

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd

Doktorský studijní program  
Farmacie

**Sledování vlivu statinů a solubilního endoglinu na markery endotelové  
dysfunkce u vybraných buněčných linií a kultur**

Disertační práce

**Mgr. Michala Vařejčková**

**Školitel disertační práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

**Konzultant: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.**

Hradec Králové, 2017

## Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. a své konzultantce RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za vedení mého postgraduálního studia, za jejich čas, pomoc, trpělivost a cenné rady během celého mého postgraduálního studia a při tvorbě této disertační práce.

Děkuji za spolupráci svým kolegům z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty a kolegům z Ústavu farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Děkuji vědeckým pracovníkům z výzkumného centra CIB-CSIC v Madridu prof. Carmelovi Bernabeu, Dr. Luise Botella Cubells, Dr. Eunáte Maria Gallardo-Vara, Dr. Lidii Ruiz Llorente a Carmen Langa za jejich vedení a spolupráci v průběhu mé odborné stáže.

Děkuji také za finanční podporu grantovým projektům GAUK 1158413/C a 1284214/C, GAČR 15-24015S, SVV/2017/260414.

Mé největší poděkování patří mé rodině a blízkým za jejich podporu a trpělivost v průběhu celého studia.

### Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultantky. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při práci čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Mgr. Michala Vařejčková

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Kandidát:** Mgr. Michala Vařejčková

**Školitel:** prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

**Název disertační práce:** Sledování vlivu statinů a solubilního endoglinu na markery endotelové dysfunkce u vybraných buněčných linií a kultur.

Tato disertační práce se zabývá studiem vlivu atorvastatinu a solubilního endoglinu na markery endotelové dysfunkce *in vitro* u primární buněčné kultury HUVEC a u buněčné linie HEK293T. Některé experimenty zahrnuté v této disertační práci byly provedeny v rámci spolupráce v laboratoři prof. Carmela Bernabeu ve výzkumném centru Centro de Investigaciones Biológicas v Madridu.

Endotelová dysfunkce je poškození funkce endotelu, kdy je narušena rovnováha mezi vazokonstrikčními a vasodilatačními mechanismy, dochází ke zvýšené agregaci trombocytů, adhezi leukocytů a zvýšené permeabilitě endotelu. Všechny tyto děje představují první krok v rozvoji aterosklerózy a jsou součástí dalších kardiovaskulárních onemocnění, jako je např. preeklampsie, diabetes mellitus typu 2. Důležitou roli při těchto onemocněních hraje endoglin, eNOS a solubilní endoglin (sEng), který je pomocí MMP – 14 odštěpován z membránového endoglinu a uvolňován do cirkulace. Bylo zjištěno, že sEng je schopen zvyšovat expresi buněčných adhezních molekul a modifikovat TGF- $\beta$  signalizaci v endotelu.

Významnou úlohu v terapii výše zmíněných onemocnění hrají statiny, které svými účinky snižují LDL cholesterol a mírně zvyšují HDL cholesterol a snižují i riziko vzniku koronární příhody.

V této disertační práci jsme se zaměřili na to, zda atorvastatin a vysoké hladiny sEng způsobí změny v expresi markerů endotelové dysfunkce, zánětu, oxidačního stresu, a zda sEng působí změny v TGF- $\beta$  signalizaci *in vitro* u primární buněčné kultury HUVEC a buněčné linie HEK293T. K ovlivnění buněk jsme použili lidský rekombinantní endoglin.

Ateroskleróza je považována za zánětlivé onemocnění, a abychom napodobili zánětlivé podmínky, použili jsme pro ovlivnění buněk tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  cytokin (TNF $\alpha$ ), což mělo za následek snížení exprese endoglinu i eNOS. Preventivní podávání atorvastatinu, před podáváním TNF $\alpha$  endotelovým buňkám HUVEC, zabránilo poklesu exprese endoglinu a eNOS.

Dále jsme zjistili, že ovlivnění buněk 40 ng/ml a 500 ng/ml sEng má za následek nárůst transkripční aktivity genů pro NF $\kappa$ B a IL-6, významných prozánětlivých markerů, stejně tak došlo ke zvýšení exprese těchto markerů na proteinové úrovni. Proto se domníváme, že vysoké hladiny sEng mohou přispívat ke vzniku zánětu/endotelové dysfunkci u lidských endotelových buněk *in vitro*. Po ovlivnění buněk sEng došlo i k významnému zvýšení exprese membránového endoglinu. Ovlivnění buněk sEng však nemělo významný vliv na změnu exprese markerů oxidačního stresu HO-1, p22-PHOX, adhezních molekul VCAM-1, ICAM-1, markerů zánětu MCP-1, COX-2, markerů funkce/dysfunkce endotelu eNOS, peNOS a vybraných členů TGF- $\beta$  signalizační kaskády ALK-1, ALK-5, TGF $\beta$ RII, BMPR-2, PAI-1, BMP-2, BMP-4, pSmad1/5. Překvapivým výsledkem bylo zvýšení exprese fosforylované formy proteinu Smad2/3 bez významného vlivu na PAI-1, což může znamenat, že po ovlivnění buněk sEng nedochází k úplné aktivaci této signalizační kaskády. Dalším překvapivým výsledkem byla snížená exprese ID-1.

