoho faktorech a je velice proměnlivá. U kojenců a dětí se nejčastěji setkáváme s rychlou destrukcí a u dospělých pak s pomalejší (58). DM1 je spojen s genetickými predispozicemi jedince. U pacientů se často vyskytují i jiné autoimunitní onemocnění jako například Addisonova choroba, myasthenia gravis nebo Haschimotova tyreoiditida (59). S DM1 se setkáváme hlavně u dětí a dospívajících, ale může se objevit prakticky v jakékoli věkové kategorii (60).

DM2 se vyskytuje přibližně v 90-95% případů. Riziko vzniku se zvyšuje věkem, nedostatkem pohybu a obezitou (61). Tento typ diabetu se vyznačuje relativním nedostatkem inzulínu a inzulínovou rezistencí (obrázek 6). Sekrece inzulínu je u těchto pacientů defektní a nedostačuje ke kompenzaci inzulínové rezistence. DM2 častěji uvidíme u obézních pacientů, žen s předchozím gestačním diabetem a může být také spojen s genetickou predispozicí (62, 63).

Gestační diabetes (gestational diabetes mellitus, GDM) je jakýkoliv stupeň intolerance glukózy s rozpoznáním v těhotenství a spontánním vymizením v šestinedělí matky (62, 64, 65).

Mezi ostatní typy DM řadíme například genetické poruchy β -buněk, genetické defekty účinku inzulínu, endokrinopatii, infekce či diabetes vyvolaný léky nebo chemikáliemi (9).



Obrázek 6: Znárodnění mechanismu receptorů a transportérů při DM

U zdravého pacienta je hladina glukózy v krvi regulována inzulínem a dalšími hormony. Působením inzulínu na inzulínový receptor se otevře transportér GLUT4 a glukóza prochází do buňky. U pacientů s DM1 dochází k destrukci β -buněk pankreatu, a to vede k absolutnímu nedostatku inzulínu. V důsledku toho se transportér GLUT4 neotevře, glukóza neprostopuje do buňky a hromadí se v krvi. U pacientů s DM2 dochází k poruše citlivosti buněk na inzulín (inzulinová rezistence). Nedostatečná citlivost inzulínového receptoru způsobuje poruchu transportu glukózy do buňky, a tím nedostatek glukózy v buňce a přebytek v krvi (9, 58) obrázek (66).

DM může být diagnostikovaný 4 způsoby. Hlavním diagnostickým parametrem DM je hodnota glukózy na lačno, která by neměla být vyšší než 7,0 mmol/l. Jako další způsob diagnostiky je hodnocení glukózy v plasmě pomocí perorálního glukózového tolerančního testu, kde pacient přijme glukózu a po 2 hodinách by hodnota glykémie neměla přesáhnout 11,1 mmol/l (9). Další metodou je měření náhodné hladiny glukózy v plasmě, která taktéž nesmí přesáhnout hodnotu 11,1 mmol/l. Poslední parametrem je glykovaný hemoglobin. Tato hodnota, která by neměla být vyšší než 48 mmol/mol, je

používanou metodou spíše pro dlouhodobou kontrolu glykémie u již diagnostikovaných pacientů (63, 67).

Mezi nejčastější klinické příznaky hyperglykémie patří únava, žízeň, časté močení, hubnutí, nevolnost či poruchy vidění. Dlouhodobě neléčenou hyperglykémii může doprovázet také zhoršení růstu a náchylnost k infekcím (9).

Dlouhodobě neléčený DM má za následek komplikace, které můžeme rozdělit na mikrovaskulární a makrovaskulární. Mikrovaskulární komplikace zahrnují poškození nervového systému (neuropatie), poškození ledvin (nefropatie) a poškození oka (retinopatie). Mezi makrovaskulární komplikace řadíme kardiovaskulární onemocnění, periferní cévní onemocnění a cévní mozkovou příhodu. Akutními komplikacemi je pak ketoacidické kóma nebo neketotický hyperosmolární syndrom (9, 56).

2.3.2 Úloha endoglinu u diabetu mellitu

U DM se setkáváme s vaskulárními komplikacemi, které jsou spojené s různými patogenickými procesy (25). Několik studií poukázalo na zvýšení hladin sEng u pacientů s pokročilým DM potýkajících se s komplikacemi jako je nefropatie, neuropatie i retinopatie (25, 68).

Alvarez-Munoz a kol. sledovali expresi endoglinu v kožních fibroblastech u pacientů s DM1 s diabetickou nefropatií a bez ní. Ukázalo se, že exprese endoglinu byla zvýšená u pacientů s nižším rizikem nefropatie, což by mohlo naznačovat ochrannou úlohu endoglinu při rozvoji diabetické nefropatie (69). Další studie ukázala, že buňky HUVEC, které byly stimulované vysokou hladinou glukózy vedly ke zvýšené mRNA expresi endoglinu, což bylo následně potvrzené i na buňkách HAEC (68, 70).

2.4 Glipizid

Glipizid je perorální hypoglykemické léčivo patřící do druhé generace rodiny sulfonylmočovín (11). Glipizid je v České republice registrovaný pod názvem Minidiab v síle 5 mg. Studie udávají, že deriváty sulfonylmočoviny druhé generace jsou

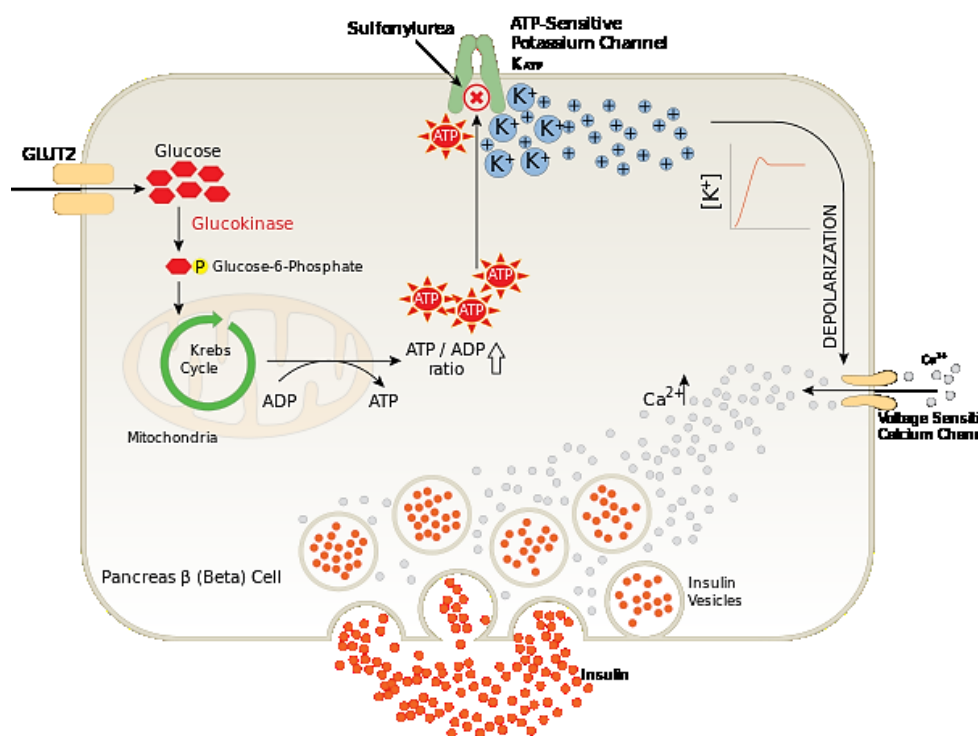
mnohonásobně účinnější než léčiva první generace a nástup účinku je u druhé generace také rychlejší. Po perorálním podání je glipizid téměř úplně absorbován. Ve velké míře se ale váže na plazmatický albumin, a to způsobuje relativně nízký distribuční objem. Po biotransformaci je glipizid vylučován močí (12).

2.4.1 Mechanismus účinku

Mechanismy účinku sulfonylmočovinných léčiv zahrnují stimulaci sekrece inzulínu z β -buněk pankreatu, zvýšení periferního využití glukózy a potlačení produkce glukózy v játrech. Během krátkodobé léčby dominuje stimulace sekrece inzulínu a během dlouhodobé léčby zase zvýšení inzulínové senzitivity periferními tkáněmi (10, 71).

Stimulace sekrece inzulínu je závislá na glukóze a probíhá inhibicí toku draslíku přes adenosintrifosfát (adenosine triphosphate, ATP) dependentní draslíkové kanály. V β -buňkách jsou draslíkové kanály typicky otevřené a to umožňuje eflux draselných iontů a polarizaci membrán β -buněk. Zvýšené hladiny ATP ve spojení s metabolismem glukózy mají za následek zvýšenou vazbu ATP na receptory, kde jsou navázány deriváty sulfonylmočoviny (10, 67). Tím dojde k uzavření draslíkových kanálů, depolarizaci membrány, otevření napěťově řízených vápenatých kanálů a integraci inzulínových vezikulů do buněčné membrány (obrázek 7) (12).

Některé studie potvrdily, že deriváty sulfonylmočoviny a zejména glipizid snižují jaterní vychytávání a rychlost metabolické clearance inzulínu v játrech (10, 67).



Obrázek 7: Mechanismus účinku sulfonylmočovinných antidiabetik

Po transportu glukózy do buňky dochází k vytvoření ATP přes Krebsův cyklus. Bez podání derivátů sulfonylmočoviny je ATP využito ATP-dependentními draslíkovými kanály a dochází k polarizaci. Na obrázku můžeme vidět, že po navázání derivátů sulfonylmočoviny na receptory, se draslíkové kanály uzavřou. Po uzavření draslíkových kanálů dojde k depolarizaci membrány a otevření napětově řízených vápenatých kanálů, které umožní vstup vápenatých iontů do buňky a tím dojde ke stimulaci uvolnění inzulinu do krve (25), obrázek (72).

2.4.2 Indikace, kontraindikace, nežádoucí účinky

2.4.2.1 Indikace

Glipizid je perorální antidiabetikum používané na terapii DM2. Po počátečním stádiu úpravy životního stylu se jako další terapie mohou využít právě léky této skupiny (12, 71). Antidiabetikum první volby v České republice je metformin, ale část pacientů netoleruje ani nízké dávky tohoto léku. V této situaci mohou být nízké dávky derivátů sulfonylmočoviny účinné (73). Ideálními kandidáty jsou pacienti s DM2, kteří mají relativní nedostatek inzulinu, ale stále vykazují určitou funkci β -buněk. Pacienti, kteří

mají diagnostikováni DM2 méně jak 5 let a dodržují své cvičební a dietní plány, mají velkou pravděpodobnost dobré odezvy na deriváty sulfonylmočoviny (74).

S progresí onemocnění mohou být nezbytné kombinace antidiabetických léčiv. Kombinace metforminu se sulfonylmočovinou je typickým režimem při selhání monoterapie. Tyto látky mají aditivní účinky na kontrolu glykémie a společně často udržují hladiny blízko cílového rozmezí po dobu několika let. U pacientů s intolerancí metforminu jsou alternativní kombinací například deriváty sulfonylmočoviny s pioglitazonem nebo inhibitory dipeptidyl peptidázy-4 (saxagliptin, vildagliptin) (11, 75).

2.4.2.2 Kontraindikace

Mezi kontraindikace glipizidu patří hypersenzitivita na léčivou či jakoukoli pomocnou látku obsaženou v léčivém přípravku. Glipizid není vhodný u pacientů s DM1 a pacientů s diabetickou ketoacidózou nebo diabetickým kómatem (76).

2.4.2.3 Nežádoucí účinky

Nejčastějšími nežádoucími účinky glipizidu jsou gastrointestinální potíže jako je nauzea, zvracení, bolest břicha nebo přírůstek hmotnosti. Vyskytují se i kožní reakce či hypoglykémie (76).

Vzhledem k tomu, že sulfonylmočoviny snižují hladinu glukózy v krvi, je třeba očekávat riziko hypoglykemických reakcí. Hypoglykémie je za normálních okolností potlačena tvorbou glukózy v játrech. U starších pacientů tento obranný mechanismus může být oslaben, a proto se může hypoglykémie stát výraznější a déletrvající (12, 76). Riziko hypoglykémie vyvolané deriváty sulfonylmočoviny se u chronického onemocnění ledvin zvyšuje. Dalšími faktory zvyšující riziko hypoglykémie jsou například dávka, vynechání sacharidů, podvýživa, velký příjem alkoholu, jaterní dysfunkce, srdeční selhání či interakce s jinými léky (12).

Vzácně byly hlášeny i nežádoucí účinky jako například agranulocytóza, trombocytopenie nebo žloutenka (76).

2.5 Metody detekce endoglinu

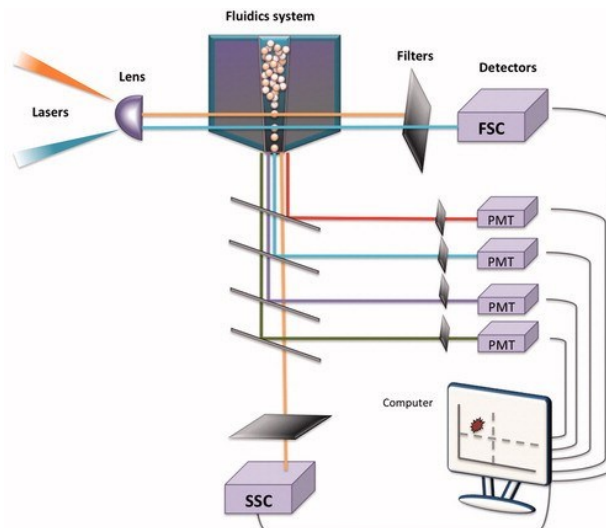
2.5.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda měřící fyzikální charakteristiky jedné buňky, která v suspenzi protéká přístrojem. Měří optické a fluorescenční vlastnosti buňky nebo jakékoli jiné částice. Pomocí průtokové cytometrie můžeme detekovat několik parametrů zároveň a poskytuje nám detailní analýzu v krátkém časovém rozmezí (77).

Průtokovou cytometrii můžeme rozdělit do dvou typů. První typ se nazývá netřídící a je schopný detekovat rozptyl světla a fluorescenční emisi. Druhý typ se nazývá třídící a ten může třídít částice na základě určitého znaku. Například fluorescenční aktivované třídíče umí třídít částice, které jsou fluorescenčně označené (77, 78).

Hlavní části průtokových cytometrů jsou fluidika, optika a elektronika (detektory, počítač) (obrázek 8).

Fluidika je zodpovědná za směrování částic do zaostřeného zdroje světla. Fluidní systém transportuje buňky z roztoku přes přístroj až do průtokové komory pomocí nosní tekutiny a tlakového vedení. Nosní tekutina je často fyziologický roztok, který se vstřikuje tlakovým potrubím do průtokové komory (77). Rozdílem tlaku ve vzorku a tlaku nosní tekutiny se buňky zarovnají. Rychlost vstřikování vzorků je nastavitelná a může si ji uživatel upravit podle účelu analýzy. Vysoké průtoky jsou vhodné například u kvalitativního měření, jako je imunofenotypizace, zatímco pomalé průtoky se hodí spíše pro analýzu vyžadující vyšší rozlišení jako je analýza obsahu DNA (79).