Závěrem lze tedy konstatovat, že pozitivní působení atorvastatinu na signalizaci endoglinu a eNOS je zajímavým výsledkem našich experimentů, které by mohly být podkladem pro klinické studie. Výsledky této disertační práce také poukazují na to, že ovlivnění buněk sEng má za následek aktivaci prozánětlivých markerů NF $\kappa$ B a IL-6, jejichž zvýšená exprese může přispívat ke vzniku endotelové dysfunkce, jakožto počátečnímu kroku rozvoje aterosklerózy. Je však potřeba zjistit přesný mechanismus aktivace těchto markerů a jejich následků.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

**Candidate:** Mgr. Michala Vařejčková

**Supervisor:** prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

**Title of Doctoral Thesis:** Monitoring the effect of statins and soluble endoglin on markers of endothelial dysfunction in selected cell line and culture.

This doctoral thesis studied the effect of soluble endoglin on endothelial dysfunction markers *in vitro* in primary cell culture HUVEC and cell line HEK293T. Some experiments included in this thesis were made in cooperation in the laboratory of prof. Carmelo Bernabeu in the research center Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) in Madrid.

Endothelial dysfunction is damage of endothelium when the balance between vasoconstrictor and vasodilatory mechanisms is disrupted, it's leading to platelet aggregation, leukocyte adhesion and increased permeability of the endothelium. All these events represent the first step in the development of atherosclerosis and they are part of other cardiovascular diseases such as preeclampsia, type 2 diabetes mellitus, familial hypercholesterolemia. An important role in these diseases play endoglin, eNOS and soluble endoglin (sEng), which is cleaved by MMP- 14 from the membrane endoglin and released into the circulation. It was found that sEng is able to increase expression of cellular adhesion molecules and modify the TGF- $\beta$  signaling in the endothelium.

Statins, which reduce LDL cholesterol and slightly increase HDL cholesterol and reduce the risk of a coronary event, play a significant role in the treatment of the above-mentioned diseases.

In this thesis, we focused on whether atorvastatin and high levels of sEng cause changes in the expression of markers of endothelial dysfunction, inflammation, oxidative stress, and whether sEng causes changes in TGF- $\beta$  signaling *in vitro* in HUVEC and HEK293T. In our experiments, we worked with human recombinant endoglin.

Atherosclerosis is considered as an inflammatory disease. To mimic the inflammatory conditions we used TNF $\alpha$  cytokine for the treatment of cells, this resulted in decreased expression of both endoglin and eNOS. Preventive administration of atorvastatin, prior to administration of TNF $\alpha$  to HUVEC, prevented the decrease in endoglin and eNOS expression.

Furthermore, we found out that 40 ng/mL and 500 ng/mL of sEng increased a transcriptional activity of the NF $\kappa$ B and IL-6, that are major proinflammatory markers. We found out increased expression of these markers on the protein level. Therefore, we hypothesized that high levels of sEng can contribute to inflammation/endothelial dysfunction *in vitro* in human endothelial cells. The treatment with sEng induced significant increase in expression of the membrane endoglin. Moreover, we didn't find any significant effect in expression of markers of oxidative stress HO-1, p22-PHOX, adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, inflammatory markers MCP-1, COX-2, markers of the endothelial function/dysfunction eNOS (Ser<sup>1177</sup>) phosphorylation, and some of members of the TGF- $\beta$  signaling cascade ALK-1, ALK-5, TGF $\beta$ RII, BMPR2, PAI-1, BMP-2, BMP-4, pSmad1/5. Surprisingly, sEng treatment also resulted in an increased expression of the phosphorylated Smad2/3, but without any significant effects on PAI-1, suggesting that this pathway is not fully activated after sEng treatment. Another surprising result was decreased expression ID1.

In conclusion, the positive effect of atorvastatin on endoglin and eNOS signaling is an interesting result of our experiments, which could be the basis for clinical trials. We further showed that sEng treatment results in an activation of the proinflammatory markers NF $\kappa$ B and IL-6. Increased expression of this markers can contribute to the development of endothelial dysfunction, as an initial step in the development of atherosclerosis. The precise mechanism of this activation and its consequences remains to be elucidated.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	13
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1	Endotel a poruchy funkce endotelu.....	15
2.1.1	Význam NO a eNOS v patogenezi endotelové dysfunkce.....	16
2.1.2	Význam buněčných adhezních molekul ve vztahu k endotelové dysfunkci .....	19
2.2	TGF- $\beta$ signalizační kaskáda.....	21
2.2.1	Signální dráha ALK a Smad .....	23
2.3	Tkáňový endoglin.....	25
2.3.1	Struktura.....	25
2.3.2	Exprese endoglinu u lidí a zvířat.....	26
2.3.3	Endoglin a NO.....	27
2.4	Solubilní endoglin .....	28
2.4.1	Vznik a struktura .....	28
2.4.2	Solubilní endoglin, hypercholesterolemie a endotelová dysfunkce .....	29
2.4.3	Solubilní endoglin jako možný induktor endotelové dysfunkce v různých částech cévního řečiště .....	31
2.4.4	Předpokládaný mechanismus působení solubilního endoglinu v endotelu.....	32
2.5	Statiny .....	33
2.5.1	Rozdělení, farmakokinetika, používané statiny .....	34
2.5.2	Vliv statinů na endotel .....	36
2.5.3	Statiny a ateroskleróza .....	36
2.5.4	Statiny a endoglin.....	37
2.6	Modely pro <i>in vitro</i> studium endotelu.....	37
2.6.1	HAEC.....	37



2.6.2	HUVEC .....	38
2.6.3	HEK293T .....	38
3	CÍLE STUDIE .....	39
4	MATERIÁL A METODY .....	40
4.1	Buněčné kultury .....	40
4.2	Western blot .....	42
4.2.1	Použité primární a sekundární protilátky .....	43
4.3	Kvantitativní real-time PCR.....	44
4.3.1	Použité primery .....	45
4.4	Imunofluorescenční průtoková cytometrie .....	46
4.5	Luminex analýza .....	47
4.6	ELISA .....	48
4.7	Měření luciferázové aktivity .....	49
4.8	Statistické hodnocení .....	50
5	VÝSLEDKY.....	51
5.1	Zánět snižuje expresi membránového endoglinu a eNOS .....	51
5.2	Atorvastatin zvyšuje expresi membránového endoglinu a eNOS a brání poklesu exprese membránového endoglinu a eNOS u buněk ovlivněných TNF $\alpha$ ...	53
5.3	Společný efekt atorvastatinu a TNF $\alpha$ na hladiny solubilního endoglinu .....	55
5.4	Vliv rekombinantního lidského endoglinu na markery zánětu a adhezní molekuly.....	57
5.5	Vliv rekombinantního lidského endoglinu na markery oxidačního stresu.....	66
5.6	Vliv rekombinantního lidského endoglinu na expresi eNOS.....	69
5.7	Vliv rekombinantního lidského endoglinu na membránový endoglin.....	72
5.8	Vliv rekombinantního lidského endoglinu na TGF- $\beta$ signalizaci .....	75
6	DISKUSE .....	87
7	ZÁVĚRY .....	93
8	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI .....	94

9	PREZENTACE NA KONFERENCÍCH.....	96
10	POUŽITÁ LITERATURA.....	98

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

18S ( <i>18S</i> )	endogenní kontrola, v závorce označení pro příslušný gen
Akt	serin/threonin kináza
ALK-1 ( <i>ACVRL1</i> )	aktivin receptor-like kináza 1, v závorce označení pro příslušný gen
ALK-5 ( <i>TGFBRI</i> )	aktivin receptor-like kináza 5, v závorce označení pro příslušný gen
Ang II	angiotenzin II
ApoE	apolipoprotein E
ATV	atorvastatin
BAEC	endotelové buňky prasečí aorty
BMP-2 ( <i>BMP2</i> )	kostní růstový protein 2
BMP-4 ( <i>BMP4</i> )	kostní růstový protein 4, v závorce označení pro příslušný gen
BMPR-2 ( <i>BMPR2</i> )	receptor pro kostní růstový protein 2, v závorce označení pro příslušný gen
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
COX-2 ( <i>PTGS2</i> )	cyklooxygenáza 2, v závorce označení pro příslušný gen
DM 2	diabetes mellitus typu 2
DMSO	dimethylsulfoxid
Eng ( <i>ENG</i> )	endoglin, v závorce označení pro příslušný gen
eNOS ( <i>NOS3</i> )	endotelová NO syntáza, v závorce označení pro příslušný gen
FBS	fetální hovězí sérum
GAPDH ( <i>GAPDH</i> )	glyceraldehyd fosfát dehydrogenáza, v závorce označení pro příslušný gen
HAEC	endotelové buňky lidské aorty
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HEK293T	lidská embryonální linie ledvinových buněk
HMG-CoA	hydroxy-methylglutaryl-koenzym A
HO-1 ( <i>HMOX1</i> )	hemoxygenáza 1, v závorce označení pro příslušný gen
Hsp90	protein teplotního šoku 90
HUVEC	endotelové buňky lidské pupečnickové žíly
ICAM-1 ( <i>ICAM1</i> )	mezibuněčná adhezní molekula, v závorce označení pro příslušný gen
ID-1 ( <i>IDI</i> )	inhibitor DNA vazby, v závorce označení pro příslušný gen
IL-6 ( <i>IL6</i> )	interleukin 6, v závorce označení pro příslušný gen

iNOS	inducibilní NO syntáza
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LDLr	LDL receptor
MCP-1 ( <i>CCL2</i> )	monocytární chemotaktický protein 1, v závorce označení pro příslušný gen
MMP	proteolytický enzym, matrix metaloproteáza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NFκB ( <i>NFKB3</i> )	nukleární transkripční faktor kappa B, v závorce označení pro příslušný gen
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
oxLDL	oxidovaný LDL
p22-PHOX ( <i>CYBA</i> )	podjednotka NADPH oxidázy, v závorce označení pro příslušný gen
PAI-1 ( <i>SERPINE1</i> )	inhibitor plazminogenového aktivátoru, v závorce označení pro příslušný gen
PBS	fosfátový pufr
PI3	phosphatidylinositol 3-kináza
pSmad	forsforylovaná forma Smad
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
ROS	reaktivní formy kyslíku
sEng	solubilní endoglin
Smad	protein regulující funkci TGF-β
TGF-β	transformující růstový faktor beta
TGF-βRI	receptor typu I pro transformující růstový faktor beta
TGFβRII ( <i>TGFBR2</i> )	receptor typu II pro transformující růstový faktor beta, v závorce označení pro příslušný gen
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
VCAM-1 ( <i>VCAMI</i> )	adhezní molekula cévních buněk 1, v závorce označení pro příslušný gen
VEGF	růstový faktor endotelu

# 1 ÚVOD

Ateroskleróza je chronické zánětlivé komplexní onemocnění, které je jednou z nejčastějších příčin úmrtí na celém světě. Během tohoto zánětlivého procesu dochází ke kumulaci lipidů, především ve formě LDL lipoproteinů/cholesterolu (low density lipoprotein, LDL) v cévní stěně a k rozvoji kardiovaskulárních příhod, jakými jsou např. infarkt myokardu nebo cévní mozková příhoda. Lékem volby v terapii těchto onemocnění jsou léčiva ze skupiny inhibitorů 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy – statiny. Účinky statinů spočívají především ve snižování hladiny LDL cholesterolu, mírně zvyšují i HDL lipoproteiny/cholesterol (high density lipoprotein, HDL). Mezi další důležité účinky statinů patří tzv. pleiotropní neboli nelipidové účinky, jako jsou např. účinky imunomodulační, neuroprotektivní, antidiabetické, antiproliferační, protizánětlivé a antitrombotické (Bedi et al., 2016).