Obrázek 8: Zpracování a detekce signálu v průtokové cytometrii

Fluidní systém (fluidics systém) transportuje buňky z roztoku do průtokové komory. Čočky (lens) zaostřují a tvarují světlo z laseru, které po dopadu na buňku vytvoří rozptyl světla (FSC nebo SSC). Soubor zrcadel a filtrů oddělí a nasměruje vzniklé světelné signály do příslušných optických detektorů. Tyto detektory převedou světelné signály na elektrický proud, který je fotonásobičem (PMT) zesílen a převeden na napěťový impuls. Převodníky se pak tento impuls převede na digitální signál pro počítačové zpracování (77). Fotonásobiče (photomultiplier tube, PMT), detektry pro přímý rozptyl (forward scatter, FSC) a boční rozptyl (side scatter, SSC), lens – čočky, computer – počítač, filters – filtry, lasers – lasery, detectors – detektory.

Optická část průtokového cytometru je rozdělena na excitační a sběrnou optiku. Excitační optika zaměří zdroj světla na částice, zatímco sběrná optika přenáší rozptyl světla do detektorů. Optická část zahrnuje laser, který produkuje světlo a čočky na tvarování a zaostřování laserového paprsku. Když laser dopadne na buňky, vznikne rozptyl světla, který můžeme rozdělit na přímý rozptyl (FSC) a boční (SSC) (80). FSC je úměrný ploše nebo velikosti buněčného povrchu. FSC je vhodný například pro detekci buněčných populací při imunofenotypizaci. SSC rozptyl je znakem buněčné granularity a je zachytáván pod úhlem 90 stupňů k laserovému paprsku (77, 81).

V průtokových cytometrech se používá celá řada laserů, které se rozdělují podle vlnové délky. Rozlišujeme například modrý laser (488 nm), ultrafialový (300-400 nm) nebo červený laser (630 nm) (81, 82).

Sběrná optika je složena z čoček pro shromáždění emitovaného světla z laseru, optických zrcadel a filtrů. Následně nasměruje vlnové délky do příslušných optických detektorů (77, 80).

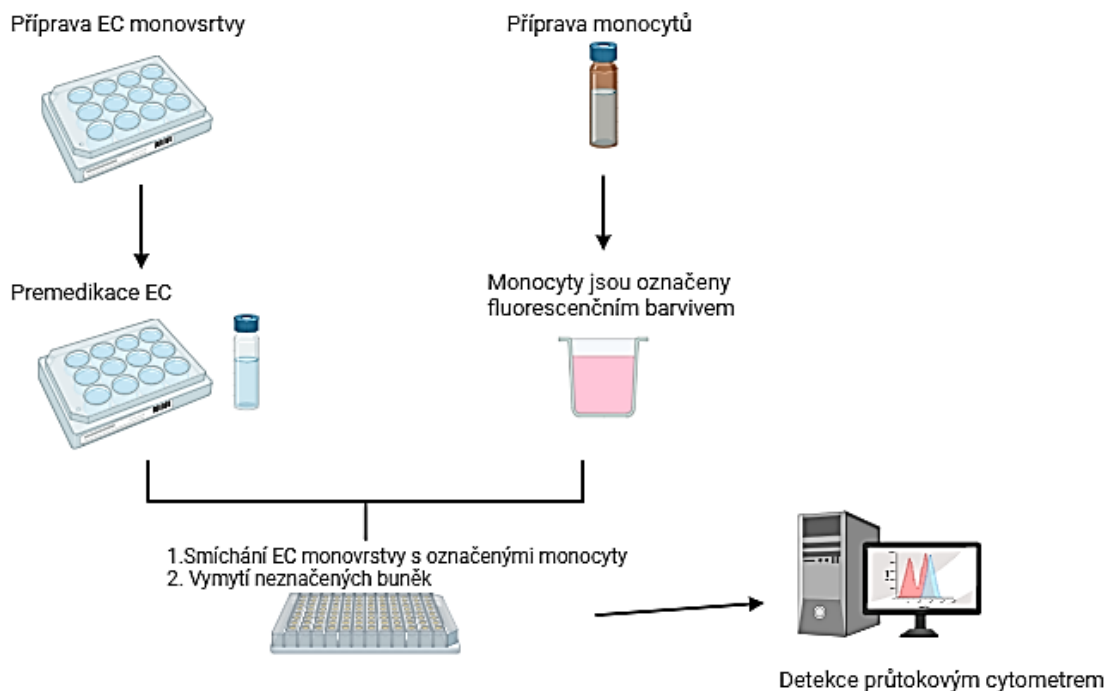
V průtokové cytometrii používáme dva typy detektorů, fotodiody (photodiode, PD) a fotonásobiče (photomultiplier tube, PMT). Světelné signály zachycené těmito detektory jsou převedeny na proporcionální počet elektronů k vytvoření elektrického proudu. Elektrický proud poté putuje do zesilovače a převede se na napěťový impuls. Získaný signál se převede na digitální pomocí převodníků pro počítačové zpracování. Tyto signály poté lze následně zobrazit jako dot ploty a histogramy (77, 81).

2.5.2 Adheze monocytů k endotelovým buňkám

Aktivace a dysfunkce EC je typický patologický proces v rozvoji aterosklerózy. Cirkulující protizánětlivé cytokiny se vážou na receptory EC, což vede k aktivaci EC, zvýšení adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1), adhezi monocytů na endotel a následné migraci do subendoteliálního prostoru. Tam se monocyty diferencují na makrofágy a vychytávají oxidované lipoproteinové částice za vzniku pěnových buněk, což vede k pokročilejším aterosklerotickým lézím (83).

Test adheze monocytů je jeden ze způsobů, jak lze zjistit aktivaci endotelu. Je založen na fluorescenci a umožňuje detekovat a kvantifikovat přilnutí monocytů k monovrstvám aktivovaných endoteliálních buněk (84). Experiment můžeme provést buď přímým počítáním adherovaných monocytů nebo nepřímým měřením fluorescenčně značených adhezních monocytů. Metoda založená na fluorescenci je citlivější, flexibilnější a provádí se pomocí průtokové cytometrie. Po kultivaci a premedikaci EC se buňky inkubují s fluorescenčně značenými monocyty. Nepřilnuté monocyty se odstraní a směs adherovaných monocytů a EC se zpracovává a měří

pomocí průtokového cytometru, kde se na základě fluorescence stanoví stupeň adheze k endotelu (obrázek 9) (85).



Obrázek 9: Postup testu adheze monocytů

Postup zkoušky adheze monocytů k EC na bázi fluorescence. Proces zahrnuje přípravu, ošetření a premedikaci EC. Poté se připraví monocyty, které se označí fluorescenčním barvivem a spojí se s vrstvou připravených EC. Nakonec se vymyjí neoznačené buňky a pomocí průtokového cytometru dochází k detekci a kvantifikaci intenzity fluorescence (83) (obrázek vytvořený autorkou).

2.5.3 PCR

Polymerázová řetězcová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je metoda, kterou lze amplifikovat a kvantifikovat specifický fragment deoxyribonukleové kyseliny (deoxyribonucleic acid, DNA) (86). Je to základní metoda molekulární biologie, která je velice citlivá a stačí pro ni stopové množství DNA, abychom vytvořili dostatečný počet kopií pro analýzu. PCR lze provést za použití DNA z různých tkání a organismů jako je periferní krev, kůže, vlasy, sliny nebo mikroby (87).

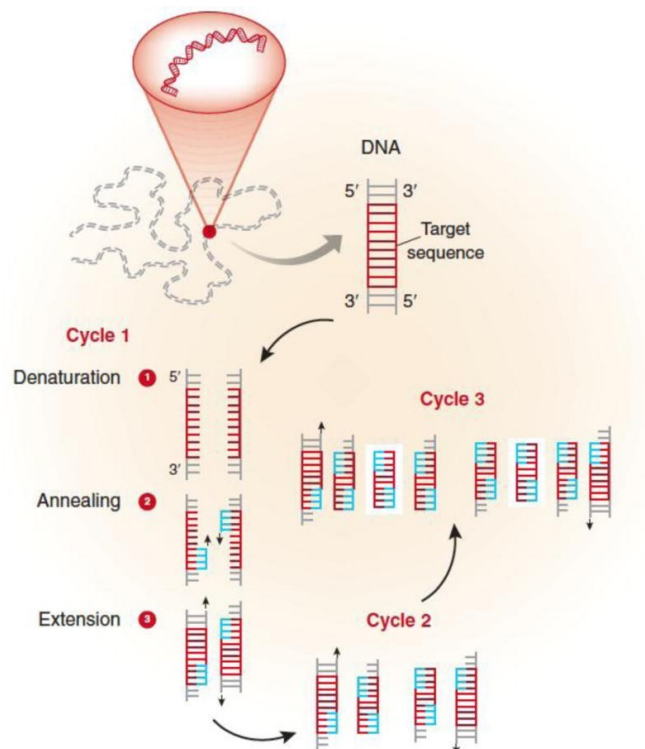
Tato metoda je založená na třech krocích vyžadovaných pro jakoukoli syntézu DNA (obrázek 10). Prvním krokem je denaturace templátové DNA na jednotlivá vlákna při teplotě nad 90°C (88). Vysokou teplotou se rozpadají vodíkové můstky mezi vlákna DNA, což vede ke vzniku jednovláknové DNA (89). Poté dochází k nasedání primerů na jednovláknovou DNA při 50-60°C. Primery, jsou krátké fragmenty DNA s definovanou sekvencí komplementární k cílové DNA, která má být detekována a amplifikována. Slouží tak jako začáteční body pro DNA polymerázu (90). Tento proces se také nazývá hybridizace (86, 87). Posledním krokem je prodloužení nových řetězců DNA z primerů při teplotě 72-78°C (88). DNA polymeráza prodlouží primery zabudováním nukleotidů do vyvíjejícího se vlákna DNA (86, 87). DNA polymeráza je klíčový enzym, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady a tak vytváří výsledný produkt PCR (86, 88). Kvůli vysokým teplotám při denuraci se dnes často používá termostabilní DNA polymeráza tzv. Taq polymeráza (88). Tyto složky se postupně smíchají v 96-jamkové destičce nebo zkumavce a umístí se do zařízení, které umožňuje amplifikaci DNA ve výše zmíněných krocích. S každým opakováním těchto kroků se počet zkopírovaných molekul DNA zdvojnásobí (87).

Polymerázové řetězcové reakci také může předcházet reverzní transkripce. Pokud potřebujeme amplifikovat mRNA, nejdříve ji izolujeme a následně převedeme mRNA na komplementární deoxyribonukleovou kyselinu (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) pomocí reverzní transkriptázy (91).

Zdokonalením původní techniky PCR vznikla tzv. polymerázová řetězcová reakce v reálném čase (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR). Kvantitativní schopnost real-time PCR spočívá ve fluorescenčním barvivu, které produkuje fluorescenci v poměru k množství amplifikovaného produktu. Fluorescenční molekula je buď ve formě značených sond jako je TaqMan nebo barviva vázající DNA (91, 92). Sondy produkují fluorescenční signál, který odráží množství produktu vytvořeného v každém cyklu PCR. Na začátku těchto cyklů je signál slabý, ale zvyšujícím se počtem cyklů signál exponenciálně roste (93). Měření PCR v koncovém bodě nám ukazuje jen negativní či pozitivní vzorek. Křivky odezvy, jak se hromadí produkt, jsou ale oddělené a můžeme tak naměřit množství templátových molekul. Porovnáváme rozdíl amplifikačních cyklů potřebných k tomu, aby vzorek dosáhl prahové hodnoty

fluorescenčního signálu tzv. treshold. Počet cyklů potřebný k dosažení této prahové hodnoty nazýváme CT hodnota (91). Na kvantifikaci výsledků se používá konstitutivní gen tzv. housekeeping gen, který se přepisuje ve všech typech a vývojových stádiích buněk (94, 95).

Typicky se real-time PCR využívá pro detekci patogenů, analýzu genové exprese, analýzu jednonukleotidového polymorfismu (SNP), analýzu chromozomových aberací a detekci proteinů pomocí real-time immuno PCR (92).



Obrázek 10: Schématické znázornění PCR

Na obrázku můžeme vidět krok denaturace na jednotlivá vlákna (bod 1), poté hybridizaci, kde dochází k nasedání primerů (bod 2) a prodloužení, kde pomocí DNA polymerázy dojde k prodloužení nových řetězců DNA (bod 3). Tyto kroky se několikrát opakují (86, 87).

2.5.4 ELISA

Enzymově značený imunosorbentní test (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) je široce používaný diagnostický nástroj nejen k zabezpečení kvality

v průmyslových odvětvích, ale i pro detekci a kvantifikaci specifických antigenů či protilátek ve vzorku. Umožňuje detekci všech typů biologických molekul ve velmi nízkých koncentracích (96, 97).

V této metodě se využívá vazby antigenu na jeho specifickou protilátku, která nám umožní detekci velmi malého množství antigenů, jako jsou proteiny, hormony, peptidy nebo protilátky. K označení antigenů a protilátek se nejčastěji využívají enzymy jako je alkalická fosfatáza a peroxidáza (96). Enzym následně reaguje s chromogenem a dochází ke změně barvy v jamce, dle které můžeme kvantitativně nebo kvalitativně detekovat antigen (98).

Tuto metodu můžeme rozdělit na čtyři typy. Přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní ELISA (obrázek 11) (96, 99).

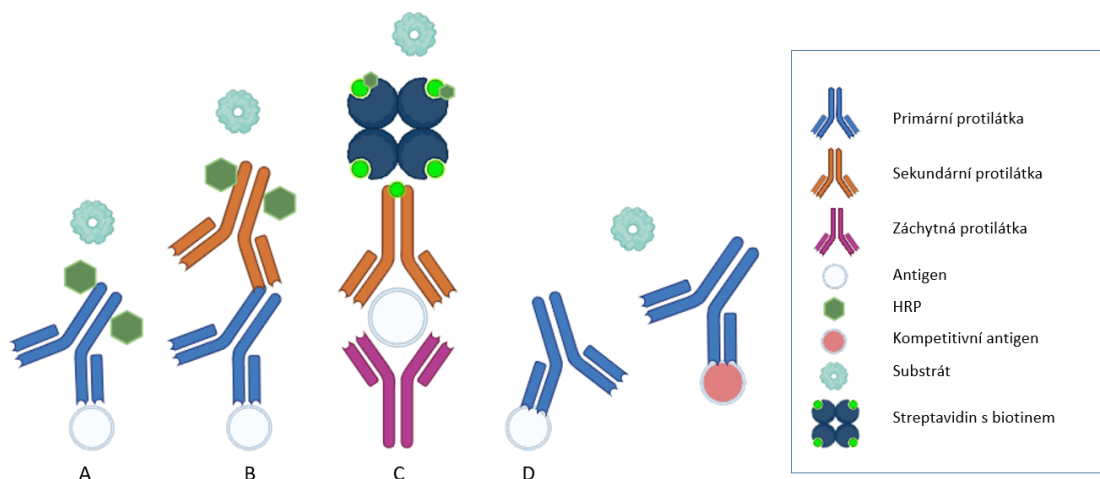
V přímé ELISA je antigen imobilizován na povrchu jamky a primární protilátky jsou přímo konjugované s enzymem. Mezi výhody této metody patří eliminace křížové reaktivity sekundárních protilátek. Díky menšímu počtu kroků je přímá ELISA také rychlejší. V závislosti na povaze vzorku může mít tato metoda ale omezenou citlivost a vysokou cenu (99).