Recentní práce ukazují, že v procesu endotelové dysfunkce a aterosklerózy sehrává významnou roli tkáňový (membránový) endoglin (Eng), člen TGF- $\beta$  signalizační kaskády. K jeho expresi dochází především v endotelových buňkách a v buňkách hladké svaloviny cév. Bylo zjištěno, že exprese endoglinu je spojena i s řadou jiných patologických onemocnění, např. preeklampsie nebo hereditární hemoragická teleangiektázie (HHT), což je genetické cévní onemocnění charakteristické např. krvácením z nosu (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Významnou úlohu v těchto patologiích sehrává také solubilní endoglin (sEng), což je extracelulární část tkáňového endoglinu, která je pomocí matrix metaloproteinázy – 14 (MMP-14) štípána a uvolňována do cirkulace *in vivo* nebo do média při kultivaci buněk *in vitro* (Venkatesha et al., 2006).

Bylo publikováno velké množství studií zabývajících se vztahem sEng a hypercholesterolémií, familiární hypercholesterolémií, aterosklerózou, diabetem mellitem typu II (DM 2), hypertenzí, kde hladiny sEng korelují se závažností těchto onemocnění (Blann et al., 1996; Venkatesha et al., 2006; Blaha et al., 2008) a právě tyto studie nás přiměly k tomu provést několik experimentů, a zjistit tak mechanismus, jakým sEng zasahuje do TGF- $\beta$  signalizace, zda působí na markery zánětu, oxidačního stresu a jakou úlohu při těchto procesech sehrává membránový Eng.

Nutno zmínit, že důležitou roli v terapii výše zmíněných onemocnění sehrávají statiny, které svými účinky snižují hladinu cholesterolu, mají pozitivní vliv na funkci

endotelu a produkci NO, který je produkován endotelovou NO syntázou (eNOS). NO má antihypertenzní a antitrombotické účinky a byla popsána souvislost mezi endoglinem a eNOS. Statiny jsou tak významnými léčivy v prevenci a terapii kardiovaskulárních onemocnění.

K pochopení detailního mechanismu působení statinů, především atorvastatinu, a sEng jsme použili metodiky, jako jsou stanovení transkripční aktivity pomocí luciferázy, kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR), Western blot (WB) analýzu, průtokovou cytometrii, ELISA a Luminex analýzu.

Všechny experimenty zahrnuté v této disertační práci byly provedeny na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Katedře biologických a lékařských věd jako součást dlouhodobého výzkumu aterosklerózy pod vedením prof. PharmDr. Petra Nachtigala, Ph.D. a RNDr. Ivany Němečkové, Ph.D. a ve spolupráci s prof. Carmelem Bernabeu a Dr. Eunate Maria Gallardo Vara z výzkumného centra Centro de Investigaciones Biologicas (CIB) v Madridu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Endotel a poruchy funkce endotelu

Cévní endotel je hlavním regulátorem homeostázy a udržuje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí v cévním řečišti, inhibicí a stimulací proliferace a migrace buněk hladké svaloviny, dále mezi tvorbou trombů a fibrinolýzou (Luscher and Barton, 1997; Kinlay et al., 2001).

Endotel reguluje cévní tonus a vykazuje antikoagulační, antiagregační a fibrinolytické vlastnosti. Endotelové buňky produkují celou škálu faktorů, které se na regulaci cévního tonu podílejí. Hlavním vazodilatátorem je oxid dusnatý (NO), dále bradykinin a prostacyklin (Drexler, 1998). Prostacyklin spolu s NO inhibují agregaci destiček (Luscher and Barton, 1997). Bradykinin stimuluje uvolňování NO a prostacyklinu (Drexler, 1998). Dále endotel produkuje vazokonstrikčně působící látky, jako např. endotelin-1 (ET-1) a angiotenzin II (Ang II), které podporují proliferaci buněk hladké svaloviny a přispívají tak k tvorbě aterosklerotického plátu (Drexler, 1998). Mezi vazokonstrikčně působící látky patří také reaktivní formy kyslíku (ROS), např. superoxidový radikál ( $O_2^-$ ) (Endemann and Schiffrin, 2004). Endotel uvolňuje i substance, které jsou významnými modulátory zánětlivých procesů a endotelové dysfunkce, např. buněčné adhezní molekuly (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), cévní adhezní molekulu (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), E-selektin, nukleární transkripční faktor (nuclear factor NF-kappa-B (NFκB)), monocytární chemotaktický protein 1 (MCP-1) (Bhaskar et al., 2016), cyklooxygenázu-1 (COX-1), cyklooxygenázu-2 (COX-2) (Feletou et al., 2011).

Pokud je narušena rovnováha mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními mechanismy, dochází ke vzniku endotelové dysfunkce a k poškození funkce cévní stěny. Endotelová dysfunkce tedy znamená poškození funkce endotelu, které má za následek sníženou vazodilataci, zvýšení agregace trombocytů, zvýšení permeability endotelu, zvýšenou adhezi leukocytů a je považována za počáteční krok při rozvoji aterosklerózy (Davignon and Ganz, 2004).

Bylo popsáno, že aktivace exprese prozánětlivých molekul, jakými jsou VCAM-1 a ICAM-1 jsou konečným důsledkem aktivace NFκB signalizace (Xia et al., 2001; Brasier, 2010). NFκB je transkripční faktor, který hraje roli v mnoha biologických

procesech, jako je např. zánět, buněčný růst, diferenciaci, imunita a apoptóza (Karin and Lin, 2002; Hoesel and Schmid, 2013). Bylo prokázáno, že na expresi NFκB a NFκB signalizaci má vliv i transformující faktor beta (TGF-β). NFκB spolupracuje s mnoha dalšími signálními molekulami, signálními drahami a transkripčními faktory, je také důležitým regulátorem genu pro interleukin-6 (IL-6), který má pro NFκB vazebná místa (Libermann and Baltimore, 1990). IL-6 je cytokin s mnoha funkcemi, který hraje zásadní roli v procesu zánětu a imunitní odpovědi (Simpson et al., 1997). Během zánětu uvolňují buňky cévní stěny IL-6 do cirkulace. Zdá se tedy, že NFκB/IL-6 signalizace je důležitá pro aktivaci zánětu cévní stěny (Brasier, 2010).

Zjistilo se, že během zánětu dochází i ke zvýšené expresi hemoxygenázy-1 (HO-1), enzymu, který je za normálních podmínek v malé míře exprimován ve většině tkání a orgánů. Bylo popsáno, že zvýšená exprese HO-1 je ochrannou reakcí buňky na oxidační stres a zánět (Ryter et al., 2006). Recentní práce ukazují, že geneticky způsobený deficit HO-1 u člověka má za následek zvýšenou náchylnost k rozvoji chronického zánětu a aterosklerózy (Kawashima et al., 2002; Radhakrishnan et al., 2011; Wu et al., 2011).

Další molekulou, jejíž exprese je spojena s reakcí na oxidační stres je p22-PHOX (Calo et al., 2004). Tento enzym je základní součástí membránově vázané NADPH oxidázy fagocytů, který využívá nikotinamidadeninukleotid (NADH) nebo nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADPH) k produkci ROS (Qiu et al., 2015). p22-PHOX je exprimován např. i v endotelových buňkách, buňkách hladké svaloviny cév, makrofázích a fibroblastech (Yokoyama et al., 2000). Vysoká exprese tohoto proteinu byla pozorována i v aterosklerotických koronárních artériích (Ushio-Fukai et al., 1996; Azumi et al., 1999; Xu et al., 2014).

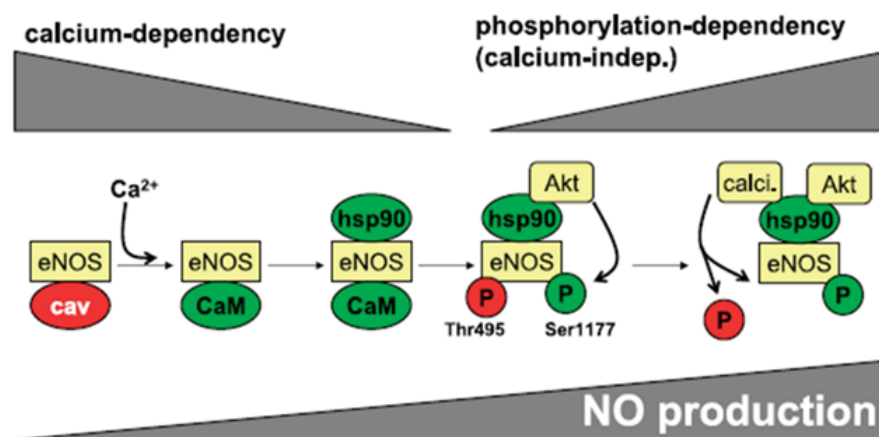
### **2.1.1 Význam NO a eNOS v patogenezi endotelové dysfunkce**

Endotelová NO syntáza je nejvíce exprimována v endotelových buňkách, nicméně tento isoenzym byl detekovaný i v kardiomyocytech, krevních destičkách, v některých nervových buňkách mozku, trofoblastech lidské placenty a buňkách epitelu ledvin (Forstermann et al., 1994).

eNOS je součástí kaveol v buněčných membránách a pomocí proteinu kaveolinu 1 (cav-1) je udržována v inaktivním stavu v komplexu s kalmodulinem (CaM).



Zvýšení hladiny vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) má za následek vazbu CaM k eNOS a její aktivaci. Další protein, který může interagovat s eNOS a regulovat její aktivitu je např. heat shock protein 90 (hsp90). K aktivaci eNOS může ale docházet i bez závislosti na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ . Takovým příkladem aktivace je fosforylace eNOS, kterou způsobuje např. růstový faktor endotelu (VEGF), estrogen, bradykinin, inzulin nebo shear stress (tečná síla tekoucí krve cévní stěnou). Důležitým místem fosforylace eNOS u člověka jsou aminokyseliny serin – Ser1177 a treonin – Thr495. Tuto fosforylaci zprostředkovává serin/threonin kináza Akt. Aktivace Akt má za následek aktivaci signální dráhy, jejíž součástí je stimulace PI3-kinázy. A právě prostřednictvím této signalizace mohou např. statiny zvyšovat fosforylaci eNOS a tudíž působit protektivně ve vztahu k endotelové dysfunkci (Brouet et al., 2001; Wolfrum et al., 2003). Nutno zmínit, že v klidových endotelových buňkách k fosforylaci Ser1177 nedochází. Fosforylace na Thr495 v lidských endotelových buňkách je konstitutivní. Thr495 je místem negativní regulace a její fosforylace je spojena se snížením aktivity eNOS (Forstermann and Sessa, 2012).