Nepřímá ELISA využívá na rozdíl od přímé ELISA dvě protilátky. Primární protilátka je specifická pro antigen a sekundární protilátka je spojena s enzymem a způsobuje, že chromogenní nebo fluorogenní substrát vytvoří signál. Sekundární protilátka může být taky spojena s proteinem jako je například avidin nebo streptavidin, pokud je na protilátce navázán biotin (96, 99). Nepřímá ELISA je citlivější a méně nákladná v porovnání s přímou ELISA metodou a je vhodná například pro stanovení celkové koncentrace protilátek ve vzorku. Nevýhodou může být riziko zkřížené reaktivity mezi sekundárními protilátkami (100).

V sendvičovém testu ELISA je antigen vázán mezi záchytnou a detekční protilátku. Záchytná protilátka je navázaná na povrch jamky a vycytává antigen ze vzorku. Detekční protilátka značená enzymem, slouží k detekci přítomného antigenu. Sendvičová ELISA má mnohem větší citlivost než ostatní typy ELISA. Nevýhodou této metody je její časová náročnost a vyšší cena (96, 99).

Kompetitivní ELISA spočívá v kompetitivní reakci mezi antigenem ve vzorku a antigenem navázaným na jamky mikrotitrační destičky s primární protilátkou. Prvním krokem je inkubace primární protilátky s antigenem vzorku. Inkubací vznikne komplex antigen-protilátka, který se spolu s navázanou protilátkou přidá do jamek potažených stejným antigenem. Dalším krokem je vazba volné protilátky na antigen na desce, následované promýváním, při kterém dojde k odstranění volného imunokomplexu. Poté se do jamky přidá sekundární protilátka konjugovaná s enzymem a následně dojde k vyvolání chromogenního nebo fluorescenčního signálu substrátem. Absence barvy indikuje přítomnost antigenu ve vzorku. Mezi hlavní výhody kompetitivní ELISA je vysoká citlivost na rozdíly složení směsí antigenů (96).

ELISA se často využívá při klinickém diagnostickém testování. Tyto testy jsou dnes velmi dobře komerčně dostupné jako soupravy, které obsahují vše potřebné k provedení testu, což umožňuje laboratorním standardizovaný postup. Testy ELISA mohou detekovat i imunoglobuliny produkované při imunitní či alergické reakci, což umožňuje diagnostiku infekcí a alergických onemocnění. Lze ji také použít k identifikaci virových částic a bakterií, což nám napomáhá při detekci infekčních onemocnění (100).



Obrázek 11: Druhy metod ELISA

A) *Přímá ELISA – antigen je absorbován na povrchu mikrotitrační destičky a primární protilátka jsou přímo konjugované s enzymem. B) Nepřímá ELISA – antigen se naváže na povrch jamky, přidá se primární protilátka a enzymaticky označené sekundární protilátka. Poté dochází k navázání substrátu. C) Sendvičová ELISA – nejprve se naváže na povrch záchytná protilátka. Poté se zablokují všechna nespecifická vazebná místa na povrchu a nanese se vzorek obsahující antigen, který se naváže na záchytnou protilátku. Přidá se specifická detekční protilátka, která se „sendvičově“ naváže na antigen. Na detekční protilátku je navázán biotin, který se silně váže na streptavidin. Na streptavidin se naváže konjugovaná HRP, která poskytuje enzymatickou aktivitu pro detekci pomocí vhodného substrátu. D) Kompetitivní ELISA – dochází ke kompetitivní reakci mezi antigenem ve vzorku a antigenem navázaným na jamky mikrotitrační destičky s primární protilátkou (99) (obrázek vytvořený autorkou). HRP – křenová peroxidáza (horseradish peroxidase).*

3. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak glipizid v různých koncentracích a v různém čase ovlivňuje expresi a funkci endoglinu, jeho transkripčních faktorů, souvisejících biomarkerů endotelové dysfunkce, solubilní endoglin a adhezi monocytů u lidských diabetických endotelových buňkách koronárních artérií.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Typy buněk

V této práci jsme používali lidské diabetické koronární endotelové buňky (D-HCAEC, katalogové číslo CC-2922, Lonza, Švýcarsko). Pro jejich správný růst a výživu jsme používali pro ně vhodné médium, které jim poskytuje optimální prostředí a živiny. S buňkami jsme pracovali v laminárním boxu, který jsme před a po použití vždy důkladně vyčistili etanolem a vysvětili UV zářením, abychom předcházeli kontaminaci. Když jsme buňky nepoužívali, ukládali jsme je do inkubátoru při 37°C, 5% CO₂ tak, aby byly zachovány ideální podmínky pro jejich růst.

V metodě adheze monocytů k endotelovým buňkám jsme používali THP-1 monocyty od S. Čejkové (IKEM, Praha, Česká republika). THP-1 je lidská monocytární buněčná linie, která je schopna se diferencovat do makrofágů po stimulaci fyziologickými či farmakologickými stimuly, a proto se využívá jako model pro studium funkcí a mechanismů monocytů/makrofágů, signálních drah a transportu živin a léčiv (101). Tato buněčná linie byla izolována z lidských monocytů pacienta s akutní monocytární leukémií a je široce využívána ve výzkumu imunity, zánětu, aterosklerózy, infekčních onemocnění a dalších biologických procesů (102).

4.2 Příprava vzorků

Každému experimentu předcházela příprava vzorků. V den 0 jsme buňky rozmrazili. Následně jsme třetí den buňky pasážovali a den šestý premedikovali. Experiment probíhal den sedmý s výjimkou experimentů po 8 hodinách.

4.2.1 Rozmrazování buněk

Jako první jsme si připravili želatinu, která je potřebná pro potáhnutí dna nádoby. Mezitím jsme si dali nahřívát médium do vodní lázně na 37°C, aby mělo stejnou teplotu, jako je uvnitř inkubátoru.

Příprava želatiny:

1. Do kádinky jsme dali 95ml fosfátového tlumivého roztoku (PBS) a 5ml 2% želatiny tak, aby výsledná koncentrace byla 0,1%.
2. Natáhli jsme tuto směs do 20ml stříkačky
3. Nasadili jsme na ní 0,22 μ m filtr.
4. Následně jsme želatinu přefiltrovali do skleněné láhve a popsali láhev datumem a názvem želatina.

Složení D-HCAEC média:

- 200ml základního média pro endotelové buňky
- 22ml fetálního hovězího séra (FBS)
- 800 μ l fibroblastového růstového faktoru
- 80 μ l hydrokortizonu
- 200 μ l vaskulárního endotelového růstového faktoru
- 200 μ l rekombinantního růstového faktoru podobného inzulinu
- 200 μ l kyseliny askorbové
- 200 μ l lidského epidermálního růstového faktoru
- 200 μ l gentamicin sulfát – amfotericin

Postup rozmrazování buněk:

1. Dvě Petriho misky jsme potáhli 1,5ml již připravené 0,1% želatiny a mírným pohybem a poklepáním o hranu misky jsme želatinu rozprostřeli po celé misce. Poté jsme Petriho misku vložili do inkubátoru na 20 minut.
2. Po 20 minutách jsme Petriho misky vyndali z inkubátoru a odsáli želatinu pomocí odsávačky v laminárním boxu.
3. Následně jsme napipetovali 8ml média a dali kultivační nádobu zpět do inkubátoru.
4. Zatím co jsme měli misky v inkubátoru, došli jsme do mrazáku s -80 °C pro buňky.
5. Buňky v kryovialce jsme rozmrazili ve vodní lázni krouživým pohybem, tak aby v kryozkumavce zůstala malá kulička ledu.

6. Petriho misky jsme vyndali z inkubátoru a pomocí pipety jsme do nich přenesli obsah kryozkumavek.
7. Petriho misky jsme popsali názvem buněk, pasáží P-5, datumem a jménem. Poté jsme kultivační nádoby dali zpět do inkubátoru.

4.2.2 Pasážování buněk

Pasážování buněk slouží k udržování a množení buněčných kultur při správných laboratorních podmínkách. Spočívá v přenesení buněk z jedné kultivační nádoby do jiné, kde mají více prostoru a živin pro růst a dělení. Cíl této techniky je buňky co nejvíce namnožit a zabránit jejich přeplnění a stárnutí.

Postup pasážování buněk:

1. Nejprve je potřeba pod mikroskopem zkontrolovat, jestli mají buňky alespoň 80% konfluenci.
2. Poté jsme si dali nahřát médium, PBS, PBS s 2% FBS a akutázu do vodní lázně na 20 minut při 37°C.
3. Dvě kultivační nádoby jsme si potáhli želatinou, tak že jsme do každé jamky napipetovali 250 μ l (12-jamková nádoba) nebo 750 μ l (6-jamková nádoba) želatiny.
4. Nádoby jsme dali na 20 minut do inkubátoru.
5. Po 20 minutách jsme z kultivačních nádob odsáli želatinu a napipetovali 400 μ l (12-jamková nádoba) nebo 900 μ l (6-jamková nádoba) nového média. Poté jsme je dali zpět do inkubátoru.
6. Z inkubátoru jsme si zároveň vzali naše buňky v Petriho miskách a odsáli staré médium.
7. Následně jsme do každé misky přidali 3ml PBS, které nám slouží na odstranění mrtvých buněk a zbytku média a po promísení, jsme PBS odsáli. Tento krok jsme zopakovali ještě jednou.
8. Dalším krokem je přidání akutázy. Akutáza slouží na oddělení buněk ze dna. Do každé Petriho misky jsme přidali 1,5ml akutázy a dali na 5 minut do inkubátoru.
9. Po 5 minutách jsme pod mikroskopem zkontrolovali, zda se buňky oddělili a přidali jsme 3ml PBS s 2% FBS, které slouží na deaktivaci akutázy. Následně jsme misku propláchli pipetou a buňky přenesli do 15ml falkonek. Krok s přidáním PBS s 2% FBS jsme zopakovali ještě jednou.

10. Falkonky jsme vložili do centrifugy na 3 minuty při relativní centrifugační síle (relative centrifugal force, rcf) 300. Poté jsme z falkonek odsáli supernatant (tekutinu nad peletkou) a peletku (usazeninu) jsme resuspendovali v novém médiu.
11. Z inkubátoru jsme vytáhli připravené kultivační nádoby a pipetou jsme do každé jamky přidali 100 μ l resuspendovaných buněk z falkonky.
12. Označili jsme si kultivační nádoby jménem, datumem, aktuální pasáží P-6 a názvem buněk. Nádoby jsme vrátili zpět do inkubátoru. Buňky byly připravené na premedikaci.

4.2.3 Premedikace buněk

Před samotnou premedikací jsme si zkontrolovali buňky pod mikroskopem (obrázek 12).

1. Experimentální design premedikace FC– 24 a 48 hodin D-HCAEC

První experiment nám sloužil na výběr vhodného času a koncentrace glipizidu. V tomto experimentu jsme měli vzorky s koncentrací 100 μ M a 200 μ M (tabulka 1).

Tabulka 1: Experimentální design premedikace FC – 24 a 48 hodin

číslo vzorku	název vzorku	premedikace	protilátka	počet vzorků
1	Neznačené buňky	vehikulum	žádná	1
2	PI	čisté médium	PI	1
3	Eng	vehikulum	Eng	1
4	VCAM-1	Vehikulum, TNF α	VCAM	1
5	ICAM-1	Vehikulum, TNF α	ICAM	1
6–8	Ctrl-E	vehikulum	Eng	3
9–11	GLI200-E	Glipizid 100 μ M	Eng	3
12–14	Ctrl	vehikulum	PI,Eng,VCAM,ICAM	3
15–17	GLI100	Glipizid 100 μ M	PI,Eng,VCAM,ICAM	3
18–21	GLI200	Glipizid 200 μ M	PI,Eng,VCAM,ICAM	4

Eng – endoglin, ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula-1, VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezní molekula1, PI – propidium jodid, Ctrl-E – Kontrola s endoglinem, GLI100 – glipizid o koncentraci 100 μ M, GLI200 – glipizid o koncentraci 200 μ M, GLI200-E – glipizid o koncentraci 200 μ M s endoglinem, TNF α – tumor nekrotizující faktor alfa

Premedikace 3 vzorků kontrol a 200 μ M glipizidu pouze endoglinem jsme provedli za cílem zjistit, který ze vzorků bude vhodnější pro kompenzace endoglinu. Studovali jsme, zda se jeho exprese zvýší nebo sníží bez vlivu ostatních protilátek. V pozdějších premedikacích byly tyto vzorky rovnoměrně rozděleny mezi ostatní skupiny.

Do vzorků, které jsme používali na kompenzaci ICAM-1 a VCAM-1, jsme při premedikaci přidávali TNF- α .

Výpočet množství TNF- α :

Měli jsme k dispozici zásobní roztok TNF- α o koncentraci 1000ng/ml a potřebovali jsme 500 μ l média.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 10\text{ng/ml} \times 500\mu\text{l} / 1\,000\text{ng/ml}$$

$$V_2 = 5\mu\text{l TNF-}\alpha$$

Dále jsme si museli vypočítat potřebný objem roztoku glipizidu s dimetylsulfoxidem (dimethyl sulfoxide, DMSO). Glipizid (G117-500MG, Merck, Německo) jsme měli k dispozici v koncentraci 100 μ M.

Výpočet množství glipizidu:

A) 100 μ M

Do každé jamky jsme dávali 500 μ l média + jeden vzorek navíc.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 100\mu\text{M} \times 2000\mu\text{l} / 100\,000\mu\text{M}$$

$$V_2 = 2\mu\text{l GLI}$$

B) 200 μ M

Do každé jamky jsme dávali 500 μ l média + jeden vzorek navíc.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 200\mu\text{M} \times 4000\mu\text{l} / 100\,000\mu\text{M}$$

$$V_2 = 8\mu\text{l GLI}$$

2. Experimentální design premedikace PCR – 8 a 16 hodin D-HCAEC

Koncentrace a čas experimentu byly vybrány na základě předchozích výsledků FC. Inkubaci jsme prováděli po 8 a 16 hodinách. Vzorky s glipizidem jsme měli o koncentraci 200 μ M (tabulka 2).