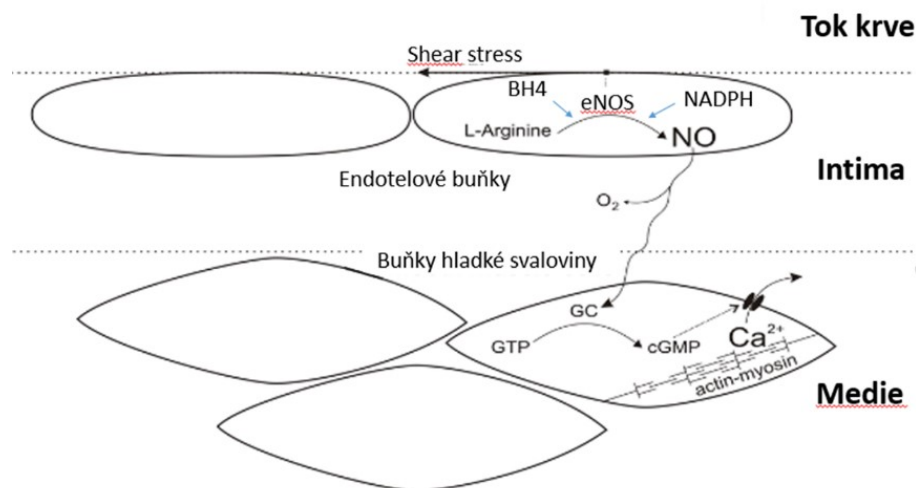


**Obrázek 1:** Aktivace eNOS závislá na  $\text{Ca}^{2+}$ a na fosforylaci. (Balligand et al., 2009). cav-caveolin, CaM-calmodulin, hsp90-heat shock protein 90, Akt-serin/threonin kináza, P-fosforylace.

Aktivace eNOS má za následek produkci NO, který difúzí přestupuje do buněk hladké svaloviny, kde způsobí relaxaci aktivací guanylát cyklázy (GC) a zvýšení cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) (Davignon and Ganz, 2004). Bylo zjištěno, že exprese eNOS je ovlivněna také transformujícím růstovým faktorem- $\beta$ , který aktivuje Smad2, což má za následek indukci eNOS v endotelových buňkách (Saura et al., 2002).

Oxid dusnatý je nejmenší známá signální molekula, která je nepřetržitě produkována endotelovými buňkami a je tvořena z L-argininu pomocí eNOS (Forstermann and Sessa, 2012). Tato reakce vyžaduje řadu kofaktorů, jako je např. tetrahydrobiopterin (BH4) a NADPH. BH4 je důležitým kofaktorem pro syntézu NO. Pokud chybí BH4, dochází k tzv. "uncoupling" eNOS a vzniká  $O_2^-$  místo NO což vede k indukci tzv. nitračního stresu. Zdrojem  $O_2^-$  v cévách je ale také NADPH oxidáza, jejíž stimulaci může způsobit i Ang II (Touyz and Schiffrin, 1999; Touyz et al., 2002). Superoxidové radikály reagují s NO za vzniku peroxynitritu (Koppenol et al., 1992), který je důležitým mediátorem oxidace LDL částic, což dokazuje jeho pro-aterogenní účinek (Griendling and FitzGerald, 2003). Peroxynitrit má také za následek degradaci BH4 (Milstien and Katusic, 1999), což opět vede k "uncoupling", jak již bylo zmíněno výše.

Bylo popsáno, že NO blokuje adhezi leukocytů k cévní stěně, a pokud NO chybí, dochází k rozvoji aterosklerózy. NO je také silným inhibitorem agregace trombocytů a brání tvorbě fibrózních plátů v intimě cév (Forstermann and Munzel, 2006). NO také brání vzniku oxidované formy LDL (oxLDL) cholesterolu. Oxidace LDL částic je považována za jeden z hlavních kroků v iniciaci aterosklerózy (Steinberg and Witztum, 2002). Výskyt oxLDL částic v plasmě a makrofázích koreluje se závažností onemocnění nazvaného akutní koronární syndrom (Ehara et al., 2001). Pokud je narušena produkce nebo aktivita NO, dochází k vazokonstrikci, agregaci destiček, proliferaci a migraci buněk hladké svaloviny cév, adhezi leukocytů a oxidačnímu stresu, což jsou faktory, které přispívají ke vzniku aterosklerózy (Endres et al., 1998).



**Obrázek 2: Produkce NO endotelovými buňkami.** (Převzato a upraveno z [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/50/EDRF\\_regulation\\_diagram.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/50/EDRF_regulation_diagram.png), 2.3.2017)

## 2.1.2 Význam buněčných adhezních molekul ve vztahu k endotelové dysfunkci

Adheze je životně důležitou vlastností buněk, vytváří vhodné prostředí pro buněčný růst, diferenciaci a migraci. Přílnavost buněk jedna k druhé, k jejich extracelulární matrix a k povrchu endotelu je zprostředkována nejružnějšími membránovými proteiny, které se souhrnně označují jako buněčné adhezní molekuly. Tyto adhezní molekuly jsou exprimovány na buněčném povrchu všech tkání. Fungují jako receptory, které spouští vnitrobuněčné signální dráhy a účastní se kontroly základních životních procesů, jakými jsou embryogeneze, migrace, buněčný růst, diferenciaci, buněčná smrt a zajišťují kontakt buněk s jejich okolím (Mareckova et al., 1999; Rojas and Ahmed, 1999; Golias et al., 2007).