Tabulka 2: Experimentální design premedikace PCR – 8 a 16 hodin

číslo vzorku	název vzorku	premedikace	počet vzorků
1–6	Ctrl	vehikulum	6
7–12	GLI200	Glipizid 200 μ M	6

GLI200 – glipizid o koncentraci 200 μ M, GLI – glipizid, Ctrl – kontrola

Výpočet glipizidu pro 6 vzorků na jedné desce:

Do každé jamky jsme dávali 1000 μ l média + jeden vzorek navíc.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 200\mu\text{M} \times 7000\mu\text{l} / 100\,000\mu\text{M}$$

$$V_2 = 14\mu\text{l GLI}$$

3. Experimentální design premedikace adheze monocytů k EC – 24 hodin D-HCAEC

Podle předchozích inkubací v FC jsme se rozhodli pracovat s buňkami inkubovanými 24 hodin před experimentem. Experimentální dizajn obsahoval 20 vzorků. Měli jsme 1 kontrolu s EC a jednu kontrolu monocytů (THP-1), které byly značené pomocí Vibrant DiO (tabulka 3).

Tabulka 3: Experimentální design premedikace adheze monocytů k EC – 24 hodin

číslo vzorku	název vzorku	premedikace	Typy buněk	počet vzorků
1	Neznačené	vehikulum	EC	1
2	značené THP-1	vehikulum	THP-1	1
3–8	Ctrl	vehikulum	EC, THP-1	6
9–14	GLI100	Glipizid 100μM	EC, THP-1	6
15–20	GLI200	Glipizid 200μM	EC, THP-1	6

GLI100 – glipizid o koncentraci 100μM, GLI200 – glipizid o koncentraci 200μM, Ctrl – kontrola, THP-1 – monocyty, EC – endotelové buňky

Výpočet množství glipizidu:

C) 100μM

Do jamky každé jsme dávali 500 μl média + jeden vzorek navíc.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 100\mu\text{M} \times 3500\mu\text{l} / 100\,000\mu\text{M}$$

$$V_2 = 3,5\mu\text{l GLI}$$

D) 200μM

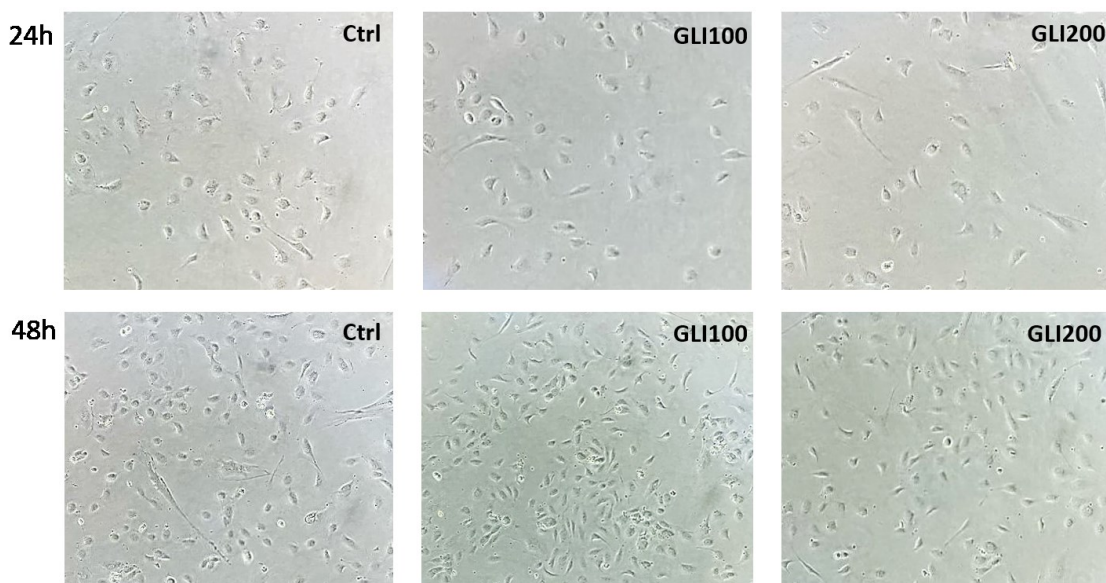
Do jamky každé jsme dávali 500 μl média + jeden vzorek navíc.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 200\mu\text{M} \times 3500 \mu\text{l} / 100\,000\mu\text{M}$$

$$V_2 = 7 \mu\text{l GLI}$$



Obrázek 12: Porovnání nárůstu buněk po 24 a 48 hodinách

Na obrázku můžeme vidět, že po 24 hodinách inkubace jsou buňky v porovnání se 48 hodinovou inkubací méně narostlé.

4.3 Experimenty

4.3.1 Průtoková cytometrie

Postup průtokové cytometrie:

1. Nejprve jsme si dali nahřát roztok PBS, PBS s 2% FBS a akutázu. Vše jsme nechali ve vodní lázni po dobu 20 minut a mezi tím si zkontrolovali buňky pod mikroskopem.
2. Z 12-jamkových nádob jsme odsáli staré médium pomocí odsávačky.
3. Napipetovali jsme 300 μ l PBS a po lehkém promísení odsáli. Tento krok jsme zopakovali ještě jednou.
4. Přidali jsme 150 μ l akutázy do každé jamky na uvolnění buněk od dna a dali jsme kultivační nádoby na 5 minut do inkubátoru při 37°C.
5. Po 5 minutách v inkubátoru jsme zkontrolovali pod mikroskopem, zda jsou buňky odděleny od dna.
6. Přidali jsme do každé jamky 100 μ l PBS s 2% FBS a celý objem (250 μ l) přenesli do jedné jamky v 96-jamkové nádobě se dnem ve tvaru „V“. U jamky, která náleží propidium jodidu (PI) jsme půlku obsahu odebrali do eppendorfky a dali

nejprve na 2 minuty zahřát na 65°C a následně na 2 minuty do mrazáku na -20°C. Tento krok slouží k usmrcení buněk a vzorek následně slouží jako pozitivní kontrola pro PI. Obsah eppendorfky jsme poté dali do jamky, která náleží PI.

7. Destičku jsme vložili do centrifugy a nechali vzorky stočit při 300 rcf na 3 minuty.
8. Vyndali jsme vzorky z centrifugy a odsáli jsme supernatant. Poté jsme destičku poklepali o tvrdý povrch, abychom resuspendovali peletku a napipetovali pomocí multikanálové pipety 200μl PBS s 2% FBS a dali zpět do centrifugy při 300 rcf na 3 minuty. Tento krok jsme zopakovali ještě jednou.
9. Mezi tím jsme si připravili do eppendorfek jednobarevné kontroly endoglin, PI, VCAM-1 a ICAM-1 (tabulka 4). Dále jsme připravili mastermix (tabulka 5), kde byly všechny protilátky v PBS s 2% FBS. Do každé eppendorfky jsme napipetovali vypočítaný objem PBS s 2% FBS a do něho jsme napipetovali odpovídající protilátku.

Tabulka 4: Příprava jednobarevných kontrol D-HCAEC

	Příprava protilátek	
	Protilátka na 1 jamku v μl	PBS na 1 jamku v μl
Endoglin	1	99
VCAM-1	1	99
ICAM-1	1	99
Propidium jodid	0,5	99,5

Do jedné jamky v 96-jamkové destičce jsme pipetovali celkem 100 μl. Na základě toho jsme vypočítali kolik μl potřebujeme protilátky a kolik PBS. VCAM-1 – Vaskulární buněčná adhezní molekula 1, ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula 1, PBS – fosfátový tlumivý roztok.

Tabulka 5: Příprava mastermixu D-HCAEC

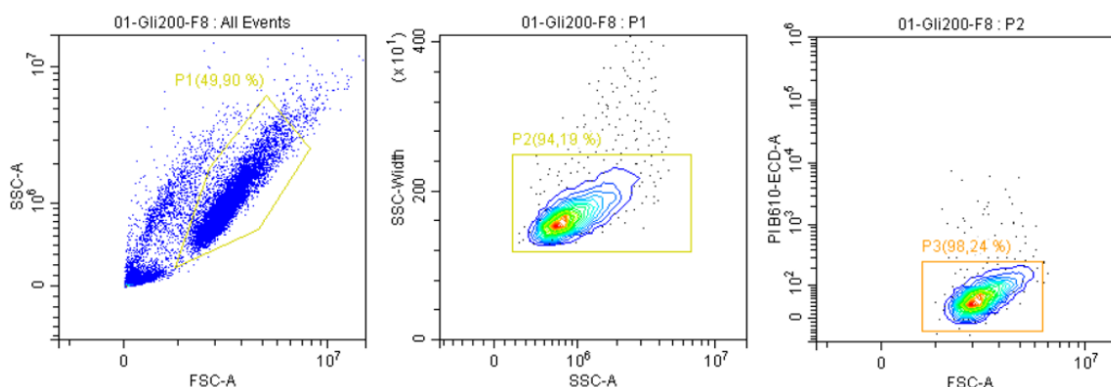
	Příprava mastermixu	
	Protilátka a PBS na 1 jamku v μ l	Protilátka a PBS na 12 jamek v μ l
Endoglin	1	12
VCAM-1	1	12
ICAM-1	1	12
Propidium jodid	0,5	6
PBS s 2% FBS	96,5	1158

VCAM-1 – Vaskulární buněčná adhezní molekula 1, ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula 1, PBS s 2% FBS – fosfátový tlumivý roztok s 2% fetálním hovězím sérem.

10. V dalším kroku jsme opět odsáli supernatant, pokleпали nádobu o tvrdý povrch a do každé jamky napipetovali 100 μ l odpovídající protilátky z připravených eppendorfek.
11. Nádobu jsme inkubovali 30 minut při 4°C ve tmě (lednice).
12. Po 30 minutách jsme destičku centrifugovali při 300 rcf 3 minuty, odsáli supernatant a pokleпали destičku o tvrdý povrch.
13. Napipetovali jsme do každé jamky 200 μ l PBS s 2% FBS a dali centrifugovat při 300 rcf 3 minuty. Odsáli jsme supernatant a resuspendovali peletku poklepáním o tvrdý povrch. Tento krok jsme zopakovali ještě jednou.
14. Naposledy jsme odsáli supernatant, pokleпали o tvrdý povrch a napipetovali 150 μ l PBS do každé jamky.
15. Na závěr jsme vzorky změřili v cytometru. Nejprve jsme si museli udělat kompenzaci tak, že jsme změřili naše neznačené buňky. Podle toho jsme si vytvořili oblast našeho zájmu tzv. „gate“. V této vyznačené oblasti populace buněk jsme sledovali různé parametry, které nás zajímaly. To nám umožnilo vybrat si specifické buňky na další analýzu.

Dále bylo potřeba změřit jednobarevné kontroly. Měřili jsme každou jamku jednotlivých protilátek. Pomocí těchto vzorků jsme mohli vytvořit kompenzační matici, na základě které jsme byli schopni eliminovat průsvit jednotlivých protilátek do jiných kanálů.

Na ostatní vzorky jsme aplikovali vytvořenou kompenzační matici a začali měřit. Na začátku jsme si vytvořili tzv. „gating strategy“ pomocí třech grafů (obrázek 13).



Obrázek 13: Výběr populace

Tyto grafy slouží k výběru sledované populace. V prvním grafu je na ose x znázorněna hodnota FSC-A, což indikuje relativní velikost buňky. Na ose y je pak znázorněna hodnota SSC-A, což indikuje vnitřní složitost nebo granularitu buňky. V tomto grafu jsme vytvořili gate okolo populace buněk, která nás zajímala. V druhém grafu je na ose x znázorněna hodnota SSC-A a na ose y je hodnota SSC-W, která indikuje šířku buňky. Tento graf slouží k oddělení dvojic buněk (doubletů). Ve třetím grafu je na ose x FSC-A a na ose y je fluorescenční hodnota PI, která označuje mrtvé buňky. Tento graf slouží k oddělení mrtvých buněk od živých. DMSO – dimethylsulfoxid, FCS – přímý rozptyl, SSC – boční rozptyl, PI – propidium jodid.

Po nastavení všech potřebných parametrů jsme spustili automatické měření a výsledky jsme poté zhodnotili v excelu a statistickém programu GraphPad.

4.3.2 PCR

Den před experimentem, jsme dali chloroform, izopropylalkohol a 75% ethanol do -20°C . 20 minut před začátkem jsme z lednice vyndali Trizol (TRI Reagent™) a nechali ho při pokojové teplotě. Dali jsme si nahřát PBS do vodní lázně při 37°C , připravili a popsali si mikrocentrifugační zkumavky a zapnuli centrifugu, aby byla vychlazená na 4°C .

Příprava

1. Nejdříve jsme odsáli médium z 6-jamkových kultivačních nádob a napipetovali 500 μ l nahřátého PBS. Tento krok jsme provedli 2x abychom odstranili staré médium.
2. Odsáli jsme PBS a přidali 0,5ml Trizolu do každé jamky. Trizol způsobuje rozpad buněk a uvolnění DNA, RNA a proteinů.
3. Nechali jsme Trizol 5 minut působit a jemně jsme pohybovali kultivační nádobou, aby se obsah jamek promísil.
4. Po 5 minutách jsme každou jamku promyli a obsah přenesli do mikrocentrifugační zkumavky (PCRclean).

Izolace RNA

1. Vzorky z předešlého kroku jsme zhomogenizovali v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.
2. Následně jsme ke každému vzorku přidali 100 μ l chloroformu, třepali v ruce a následně zvortexovali na 10 sekund.
3. Vzorky jsme nechali 5 minut stát při pokojové teplotě a poté zcentrifugovali při 13 200 rpm při 4°C po dobu 15 minut. Po centrifugaci jsme pozorovali oddělení vodní a organické fáze a mezi nimi bílou mezivrstvou.
4. Do nových zkumavek jsme si napipetovali 5 μ l LPA GenElute™ –LPA (56575-1ML, Merck, Německo) na stabilizaci RNA a přenesli do nich vodní vrstvou.
5. Následně jsme přidali 250 μ l isopropylalkoholu do každého vzorku a promíchali vortexem po dobu 10 sekund.
6. Nechali jsme vzorky 10 minut stát při pokojové teplotě a následně je zcentrifugovali při 4°C a 13 200 rpm po dobu 10 minut.
7. Odsáli jsme izopropylalkohol a k vytvořené peletce jsme přidali 500 μ l 75% ethanolu a vortexem promíchali po dobu 10 sekund.

Měření koncentrace RNA

1. Odsáli jsme 75% ethanol ze zkumavek a RNA peletku jsme nechali vyschnout na vzduchu. Poté jsme přidali 15 μ l vody pro injekce (API). Následně jsme zkumavky zvortexovali a nechali po dobu 20 minut v lednici.
2. Dleším krokem bylo měření RNA pomocí spektrofotometru (Nanophotometr Pearl, Implen GmbH, Německo). Na přístroji jsme nastavili faktor zředění 1.000, jednotky ng/ μ l, lid faktor 40 a změřili slepý vzorek (API), abychom eliminovali absorpci pozadí.

3. Vzorke jsme měřili v objemu 1,5 μ l a po každém měření jsme důkladně vyčistili optickou plochu spektrofotometru. Výsledky jsme zapisovali do tabulky 6.

Transkripce RNA do cDNA

1. Po měření koncentrace jsme vzorky naředili v 0,2ml mikrozkušavkách na koncentraci 100ng/ μ l v objemu 10 μ l (tabulka 6) a následně jsme si připravili mastermix na reverzní transkripci (MM RT) (tabulka 7).