Adhezní molekuly hrají zásadní roli v procesu zánětu i při onemocněních kardiovaskulárního a kožního systému. Jak je již známo, některé poruchy kardiovaskulárního systému jsou spojeny s poškozením struktury a funkce endotelových buněk a následně vznikem endotelové dysfunkce (Jang et al., 1994), ta je prvotním dějem vzniku aterosklerózy. Endotelová dysfunkce hraje roli i při vzniku ischemické choroby srdeční (ICHS), zánětu myokardu a hypertrofie myokardu (Hope and Meredith, 2003; Jaitovich and Jaim Etcheverry, 2004).

Endotel hraje klíčovou roli v regulaci zánětlivé odpovědi a adhezní molekuly jsou exprimovány na povrchu endotelových buněk. Za normálních podmínek zprostředkovávají mezibuněčné interakce a regulují permeabilitu cév. Ke změně jejich exprese však dochází během zánětu, kdy adhezní molekuly zprostředkovávají migraci leukocytů z krevního řečiště směrem k zánětlivému ložisku (Gonzalez-Amaro et al., 1998; Jaitovich and Jaim Etcheverry, 2004; Golias et al., 2007). Buněčné adhezní molekuly hrají zásadní roli v procesu aterogeneze. Expresí molekul jakými jsou P-selektin, VCAM-1, ICAM-1 je charakteristickým znakem zánětu endotelu nebo endotelové dysfunkce (Galkina and Ley, 2007).

Mezi nejvýznamnější třídy buněčných adhezních molekul řadíme mj. selektiny, integriny a adhezní molekuly ze skupiny imunoglobulinů.

#### ➤ **Selektiny**

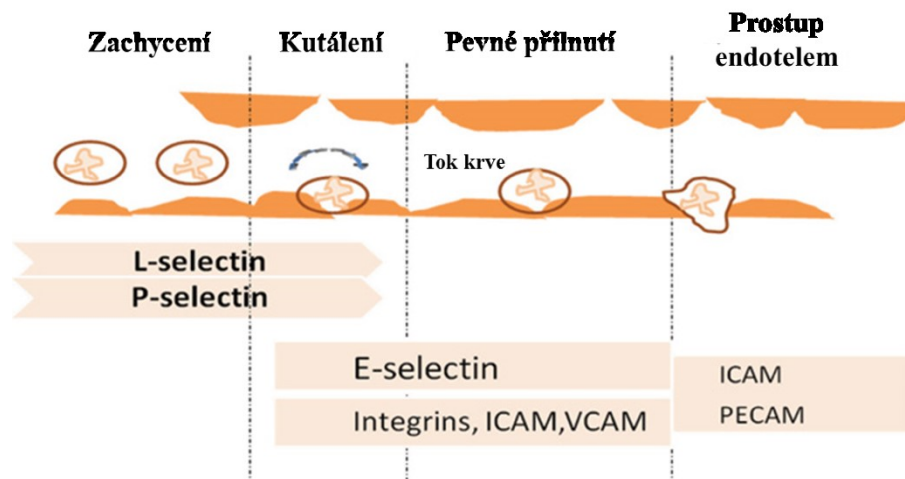
Selektiny zprostředkovávají počáteční fázi interakce mezi leukocyty a endotelovými buňkami, která se označuje jako “kutálení“ leukocytů, ta je následována adhezí leukocytů a jejich prostupem přes endotel. Do této třídy adhezních molekul patří L-selektin (exprimovaný převážně na leukocytech), E- a P-selektin (exprimovaný převážně na endotelových buňkách během akutního i chronického zánětu, po stimulaci zánětlivých cytokinů jako je např. TNF $\alpha$  (McEver, 2002)).

#### ➤ **Integriny**

Integriny jsou membránové receptory složené z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek, které se vážou na extracelulární matrix nebo vytváří vazbu s jinými buňkami, regulují interakci leukocytů s endotelovými buňkami, účastní se migrace a fagocytózy (Galkina and Ley, 2007).

#### ➤ **Adhezní molekuly**

Mezi adhezní molekuly ze skupiny imunoglobulinů patří např. molekuly ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 (adhezní molekula krevních destiček). Jedná se o transmembránové proteiny, které zajišťují pevné přilnutí leukocytů k endotelu. Jsou exprimovány na povrchu endotelových buněk, makrofágů a hladkých svalových buněk (Jang et al., 1994; Galkina and Ley, 2007). Zvýšená exprese těchto molekul je ovlivněna faktory, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy, jako je např. oxLDL a DM 2 (Libby, 2002), ale i působením zánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$  a interleukin-1 (IL-1)) (Golias et al., 2007).



*Obrázek 3: Schéma prostupu leukocytu přes endotel. Převzato a upraveno. (Fotis et al., 2012).*

## 2.2 TGF- $\beta$ signální kaskáda

Členové rodiny TGF- $\beta$  jsou strukturálně a funkčně příbuzní a podílí se na regulaci proliferace, diferenciace, migrace, adhezi buněk a také na organizaci a programování buněčné smrti (Massague, 1998; Lebrin et al., 2005).