Tabulka 6: Ředění RNA

Číslo vzorku	Název vzorku	ng/ μ l	Ředění	
			Objem mRNA	Objem vody
1	8-K1			
2	8-K2	212	4,72	5,28
3	8-K3	243	4,12	5,88
4	8-K4	233	4,29	5,71
5	8-K5	272	3,68	6,32
6	8-K6	293	3,41	6,59
7	8-GLI1	227	4,41	5,59
8	8-GLI2	243	4,12	5,88
9	8-GLI3	235	4,26	5,74
10	8-GLI4	274	3,65	6,35
11	8-GLI5	274	3,65	6,35
12	8-GLI6	361	2,77	7,23
13	16-K1	301	3,32	6,68
14	16-K2	272	3,68	6,32
15	16-K3	276	3,62	6,38
16	16-K4	266	3,76	6,24
17	16-K5	276	3,62	6,38
18	16-K6	285	3,51	6,49
19	16-GLI1	256	3,91	6,09
20	16-GLI2	276	3,62	6,38
21	16-GLI3	258	3,88	6,12
22	16-GLI4	264	3,79	6,21
23	16-GLI5	256	3,91	6,09
24	16-GLI6	276	3,62	6,38

K1-6 jsou kontroly po 8 nebo 16 hodinách. Zelenou barvou jsou vyznačeny naměřené koncentrace, oranžovou barvou je vyznačen objem mRNA a modrou barvou je vyznačen objem vody. U kontrolního vzorku číslo 1 chybí výsledky z důvodu odsátí peletky.

Tabulka 7: Příprava mastermixu na reverzní transkripci

MM RT	23	VZORKŮ			
			množství	nadbytek	vzorek (uL)
1	Voda bez nukleáz		4,2	4,536	122,5
2	Pufr pro reverzní transkripci		2	2,16	58,3
3	Náhodné primery pro reverzní transkripci		2	2,16	58,3
4	Mix deoxynukleotidtrifosfátů		0,8	0,864	23,3
5	Reverzní transkriptáza		1	1,08	29,2

2. Přidali jsme 10 μ l MM RT do každého vzorku. Vzorky jsme zcentrifugovali po dobu přibližně 5 sekund a vložili do termocykleru (Biometra Tone 96G, Analytik Jena, Německo).
3. Po skončení přepisu jsme přidáním 180 μ l API jsme naředili vzorky na 5 ng/ μ l.
4. Dále jsme spojili 5 μ l mastermixu na PCR (TaqManTM Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Kalifornie, USA) s 0,5 μ l primeru (tabulka 8). Výsledných 5,5 μ l jsme napipetovali do každé jamky 96-jamkové nádoby. Následně jsme přidali 4,5 μ l vzorku do každé jamky, v duplikátu pod sebe (tabulka 9). Nádobu jsme přelepili fólií a dali na 2 minuty při 1000 rpm do centrifugy.

Tabulka 8: Master mix na PCR

MM PCR	23	VZORKŮ	
			Objem na jednu jamku v μ l
1	MM	5	250
2	primer	0,5	25
3	vzorek	4,5	

MM – master mix

Tabulka 9: Vzorky v 96-jamkové nádobě

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		K2-8	K3-8	K4-8	K5-8	K6-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	} Primer 1
B		K2-8	K3-8	K4-8	K5-8	K6-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	
C	K1-16	K2-16	K3-16	K4-16	K5-16	K6-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	
D	K1-16	K2-16	K3-16	K4-16	K5-16	K6-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	
E		K2-8	K3-8	K4-8	K5-8	K6-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	} Primer 2
F		K2-8	K3-8	K4-8	K5-8	K6-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	G200-8	
G	K1-16	K2-16	K3-16	K4-16	K5-16	K6-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	
H	K1-16	K2-16	K3-16	K4-16	K5-16	K6-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	G200-16	

Světle šedá barva znázorňuje kontroly po 8 hodinách inkubace a tmavě šedá barva kontroly po 16 hodinách inkubace. G200 – 200μM glipizid po 8 (světle zelená) či 16 (tmavě zelená) hodinové inkubaci. Do řádků A-D jsme dávali primer 1 a do řádků E-H jsme dávali primer 2.

- Po centrifugaci jsme 96-jamkovou desku vložili do termocykleru (QuantStudio™ Flex Real-Time PCR Systém, Applied Biosystems, Kalifornie, USA).
- Naměřené výsledky jsme vyhodnocovali v excelové tabulce, kde jsme pracovali s hodnotou CT, z které byla poté vypočítána relativní genová exprese buněk.

Nejdříve jsme si v excelu vypočítali hodnotu delta CT, která udává rozdíl mezi CT cílového genu a CT referenčního genu:

$$\Delta CT = CT (\text{cílový gen}) - CT (\text{referenční gen})$$

Následně jsme vypočítali hodnotu delta delta CT, který udává rozdíl mezi delta CT cílového genu a průměrem delta CT kontrolní skupiny:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{cílový gen}) - \text{průměr } \Delta CT (\text{kontrolní skupina})$$

Dalším výpočtem je negativní druhá mocnina delta delta CT:

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

Výsledek negativní druhé odmocniny delta delta CT jsme vynásobili 100, abychom získali % kontroly. Tyto hodnoty v % nám pak vyjadřují expresi cílového genu vztáhnoutou na expresi referenčního genu (103). Vhodný referenční gen – β-aktin - jsme vybrali pomocí softwaru RefFinder.

4.3.3 ELISA

Vzorky jsme získali odebráním supernatantu z 12-jamkových nádob, které jsme měli připravené na průtokovou cytometrii. Vzorky jsme po odebrání zamrazili na -80°C a uchovávali při této teplotě až do samotného experimentu.

V našem experimentu jsme používali sendvičovou ELISA metodu.

Postup:

Den před experimentem:

1. V prvním kroku jsme si vyndali naše vzorky z mrazáku a dali je do ledničky přes noc roztát.
2. Poté jsme si zředili záchytnou protilátkou na pracovní koncentraci $2\mu\text{g/ml}$ pomocí roztoku PBS. Vypočítali jsme si tedy množství roztoku, které je potřebné na 96 jamek na základě toho, že do každé jamky přijde $100\mu\text{l}$. S dostatečnou rezervou tento objem činil 12ml ($12000\mu\text{l}$). Následně bylo potřeba spočítat, kolik záchytné protilátky přidáme do roztoku PBS. Vypočítaný objem ($66,7\mu\text{l}$) jsme nejprve odebrali z falkonky s PBS a následně přidali ten stejný objem záchytné protilátky do falkonky. Takto připravenou záchytnou protilátku jsme resuspendovali a napipetovali multikanálovou pipetou $100\mu\text{l}$ do jamek v 96-jamkové nádobě. Poté jsme nádobu přelepili adhezní folií a vložili do přístroje na noc při 500 rpm a při pokojové teplotě.

Výpočet objemu záchytné látky:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 2\mu\text{g/ml} \times 12000\mu\text{l} / 360\mu\text{g/ml}$$

$$V_2 = 66,7\mu\text{l} \text{ záchytné protilátky}$$

Den experimentu:

1. Připravili jsme si promývací roztok a ředící činidla.
 - a. Promývací roztok nám slouží na odstranění použitých látek, které se nám na kultivační nádobu nenavázaly. Do odměrné baňky jsme napipetovali 20ml koncentrovaného promývacího roztoku pomocí sérologické pipety. Následně jsme ho zředili destilovanou vodou do objemu 500ml .
 - b. Ředící činidlo, jsme používali na pracovní zředění detekční protilátky a streptavidinu. Slouží k udržení stability detekční protilátky a enzymatické aktivity streptavidinu. Ředící činidlo jsme naředili v poměru

1:10 s roztokem PBS. Potřebovali jsme 80ml, takže jsme přidali 8ml ředícího činidla a 72ml roztoku PBS.

2. Kultivační nádobu jsme vyndali z přístroje, odlepili adhezní fólii a vylili její obsah rychlým švihem do umyvadla. Poté jsme ji 3x promyli promývacím roztokem pomocí multikanálové pipety. Do každé jamky jsme napipetovali 250 μ l. Obsah jamek jsme vylili rychlým švihem do umyvadla.
3. V dalším kroku jsme napipetovali 250 μ l ředícího činidla do každé jamky, desku přelepili adhezní fólií a dali zpět do přístroje na 1 hodinu při 500 rpm a pokojové teplotě.
4. Následně jsme destičku vyndali z přístroje, slepili fólii a vylili obsah rychlým švihem do umyvadla. Poté jsme jamky ještě 3x promyli 250 μ l promývacího roztoku a vylili.
5. Připravili jsme si kalibrační řadu (obrázek 14). Vypočítali jsme, kolik koncentrovaného standardu je potřeba na přípravu nejkonzentrovějšího bodu kalibrační řady. Připravili jsme si 7 eppendorfek a označili si je podle koncentrací od 8000pg/ml do 125pg/ml + jeden slepý vzorek. Eppendorfky jsme si naplnili 500 μ l ředícího činidla s výjimkou první eppendorfky kde jsme dali 1000 μ l ředícího činidla. Z první eppendorfky jsme odebrali 21,1 μ l ředícího činidla a přidali 21,1 μ l koncentrovaného standardu, koncentrace tedy byla 8000pg/ml. Eppendorfku jsme zvortexovali a přenesli 500 μ l do druhé eppendorfky, kde koncentrace v tuto chvíli byla 4000pg/ml. Takto jsme ředili až do koncentrace 125pg/ml.

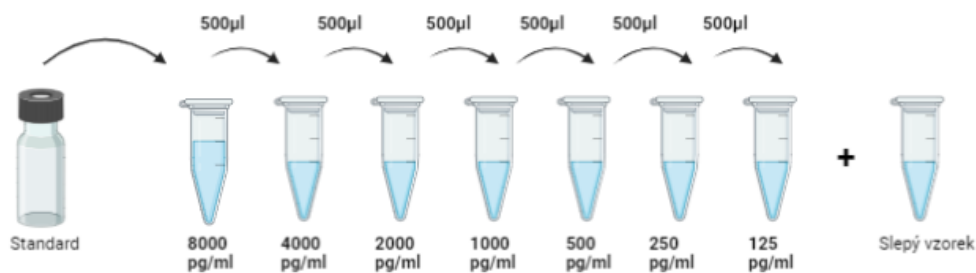
Výpočet standardu:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 8\text{ng/ml} \times 1000\mu\text{l} / 380\text{ng/ml}$$

$$V_2 = 21,1\mu\text{l} \text{ koncentrovaného standardu}$$



Obrázek 14: Kalibrační řada

Kalibrační řada byla připravena sériovým ředěním od koncentrace 8000pg/ml po 125pg/ml. Vedle toho jsme si připravili i slepý vzorek s 500µl zásobního roztoku ředícího činidla (obrázek vytvořený autorkou).

- Do každé jamky jsme napipetovali 50µl ředícího činidla a 50µl vzorků a standardu (tabulka 10). Destičku jsme přelepili adhezí fólií a na 2 hodiny jsme ji dali do přístroje při 500 rpm a pokojové teplotě.

Tabulka 10: Šablona vzorků

	1	2	3	4	5	6
A	0	0	K1	K1	100GLI3	100GLI3
B	125	125	K2	K2	100GLI4	100GLI4
C	250	250	K3	K3	100GLI5	100GLI5
D	500	500	K4	K4	200GLI1	200GLI1
E	1000	1000	K5	K5	200GLI2	200GLI2
F	2000	2000	K6	K6	200GLI3	200GLI3
G	4000	4000	100GLI1	100GLI1	200GLI4	200GLI4
H	8000	8000	100GLI2	100GLI2	200GLI5	200GLI5

V sloupcích 1 a 2 jsme si napipetovali kalibrační řadu, vždy v duplikátu vedle sebe. Stejně tak jsme napipetovali i náš experiment. GLI – glipizid 100 nebo 200µM, K – kontrola

- Po uběhnutí době jsme kultivační nádobu vyndali z přístroje, odlepili fólii a vylili obsah jamek rychlým švihem do umyvadla. Poté jsme 3x napipetovali 250µl promývacího roztoku a zase vylili.
- Připravili jsme si detekční protilátku. Naředili jsme ji na pracovní koncentraci 50ng/ml v 12ml ředícího činidla. Tento vypočítaný objem (66,7µl) jsme odebrali z 12ml zásobního roztoku ředícího činidla a poté přidali ten stejný objem detekční protilátky.

Výpočet detekční protilátky:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_2 = c_1 \times V_1 / c_2$$

$$V_2 = 0,05\mu\text{g/ml} \times 12000\mu\text{l} / 9\mu\text{g/ml}$$

$$V_2 = 66,7\mu\text{l detekční protilátky}$$

9. Do každé jamky jsme poté přidali 100 μl připraveného roztoku s detekční protilátkou. Znovu jsme nádobu přelepili fólií a dali na 2 hodiny do přístroje při 500 rpm a pokojové teplotě.
10. Po 2 hodinách jsme nádobu vyndali z přístroje, odlepili fólii a vylili obsah rychlým švihem do umyvadla. Napipetovali jsme 250 μl promývacího roztoku do každé jamky a obsah opět vylili. Tento krok jsme zopakovali ještě 2x.
11. Připravili jsme si roztok streptavidinu-HRP v ředícím činidle. Požadovaná koncentrace podle protokolu byla 200 násobné zředění zásobního roztoku. Na základě toho jsme si vypočítali, že potřebujeme 60 μl streptavidinu-HRP. Odebrali jsme tak 60 μl z 12ml roztoku ředícího činidla a napipetovali do něj 60 μl streptavidinu-HRP.

Výpočet potřebného objemu streptavidinu-HRP:

Zředění 1:200 a potřebujeme přidat 12000 μl

$$12000\mu\text{l} / 200 = 60\mu\text{l streptavidinu-HRP}$$

12. Do každé jamky jsme napipetovali 100 μl streptavidinu-HRP. Opět jsme přelepili fólií a dali na 20 minut inkubovat do přístroje za tmy.
13. Po 20 minutách jsme vyndali nádobu z přístroje, odlepili fólii a rychlým švihem vylili obsah do umyvadla. Opět jsme 3x promyli 250 μl promývacího roztoku.
14. Po promytí jsme přidali 100 μl substrátu a pozorovali změnu barvy na modrou. Nádobu jsme opět 20 minut inkubovali v přístroji za tmy.
15. Na závěr jsme do každé jamky napipetovali 50 μl stop roztoku, kterým jsme zastavili reakci. To bylo vidět změnou barvy z modré na žlutou. Poté jsme šli vzorky změřit. Měřili jsme absorbanci při vlnové délce 450nm a 540nm.
16. Následně jsme výsledky absorbancí zpracovali pomocí excelu a GraphPadu.

- Prvně jsme odečetli naměřené hodnoty při 540nm od hodnot při 450nm (tabulka 11).

Tabulka 11: Výsledné hodnoty rozdílu absorbancí 540nm a 450 nm

	1	2	3	4	5	6
A	0,241	0,242	0,461	0,471	0,421	0,445
B	0,308	0,297	0,428	0,442	0,375	0,375
C	0,386	0,376	0,433	0,461	0,384	0,412
D	0,522	0,537	0,468	0,462	0,423	0,44
E	0,832	0,812	0,477	0,471	0,429	0,466
F	1,472	1,387	0,469	0,471	0,424	0,451
G	2,479	2,502	0,42	0,435	0,428	0,442
H	3,785	3,808	0,489	0,476	0,436	0,458

První dva sloupce jsou hodnoty koncentrací z kalibrační řady. Světle šedou barvou je označena kontrola, světle zelenou glipizid o koncentraci 100 μ M a tmavší zelenou barvou je označen glipizid o koncentraci 200 μ M.

- Odečetli jsme zprůměrovaný slepý vzorek (tabulka 12).

Tabulka 12: Hodnoty po odečtení slepého vzorku

	1	2	3	4	5	6
A	-0,0005	0,0005	0,2195	0,2295	0,1795	0,2035
B	0,0665	0,0555	0,1865	0,2005	0,1335	0,1335
C	0,1445	0,1345	0,1915	0,2195	0,1425	0,1705
D	0,2805	0,2955	0,2265	0,2205	0,1815	0,1985
E	0,5905	0,5705	0,2355	0,2295	0,1875	0,2245
F	1,2305	1,1455	0,2275	0,2295	0,1825	0,2095
G	2,2375	2,2605	0,1785	0,1935	0,1865	0,2005
H	3,5435	3,5665	0,2475	0,2345	0,1945	0,2165

První dva sloupce jsou hodnoty koncentrací z kalibrační řady. Světle šedou barvou je označena kontrola, světle zelenou glipizid o koncentraci 100 μ M a tmavší zelenou barvou je označen glipizid o koncentraci 200 μ M.

- Zprůměrovali jsme hodnoty každého vzorku (tabulka 13).

Tabulka 13: Zprůměrované hodnoty

	1	2	3
A	0	0,2245	0,1915
B	0,061	0,1935	0,1335
C	0,1395	0,2055	0,1565
D	0,288	0,2235	0,19
E	0,5805	0,2325	0,206
F	1,188	0,2285	0,196
G	2,249	0,186	0,1935
H	3,555	0,241	0,2055

První sloupec jsou hodnoty koncentrací z kalibrační řady. Světle šedou barvou je označena kontrola, světle zelenou barvou glipizid o koncentraci 100 μ M a tmavší zelenou barvou je označen glipizid o koncentraci 200 μ M.

- Poté jsme průměry hodnot koncentrací vložili do softwaru AssayFit Pro, který nám vytvořil 4-PL kalibrační křivku. Na základě toho, jsme vypočítali výsledné koncentrace (tabulka 14).

Tabulka 14: Výsledné koncentrace z AssayFit Pro

	1	2	3
A		415,242	356,578
B	94,965	360,181	248,471
C	260,046	381,664	292,287
D	524,419	413,487	353,871
E	998,848	429,237	382,554
F	1979,594	422,249	364,676
G	4018,006	346,633	360,181
H	7992,17	444,021	381,664

První sloupec jsou hodnoty koncentrací z kalibrační řady. Světle šedou barvou je označena kontrola, světle zelenou glipizid o koncentraci 100 μ M a tmavší zelenou barvou je označen glipizid o koncentraci 200 μ M.

4.3.4 Adheze monocytů k endotelovým buňkám

Testem adheze jsme sledovali počet monocytů přilnutých k EC pomocí průtokového cytometru. Pracovali jsme s buňkami premedikovanými 24 hodin před experimentem pomocí glipizidu v koncentraci 100 a 200 μ M. Jeden vzorek sloužil jako kontrola pro neznačené EC a jeden pro kontrolu monocytů (THP-1), které byly značené pomocí Vibrant DiO.

Postup práce:

1. Jako první jsme si dali nahřát růstové médium bez FBS.
2. Na jednu jamku jsme potřebovali 1×10^5 THP-1. Počet jamek byl 18, ale počítali jsme o jednu jamku více, abychom extra buňky mohli později použít na tvorbu gatu v cytometru. Potřebovali jsme tedy THP-1 na 19 jamek. Pomocí počítačky buněk jsme zjistili koncentraci THP-1 ($1,587 \times 10^6$ buněk na ml). Na základě této koncentrace jsme si vypočítali, kolik potřebujeme odebrat média (1,197ml), a tento objem jsme přenesli pipetou do 5ml eppendorfky.

Výpočet potřebného počtu monocytů:

$$\begin{array}{r} 1 \text{ jamka} \dots\dots\dots 100\,000 \text{ THP-1} \\ 19 \text{ jamek} \dots\dots\dots X \text{ THP-1} \\ \hline X = 1\,900\,000 \text{ THP-1} \end{array}$$

Výpočet objemu monocytů:

$$\begin{array}{r} 1\,587\,000 \text{ THP} \dots\dots\dots \text{ v } 1\text{ml} \\ 1\,900\,000 \text{ THP} \dots\dots\dots \text{ v } X\text{ml} \\ \hline X = 1,197\text{ml} \end{array}$$

3. Eppendorfku jsme dali do cetrifugy na 3 minuty při 300rcf.
4. Mezi tím jsme si vypočítali, kolik média bez FBS bude potřeba přidat v následujícím kroku. Bylo zadané, že na 1×10^6 THP-1 je potřeba přidat 1ml média.

Výpočet objemu média:

$$\begin{array}{r} 1\text{ml média} \dots\dots\dots 1\,000\,000 \text{ THP-1} \\ X\text{ml média} \dots\dots\dots 1\,900\,000 \text{ THP-1} \\ \hline X = 1,9\text{ml média} \end{array}$$

5. Po vyndání z centrifugy jsme odsáli supernatant a peletku THP-1 resuspendovali v 1,9ml média bez FBS.
6. K THP-1 jsme přidali Vybrant DiO. Výrobce Vibrant DiO udává ideální koncentraci barvy jako 4 μ l Vibrant DiO na 1×10^6 THP-1. Na základě toho jsme si

vypočítali, že do eppendorfky bude potřeba přidat 7,6 μ l Vibrant DiO. Po přidání jsme eppendorfku vložili do inkubátoru na 15 minut při 37°C s 5% CO₂.

Výpočet Vibrant DiO:

1 000 000 THP-1 4 μ l barvy

1 900 000 THP-1 X μ l

X= 7,6 μ l Vibrant DiO

7. Po inkubaci jsme eppendorfku znovu vložili do centrifugy na 3 minuty při 300rcf a poté odsáli supernatant.
8. Dále jsme přidali 3ml média bez FBS, stočili v centrifuze ne 3 minuty při 300rcf a odsáli. Tento krok jsme zopakovali ještě jednou.
9. Do každé jamky jsme potřebovali přidat 1x10⁵ THP-1 v 100 μ l. Vypočítali jsme, že THP1 rozředíme v 1,9ml média.

Výpočet objemu média:

100 μ l média 100 000 THP-1

X μ l média 1 900 000 THP-1

X= 1,9ml média

10. Poté jsme přidali 1,9ml média bez FBS a resuspendovali peletku.
11. Naše 12-jamkové inkubační nádoby se vzorky jsme si vyndali z inkubátoru a do každé jamky napipetovali 100 μ l připravené směsi THP-1 monocytů. Destičky jsme vložili zpět do inkubátoru na 1 hodinu při 37°C s 5% CO₂.
12. Mezi tím jsme si dali nahřát PBS a akutázu na 20 minut do vodní lázně při 37°C.
13. Po hodině jsme vyndali destičky z inkubátoru a odsáli jsme z jamek médium s neadherentními THP-1.
14. Jamky jsme propláchli 300 μ l PBS, jemně promíchali a odsáli. Tento krok jsme opakovali 2x.
15. Přidali jsme 150 μ l akutázy a desky dali na 5 minut do inkubátoru.
16. Po 5 minutách jsme pod mikroskopem zkontrolovali, zda se buňky oddělili od povrchu.

17. Připravili jsme si potřebný počet 1,5ml eppendorfek s nízkou přilnavostí. Do jamek jsme přidali 300 μ l PBS s 1% BSA, resuspendovali a objem přenesli do eppendorfek. Tento postup jsme opakovali ještě jednou.
18. Eppendorfky jsme stočili v centrifuze 3 minuty při 300rcf a odsáli supernatant.
19. Na závěr jsme přidali 200 μ l studeného PBS a změřili v cytometru.
 - a. Nejprve jsme si změřili naše kontroly EC a THP-1 a podle toho jsme vytvořili gate.
 - b. Poté jsme změřili naše vzorky, přičemž jsme každý vzorek změřili 2x.
 - c. Výsledky jsme vyhodnotili pomocí excelu a GraphPadu.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky v této práci uvádíme jako medián s mezikvartilovým rozpětím. Hladinu statistické významnosti (p) jsme si určili Mann-Whitney testem nebo Kruskal-Wallis testem. V případě, že je hodnota statisticky nevýznamná ($p > 0,05$), označujeme ji symbolem „ns“. Za statisticky významný rozdíl se považuje hodnota $p \leq 0,05$. Statisticky významné hodnoty vůči kontrole označujeme symbolem „*“, přičemž platí, že: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Na vyhodnocení výsledků jsme použili statistický program GraphPad Prism 9 (verze 9.5.1 GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA).

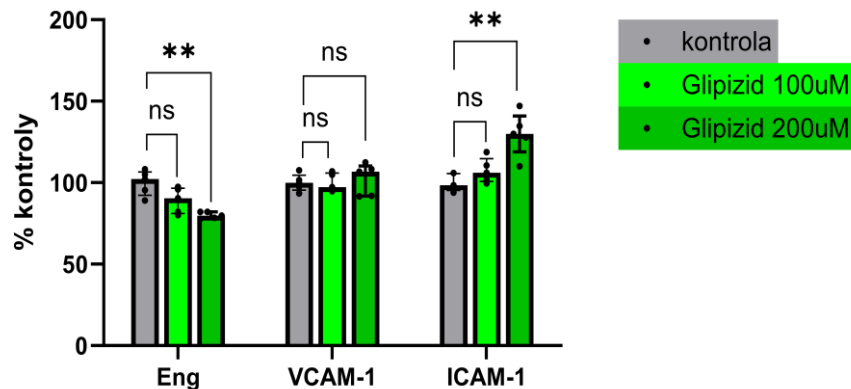
5.1 Proteinová exprese endoglinu a zánětlivých molekul

U proteinové exprese při 100 μ M koncentraci glipizidu po 24 hodinách jsme nedetekovali žádné signifikantní změny ($p \leq 0,05$).

U proteinové exprese při 200 μ M koncentraci glipizidu po 24 hodinách jsme detekovali signifikantní snížení endoglinu ($p \leq 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou. U proteinové exprese ICAM-1 jsme v této koncentraci detekovali signifikantní zvýšení ($p \leq 0,01$) a u molekuly VCAM-1 jsme nezaznamenali žádné signifikantní změny (graf 1).

Graf 1: Proteinová exprese endoglinu a markerů zánětu po 24 hodinách

proteinová exprese ENG a markerů zánětu po 24h

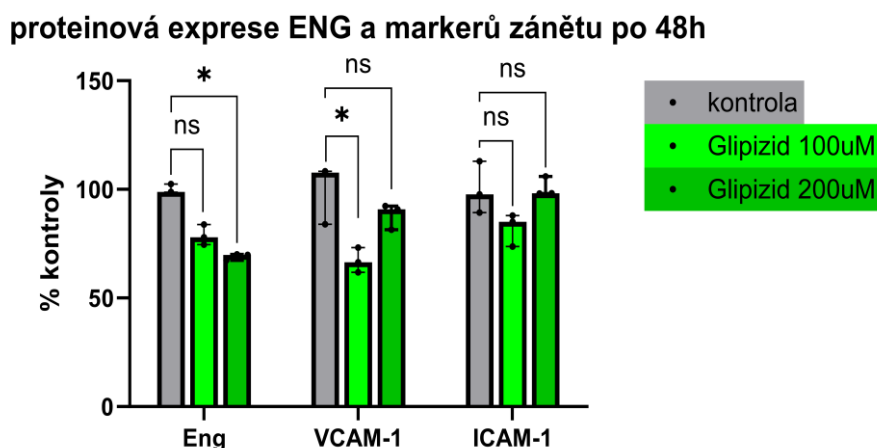


Pomocí FC jsme změřili hladiny proteinů endoglinu, VCAM-1 a ICAM-1 u diabetických koronárních endotelových buněk. Měření jsme vykonávali po 24 hodinové premedikaci buněk glipizidem o koncentraci 100µM a 200µM. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n=5$, Kruskal-Wallis test, přičemž platí, že: „ns“ $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Eng – endoglin, VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezní molekula 1, ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula 1.

U proteinové exprese při 100µM koncentraci glipizidu po 48 hodinách jsme detekovali signifikantní snížení ($p \leq 0,05$) molekuly VCAM-1 v porovnání s kontrolní skupinou. U molekuly ICAM-1 a endoglinu jsme v této koncentraci nezaznamenali žádné signifikantní změny ($p \leq 0,05$) (graf 2).

U proteinové exprese při 200µM koncentraci glipizidu po 48 hodinách jsme detekovali signifikantní snížení endoglinu ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou. U molekuly ICAM-1 a VCAM-1 jsme v této koncentraci nezaznamenali žádné signifikantní změny ($p \leq 0,05$).

Graf 2: Proteinová exprese endoglinu a markerů zánětu po 48 hodinách



Pomocí FC jsme změřili hladiny proteinů endoglinu, VCAM-1 a ICAM-1 u diabetických koronárních endotelových buněk. Měření jsme vykonávali po 48 hodinové premedikaci buněk glipizidem o koncentraci 100µM a 200µM. Výsledky jsou vyjádřené v % kontroly, $n=3$, Kruskal-Wallis test, přičemž platí, že: „ns“ $p > 0,05$ a $* p \leq 0,05$. Eng – endoglin, VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezní molekula 1, ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula 1.

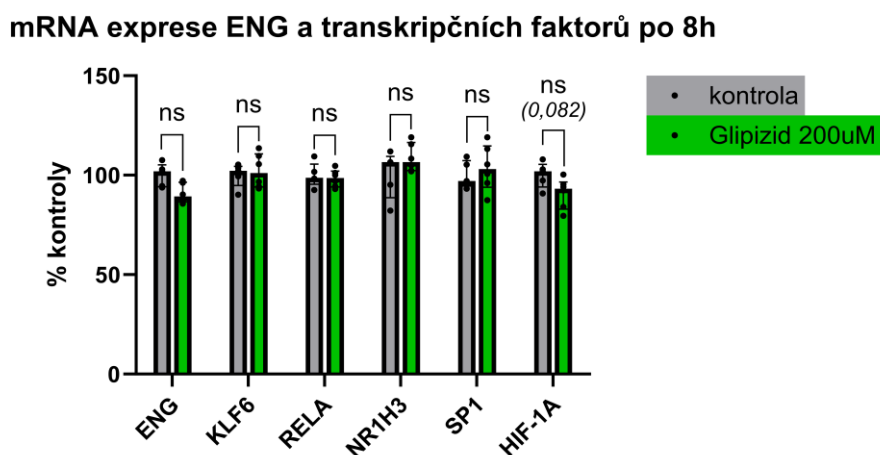
Žádné studie zatím neprokázaly účinky glipizidu na proteinovou expresi endoglinu. Naše výsledky ukazují v premedikaci s 200 µM glipizidem po 24 i 48 hodinách významné snížení hladin endoglinu, což odpovídá očekávané reakci endoglinu na glipizid. Jedna studie o metforminu ukázala, že metformin v kombinaci s pemetrexedem snižuje expresi membránového endoglinu v plicní tkáni myši. To by mohlo naznačovat určité podobnosti v účinku těchto antidiabetik (104).

Expresí adhezních molekul po stimulaci glipizidem se zabývala jenom jedna *in vivo* studie, která u molekuly VCAM-1 nepozorovala žádné významné změny hladin a u molekuly ICAM-1 prokázala snížené hladiny exprese. Tento protichůdný výsledek může být například z důvodu, že se jednalo o *in vivo* studii, použití jiné koncentrace léčiva nebo z důvodu odlišné doby expozice glipizidem (105).

5.2 mRNA exprese endoglinu a transkripčních faktorů

V premedikaci glipizidem o koncentraci 200 μ M po 8 hodinách byla prokázána hraniční hodnota signifikance ($p = 0,082$) u mRNA exprese transkripčního faktoru HIF-1A. U endoglinu ani jeho ostatních transkripčních faktorů KLF6, RELA, NR1H3 a SP1 nedošlo k žádné signifikantní změně ($p > 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (graf 3).

Graf 3: mRNA exprese endoglinu a transkripčních faktorů po 8 hodinách



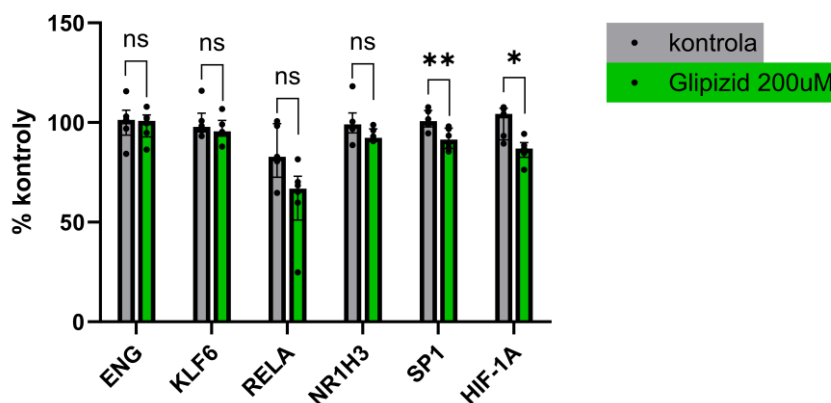
Graf znázorňuje míru mRNA exprese endoglinu a jeho transkripčních faktorů KLF6, RELA, NR1H3, SP1 a HIF-1A po 8 hodinové premedikaci glipizidem. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly, $n=5-6$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že „ns“ $p > 0,05$. Eng – endoglin, KLF6 – Kruppelovi podobný faktor 6, RELA – p65 podjednotka Nukleárního faktoru kappa B, NR1H3 – nukleární receptor podrodiny 1 skupiny H člen 3, SP1 – specifický protein 1, HIF-1A – hypoxií indukovatelný faktor 1A

Po 16 hodinách premedikace glipizidem o koncentraci 200 μ M došlo k signifikantnímu snížení mRNA exprese transkripčních faktorů SP1 a HIF-1A ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou (graf 4).

U endoglinu a transkripčních faktorů KLF6, RELA a NR1H3 nebyla v mRNA expresi zaznamenána žádná signifikantní změna ($p > 0,05$).

Graf 4: mRNA exprese endoglinu a transkripčních faktorů po 16 hodinách

mRNA exprese ENG a transkripčních faktorů po 16h



Graf znázorňuje míru mRNA exprese endoglinu a jeho transkripčních faktorů KLF6, RELA, NR1H3, SP1 a HIF-1A po 16 hodinové premedikaci glipizidem. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly, $n=6$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že „ns“ $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Eng – endoglin, KLF6 – kruppelovi podobný faktor 6, RELA – p65 podjednotka Nukleárního faktoru kappa B, NR1H3 – nukleární receptor podrodiny 1 skupiny H člen 3, SP1 – specifický protein 1, HIF-1A – hypoxií indukovatelný faktor 1A

V našich experimentech jsme nezaznamenali žádnou signifikantní změnu mRNA exprese endoglinu, i když jeho proteinová exprese byla snížena. Jelikož jsme pozorovali změnu transkripční faktorů Sp1 a HIF-1A, je pravděpodobné, že i mRNA exprese endoglinu bude v určitém čase změněná, akorát jsme ji v námi pozorovaných časech nezachytili. Proto by bylo do budoucna vhodné udělat podrobnější časovou analýzu mRNA exprese endoglinu po premedikaci glipizidem.

Dle našeho nejlepšího vědomí, doposud neexistuje žádná studie, která by se zabývala mRNA expresí endoglinu a jeho transkripčních faktorů po premedikaci glipizidem. Ve studii zabývající se vlivem metforminu na genovou expresi různých faktorů včetně HIF-1A bylo popsáno snížení hladin HIF-1A, což souhlasí s našimi výsledky (106).

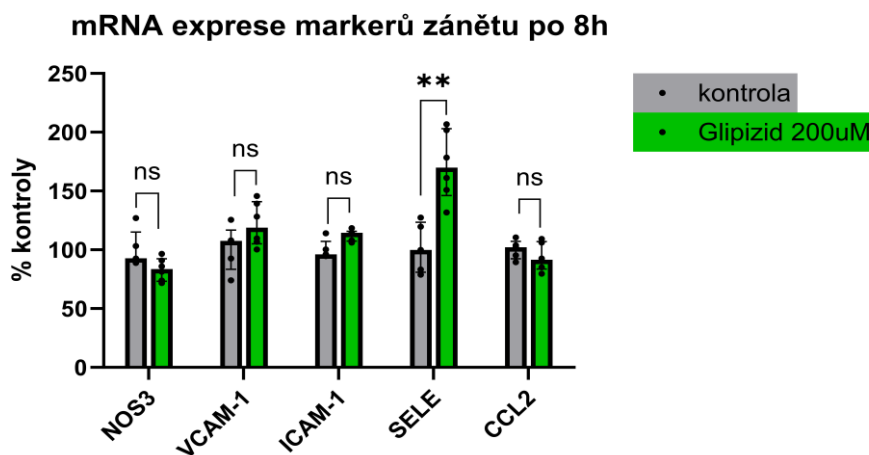
Jiné studie se zabývají také vlivem metforminu na SP1. V těchto studiích se tento transkripční faktor po premedikaci metforminem taktéž snižuje, stejně jako v našich výsledcích, což by mohlo naznačovat podobu v chování mezi metforminem a glipizidem (107, 108).

5.3 mRNA exprese markerů zánětu

V premedikaci po 8 hodinách glipizid v koncentraci 200 μ M vedl k signifikantnímu zvýšení mRNA exprese E-selektinu (SELE) ($p \leq 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou (graf 5).

U ostatních zánětlivých markerů (NOS3, VCAM-1, ICAM-1 a CCL2) nebyla v mRNA expresi zaznamenána žádná signifikantní změna.

Graf 5: mRNA exprese markerů zánětu po 8 hodinách

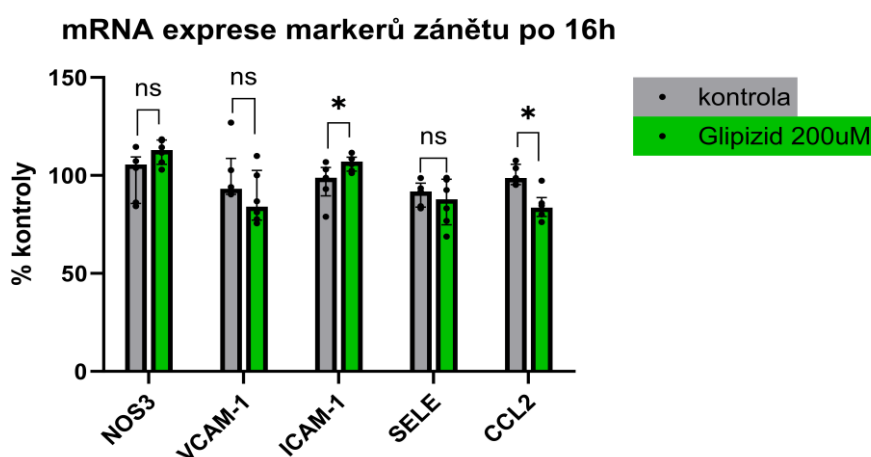


Graf znázorňuje míru mRNA exprese zánětlivých markerů NOS3, VCAM-1, ICAM-1, SELE, CCL2 po 8 hodinové premedikaci glipizidem. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly, $n=5-6$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že „ns“ $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$. NOS3 – syntáza oxidu dusnatého 3, VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezní molekula 1, ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula 1, SELE – E-selektin, CCL2 – C-C motiv chemokinového ligandu 2.

V premedikaci po 16 hodinách glipizid v koncentraci 200 μ M vedl k signifikantnímu zvýšení mRNA exprese ICAM-1 zánětlivého markeru ($p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou, zatímco mRNA exprese zánětlivého markeru CCL2 byla signifikantně snižena ($p \leq 0,05$) (graf 6).

U zánětlivých markerů NOS3, VCAM-1 a SELE nebyla v mRNA expresi zaznamenána žádná signifikantní změna.

Graf 6: mRNA markerů zánětu po 16 hodinách



Graf znázorňuje míru mRNA exprese zánětlivých markerů NOS3, VCAM-1, ICAM-1, SELE, CCL2 po 16 hodinové premedikaci glipizidem. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly, $n=6$, Mann-Whitney test, přičemž platí, že „ns“ $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$. NOS3 – syntáza oxidu dusnatého 3, VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezní molekula 1, ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula 1, SELE – E-selektin, CCL2 – C-C motiv chemokinového ligandu 2.

Studie zabývající se účinky glipizidu na markery zánětlivého vaskulárního rizika zjistila, že léčba glipizidem významně neovlivňuje molekulu VCAM-1 ani E-selektin. Na druhou stranu se ve studii snižovala koncentrace ICAM-1. Tato studie byla prováděna

in vivo a pacientům podávali 10mg glipizidu po dobu 12 týdnů, což by mohly být hlavní faktory zodpovědné za rozdíl v pozorovaných výsledcích (105).

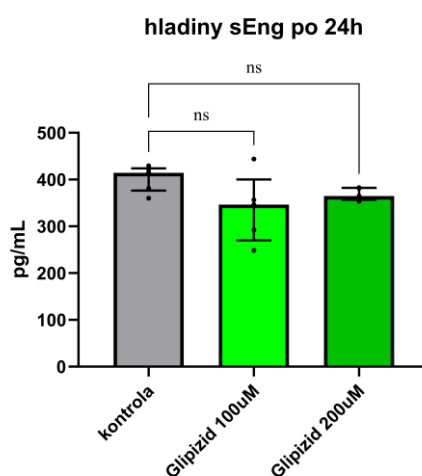
Žádné studie zatím neprokázaly účinky glipizidu na zánětlivý marker CCL2. Studie zabývající se gliklazidem a jeho účinky na dysfunkci buněk hladkého svalstva *in vitro* prokázala snížené hladiny exprese CCL2, což dle autorů dokazuje, že by gliklazid mohl mít příznivé účinky na snižování dysfunkce buněk vyvolané oxidativně modifikovaným LDL. V našem experimentu byla exprese CCL2 snížena podobně jako u gliklazidu, což by mohlo vézt k podobnému účinku (109).

5.4 Analýza sEng

Pomocí metody ELISA jsme měřili hladinu sEng po 24 hodinové premedikaci glipizidem o koncentraci 100 μ M a 200 μ M (graf 7).

V tomto čase a koncentraci jsme nedetekovali žádný signifikantní vliv glipizidu na hladinu sEng.

Graf 7: Hladiny sEng po 24 hodinách



Graf zobrazuje hladiny sEng po 24 hodinové premedikaci glipizidem o koncentraci 100 μ M a 200 μ M. Hladina sEng je vyjádřena v pg/ml, $n=5-6$, Kruskal-Wallis test, přičemž platí, že „ns“ $p > 0,05$.

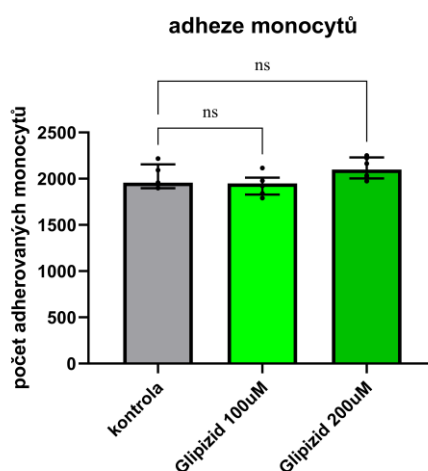
Na základě předchozích studií o snížených hladinách sEng, které jsou spojovány s hyperglykemií a diabetes mellitus (25) a předchozích zjištění, že proteinová exprese endoglinu byla snižena, jsme zkoumali také hladiny sEng. V našich výsledcích neměl glipizid signifikantní vliv na hladiny sEng, což naznačuje, že snížená proteinová exprese endoglinu pozorovaná pomocí průtokové cytometrie, je pravděpodobně způsobená sníženou transkripcí (tomu by nasvědčoval pokles mRNA exprese transkripčních faktorů Sp1 a HIF-1A) a ne štěpením na sEng.

5.5 Adheze monocytů

Pomocí FC jsme sledovali adhezi monocytů k EC. Pracovali jsme s koncentracemi glipizidu 100 μ M a 200 μ M po 24 hodinové premedikaci (graf 8).

V tomto čase a koncentraci jsme nedetekovali žádný signifikantní vliv glipizidu na adhezi monocytů k EC.

Graf 8: Adheze monocytů k EC po 24 hodinách



Graf zobrazuje míru adheze monocytů k EC po 24 hodinové premedikaci buněk glipizidem o koncentraci 100 μ M a 200 μ M. Výsledek je vyjádřený jako počet adherovaných monocytů, $n=5-6$, Kruskal-Wallis test, přičemž platí, že „ns“ $p > 0,05$.

Některé studie naznačují spojitost endoglinu a transendotelové migrace leukocytů. RGD peptid v extracelulární doméně endoglinu se může vázat na integriny na povrchu leukocytů a modulovat tak adhezi monocytů na EC (40, 70, 110). Modulaci adheze monocytů k EC glipizidem se nám v tomto experimentu nepodařilo prokázat. Můžeme si to vysvětlit například nedostatečným snížením proteinové exprese membránového endoglinu.

6. ZÁVĚR

V závěru lze říci, že glipizid ovlivňuje expresi endoglinu a souvisejících adhezních molekul a markerů, které jsou spojeny s endotelovou dysfunkcí. Snížení exprese endoglinu naznačuje možný terapeutický potenciál glipizidu v regulaci cévních funkcí. Aby bylo možné plně porozumět a potvrdit vliv glipizidu na endoglin a další aspekty endotelové dysfunkce, je nezbytné provést další podrobné *in vitro* a *in vivo* studie.

7. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Experimentální design premedikace FC – 24 a 48 hodin	46
Tabulka 2: Experimentální design premedikace PCR – 8 a 16 hodin.....	48
Tabulka 3: Experimentální design premedikace adheze monocytů k EC – 24 hodin	49
Tabulka 4: Příprava jednobarevných kontrol D-HCAEC	51
Tabulka 5: Příprava mastermixu D-HCAEC	52
Tabulka 6: Ředění RNA.....	55
Tabulka 7: Příprava mastermixu na reverzní transkripci	56
Tabulka 8: Master mix na PCR	56
Tabulka 9: Vzorky v 96-jamkové nádobě.....	57
Tabulka 10: Šablona vzorků	60
Tabulka 11: Výsledné hodnoty rozdílu absorbancí 540nm a 450 nm	62
Tabulka 12: Hodnoty po odečtení slepého vzorku	62
Tabulka 13: Zprůměrované hodnoty	63
Tabulka 14: Výsledné koncentrace z AssayFit Pro.....	63

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění endoglinu.....	15
Obrázek 2: Endoglin a signální dráhy TGF- β	18
Obrázek 3: Mezibuněčné spojení EC	20
Obrázek 4: Biomarkery endotelové dysfunkce.....	23
Obrázek 5: Typy endotelových buněk používané ve výzkumu KVS.....	26
Obrázek 6: Znázornění mechanismu receptorů a transportérů při DM.....	28
Obrázek 7: Mechanismus účinku sulfonylmočovinných antidiabetik.....	31
Obrázek 8: Zpracování a detekce signálu v průtokové cytometrii	34
Obrázek 9: Postup testu adheze monocytů.....	36
Obrázek 10: Schématické znázornění PCR.....	38
Obrázek 11: Druhy metod ELISA.....	41
Obrázek 12: Porovnání nárůstu buněk po 24 a 48 hodinách	50
Obrázek 13: Výběr populace.....	53
Obrázek 14: Kalibrační řada	60

Obrázky vytvořené autorkou byly zhotoveny v programu BioRender.

9. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Proteinová exprese endoglinu a markerů zánětu po 24 hodinách	68
Graf 2: Proteinová exprese endoglinu a markerů zánětu po 48 hodinách	69
Graf 3: mRNA exprese endoglinu a transkripčních faktorů po 8 hodinách	70
Graf 4: mRNA exprese endoglinu a transkripčních faktorů po 16 hodinách	71
Graf 5: mRNA exprese markerů zánětu po 8 hodinách	73
Graf 6: mRNA markerů zánětu po 16 hodinách	74
Graf 7: Hladiny sEng po 24 hodinách	76
Graf 8: Adheze monocytů k EC po 24 hodinách	77

10. POUŽITÁ LETERATURA

1. Schoonderwoerd MJA, Goumans MTH, Hawinkels L. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules*. 2020;10(2).
2. 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.
3. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*. 2011;31(6):2283-90.
4. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227-41.
5. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36(2):307-21.
6. Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. Inflammation and the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(5):351-8.
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. Balciunas M, Bagdonaite L, Samalavicius R, Baublys A. Markers of endothelial dysfunction after cardiac surgery: soluble forms of vascular-1 and intercellular-1 adhesion molecules. *Medicina (Kaunas)*. 2009;45(6):434-9.
9. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2006;29 Suppl 1:S43-8.
10. Groop L, Groop PH, Stenman S, Saloranta C, Totterman KJ, Fyhrquist F, et al. Comparison of pharmacokinetics, metabolic effects and mechanisms of action of glyburide and glipizide during long-term treatment. *Diabetes Care*. 1987;10(6):671-8.
11. Wensing G. Glipizide: an oral hypoglycemic drug. *Am J Med Sci*. 1989;298(1):69-71.
12. Thule PM, Umpierrez G. Sulfonylureas: a new look at old therapy. *Curr Diab Rep*. 2014;14(4):473.
13. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003;17(9):984-92.
14. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*. 2008;11(1):79-89.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390(6659):465-71.
24. Escribano J, Chen MB, Moeendarbary E, Cao X, Shenoy V, Garcia-Aznar JM, et al. Balance of mechanical forces drives endothelial gap formation and may facilitate cancer and immune-cell extravasation. *PLoS Comput Biol*. 2019;15(5):e1006395.
25. Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, 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.
26. Nachtigal P, Vecerova L, Pospisilova N, Micuda S, Brcakova E, Navarro Hernandez E, et al. Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol*. 2009;24(12):1499-506.
27. Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, et al. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25110-23.
28. 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.
29. Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem*. 1998;273(49):33011-9.
30. Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med*. 2010;4(3):351-60.
31. Margioulas-Siarkou G, Margioulas-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.
32. Duong CN, Vestweber D. Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin. *Front Physiol*. 2020;11:519.
33. 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).

34. Schnittler HJ. Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol.* 1998;93 Suppl 3:30-9.

35. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 1997;20(11 Suppl 2):II-3-10.

36. Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch.* 2016;468(7):1125-37.

37. Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;224(1):4-11.

38. Eissazadeh S, Mohammadi S, Faradonbeh FA, Rathouska JU, Nemeckova I, Tripska K, et al. Endoglin and soluble endoglin in liver sinusoidal endothelial dysfunction in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2024;1870(3):166990.

39. Nunez-Gomez E, Pericacho M, Ollauri-Ibanez C, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. The role of endoglin in post-ischemic revascularization. *Angiogenesis.* 2017;20(1):1-24.

40. 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.

41. 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.

42. 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.

43. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des.* 2003;9(7):521-30.

44. Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Appl Sci-Basel.* 2020;10(3).

45. 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.

46. Lippi M, Stadiotti I, Pompilio G, Sommariva E. Human Cell Modeling for Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).

47. Jimenez-Tellez N, Greenway SC. Cellular models for human cardiomyopathy: What is the best option? *World J Cardiol.* 2019;11(10):221-35.

48. Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 2003;83(1):183-252.

49. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2007;2(3):481-5.

50. ScienCell. Human Aortic Endothelial Cells. <https://sciencellonline.com/human-aortic-endothelial-cells/>. Accessed 2024 11.05.

51. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.

52. Lonza. D-HCAEC – Diseased Human Coronary Artery Endothelial Cells – Diabetes Type II. https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CZ/en/Primary-and-Stem-

[Cells/p/00000000000198274/D-HCAEC-%E2%80%93Diseased-Human-Coronary-Artery-Endothelial-Cells-%E2%80%93Diabetes-Type-II](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/251198274/). Accessed 2024 11.05.

53. Donnini D, Perrella G, Stel G, Ambesi-Impiombato FS, Curcio F. A new model of human aortic endothelial cells in vitro. *Biochimie*. 2000;82(12):1107-14.
54. Takagaki Y, Lee SM, Dongqing Z, Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Endothelial autophagy deficiency induces IL6 - dependent endothelial mesenchymal transition and organ fibrosis. *Autophagy*. 2020;16(10):1905-14.
55. Innoprot. Human Umbilical Vein Endothelial Cells. <https://innoprot.com/product/human-umbilical-vein-endothelial-cells/>. Accessed 2024 11.05.
56. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20(7):1183-97.
57. Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26 Suppl 1:S5-20.
58. Lucier J, Weinstock RS. Type 1 Diabetes. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2024.
59. Mahoney JE, Gray SL, Carnes M. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995;333(12):802.
60. Li W, Huang E, Gao S. Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(1):29-36.
61. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs*. 2002;16(2):17-23.
62. Wei X, Zou H, Zhang T, Huo Y, Yang J, Wang Z, et al. Gestational Diabetes Mellitus: What Can Medical Nutrition Therapy Do? *Nutrients*. 2024;16(8).
63. International Expert C. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1327-34.
64. Foo RX, Ma JJ, Du R, Goh GBB, Chong YS, Zhang C, et al. Gestational diabetes mellitus and development of intergenerational non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) after delivery: a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2024;72:102609.
65. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2005;115(3):485-91.
66. Symptomy. Cukrovka. <https://www.symptomy.cz/nemoc/cukrovka>. Accessed 2024 11.05.
67. Sun Y, Tao Q, Wu X, Zhang L, Liu Q, Wang L. The Utility of Exosomes in Diagnosis and Therapy of Diabetes Mellitus and Associated Complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:756581.
68. La Sala L, Pujadas G, De Nigris V, Canivell S, Novials A, Genovese S, et al. Oscillating glucose and constant high glucose induce endoglin expression in endothelial cells: the role of oxidative stress. *Acta Diabetol*. 2015;52(3):505-12.
69. Alvarez-Munoz P, Mauer M, Kim Y, Rich SS, Miller ME, Russell GB, et al. Cellular basis of diabetic nephropathy: V. Endoglin expression levels and diabetic nephropathy risk in patients with Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2010;24(4):242-9.
70. Tripska K, Igreja Sa IC, Vasinova M, Vicen M, Havelek R, Eissazadeh S, et al. Monoclonal anti-endoglin antibody TRC105 (carotuximab) prevents hypercholesterolemia and hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:845918.

71. Lebovitz HE. Glipizide: a second-generation sulfonylurea hypoglycemic agent. *Pharmacology, pharmacokinetics and clinical use. Pharmacotherapy.* 1985;5(2):63-77.
72. Wikiskripta. Antidiabetika. https://www.wikiskripta.eu/w/Peror%C3%A1n%C3%AD_antidiabetika. Accessed 2024 11.05.
73. Guo X, Huang Z, Ge Q, Yang L, Liang D, Huang Y, et al. Glipizide Alleviates Periodontitis Pathogenicity via Inhibition of Angiogenesis, Osteoclastogenesis and M1/M2 Macrophage Ratio in Periodontal Tissue. *Inflammation.* 2023;46(5):1917-31.
74. Sulfonylureas. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury.* Bethesda (MD)2012.
75. Tomlinson B, Li YH, Chan P. Evaluating gliclazide for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Pharmacother.* 2022;23(17):1869-77.
76. Melander A, Lebovitz HE, Faber OK. Sulfonylureas. Why, which, and how? *Diabetes Care.* 1990;13 Suppl 3:18-25.
77. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-76.
78. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56(3-4):350-60.
79. Delude RL. Flow cytometry. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S426-8.
80. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;699:1-29.
81. Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2013;Chapter 1:1 27 1-1 13.
82. Spurgeon BEJ, Naseem KM. Platelet Flow Cytometry: Instrument Setup, Controls, and Panel Performance. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020;98(1):19-27.
83. Xu K, Saaoud F, Yu S, Drummer Ct, Shao Y, Sun Y, et al. Monocyte Adhesion Assays for Detecting Endothelial Cell Activation in Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Methods Mol Biol.* 2022;2419:169-82.
84. Lowe DJ, Raj K. Quantitation of Endothelial Cell Adhesiveness In Vitro. *J Vis Exp.* 2015(100):e52924.
85. Vincent V, Thakkar H, Verma A, Sen A, Chandran N, Singh A. A novel flow cytometry-based quantitative monocyte adhesion assay to estimate endothelial cell activation in vitro. *Biotechniques.* 2020;68(6):325-33.
86. Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase chain reaction : basic protocols. *Methods Mol Biol.* 1993;15:1-29.
87. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):1-4.
88. Green MR, Sambrook J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(5).
89. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292-305.
90. Killelea T, Ralec C, Bosse A, Henneke G. PCR performance of a thermostable heterodimeric archaeal DNA polymerase. *Front Microbiol.* 2014;5:195.
91. Wadle S, Lehnert M, Rubenwolf S, Zengerle R, von Stetten F. Real-time PCR probe optimization using design of experiments approach. *Biomol Detect Quantif.* 2016;7:1-8.
92. 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.

93. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008;44(5):619-26.
94. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(3):597-601.
95. 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.
96. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*. 2013;133(9):e12.
97. Hornbeck PV. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol*. 2015;110:2.1-2.1.23.
98. Gollin RG, Briggs LR, Towers NR. Development and Evaluation of an Enzyme-Immunoassay for Sporidesmin in Pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1995;38(3):297-302.
99. Ltd. JE. Type of enzyme-linked immunosorbent assay. https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/applications/elisa?utm_term=elisa%20assay&utm_campaign=Products+%5BSearch,+Europe+-+Incl+UK%5D&utm_source=adwords&utm_medium=ppc&hsa_acc=9495885278&hsa_cam=1317422778&hsa_grp=57074230481&hsa_ad=589235151497&hsa_src=g&hsa_tgt=kwd-14388521&hsa_kw=elisa%20assay&hsa_mt=b&hsa_net=adwords&hsa_ver=3&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwrvyxBhAbEiwAEg_KgsyswpGU8hWUfgXDbylBa168wwUzVN5H8f27NKCGyKdeYCFyEVrsXRoCfyMQAvD_BwE. Accessed 2024 11.05.
100. Collin RG, Briggs LR, Towers NR. Development and evaluation of an enzyme immunoassay for sporidesmin in pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1995;38(3):297-302.
101. van Furth R, Raeburn JA, van Zwet TL. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood*. 1979;54(2):485-500.
102. Mistrik E, Blaha V, Dusilova Sulkova S, Sobotka L. [The MIAC (malnutrition, inflammation, atherosclerosis, calcification) syndrome]. *Vnitr Lek*. 2007;53(10):1092-9.
103. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
104. Wang JL, Lan YW, Tsai YT, Chen YC, Staniczek T, Tsou YA, et al. Additive Antiproliferative and Antiangiogenic Effects of Metformin and Pemetrexed in a Non-Small-Cell Lung Cancer Xenograft Model. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:688062.
105. Basu A, Jensen MD, McCann F, Nandy D, Mukhopadhyay D, McConnell JP, et al. Lack of an effect of pioglitazone or glipizide on lipoprotein-associated phospholipase A2 in type 2 diabetes. *Endocr Pract*. 2007;13(2):147-52.
106. Boreus LO, Hjemdahl P, Lagercrantz H, Martinsson A, Yao AC. Beta-adrenoceptor function in white blood cells from newborn infants: no relation to plasma catecholamine levels. *Pediatr Res*. 1986;20(11):1152-5.
107. Zhang KF, Wang J, Guo J, Huang YY, Huang TR. Metformin enhances radiosensitivity in hepatocellular carcinoma by inhibition of specificity protein 1 and epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cancer Res Ther*. 2019;15(7):1603-10.
108. Safe S, Nair V, Karki K. Metformin-induced anticancer activities: recent insights. *Biol Chem*. 2018;399(4):321-35.

109. Mamputu JC, Renier G. Gliclazide decreases vascular smooth muscle cell dysfunction induced by cell-mediated oxidized low-density lipoprotein. *Metabolism*. 2001;50(6):688-95.
110. 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.