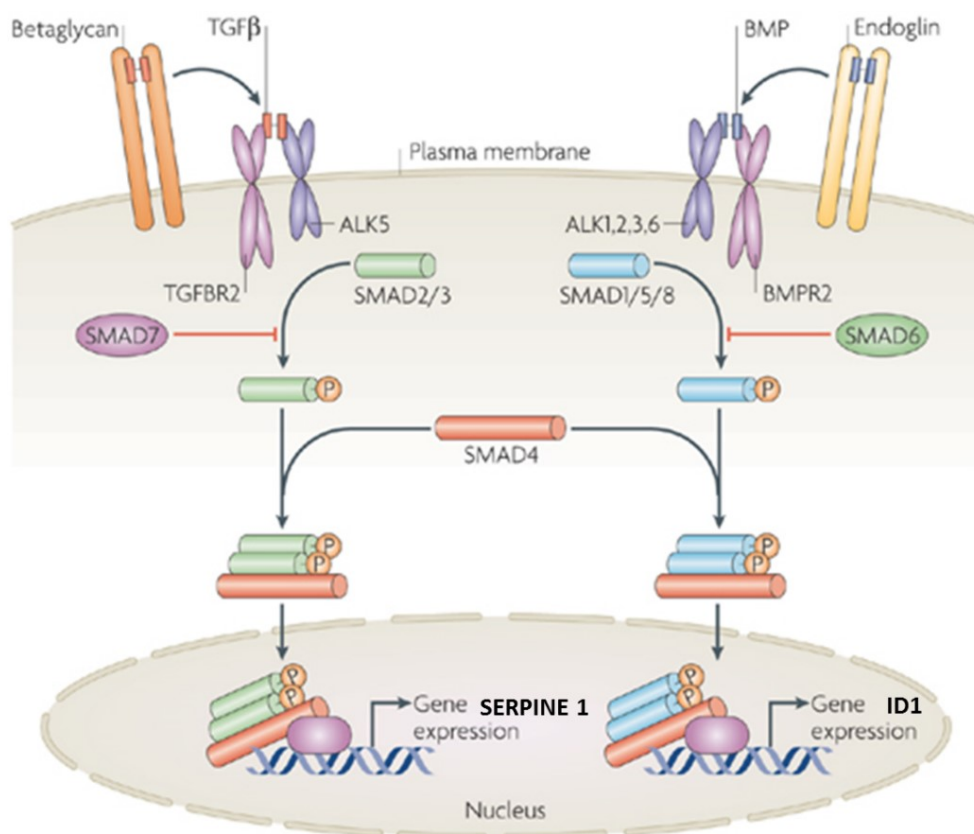
U savců byly objeveny tři isoformy TGF- $\beta$  - TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, které jsou kódovány třemi různými geny. *In vitro* všechny tři isoformy vážou a aktivují ty samé TGF- $\beta$  receptory, aktivují stejné signální dráhy, což má za následek stejné chování u všech buněk. Nicméně u myši vypnutím genů kódujících jednotlivé isoformy dochází k výrazným rozdílům v jejich fenotypu (Sheppard, 2006). Experimentální studie u TGF- $\beta$  deficientních myši dokazují důležitost těchto proteinů. Např. cílené poškození genu kódujícího TGF- $\beta$ 1 cytokin má za následek poškození krevního systému a narušení tvorby a vývoje cévního systému a během deseti dnů intrauterinního vývoje dochází ke smrti embrya. Nutno podotknout, že embrya, která přežijí, nežijí déle než tři týdny a umírají následkem rozsáhlé infekce (Shull et al., 1992). TGF- $\beta$ 2 deficientní myši umírají během perinatálního vývoje následkem nedostatečnosti plic a srdce a díky výskytu dalších abnormalit urogenitálního, sluchového, nervového a kosterního systému (Sanford et al., 1997). Následkem TGF- $\beta$ 3 deficiencie byl u myšičího modelu pozorován rozštěp patra se 100% penetrací a mláďata umírala bezprostředně po narození z důvodu neschopnosti sání (Proetzel et al., 1995).

Bylo zjištěno, že TGF- $\beta$  cytokiny jsou uvolňovány při imunitní odpovědi a detekovány v exsudátu rány, zvláště pak během zánětu a při regeneraci tkáně. Všechny tři isoformy se podílí na hojení rány, TGF- $\beta$ 1 hraje v tomto procesu významnou roli. Naproti tomu TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3 mají klíčovou úlohu při vývoji embrya a při hojení jizvy (Tandon et al., 2010). Největší množství TGF- $\beta$ 1 cytokinu najdeme v cévní stěně, zatímco TGF- $\beta$ 2 zde přítomen není a TGF- $\beta$ 3 je zde jen v nepatrném množství. TGF- $\beta$ 1 je účinný regulátor vývoje cév a cévní remodelace a v regulaci funkce endotelových buněk, buněk hladké svaloviny, makrofágů a T-buněk (Bobik, 2006).

TGF- $\beta$ 1 cytokin hraje významnou roli v procesu aterosklerózy a jeho zvýšenou expresi lze pozorovat v aterosklerotických plátech jak u člověka, tak u myšího modelu aterosklerózy (Mallat et al., 2001). Navzdory kontroverzním přístupům k úloze TGF- $\beta$ 1 cytokinu, byla publikována studie s endotelovými buňkami HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) a BAEC (Bovine Aortic Endothelial Cells), která dokazuje zvýšení exprese eNOS mRNA v přítomnosti tohoto cytokinu (Inoue et al., 1995), což lze označit jako protektivní úlohu TGF- $\beta$ 1 na cévní endotel.

TGF- $\beta$  cytokiny jsou vytvářeny jako neaktivní dimerní prekurzory bez jakékoliv biologické aktivity, které jsou postupně aktivovány proteázami nebo trombospondinem. Aktivované cytokiny pak vykonávají své účinky prostřednictvím receptorů typu I a II se serin/threonin kinázovou aktivitou (Grainger, 2004; Lebrin et al., 2005). V TGF- $\beta$  signalizaci existuje pět typů TGF- $\beta$  II receptoru (TGFBR2), a to ActR-IIA, ActR-IIB, BMPRII, AMHR-II a TGF- $\beta$ RII a sedm typů TGF- $\beta$  I receptoru (TGF- $\beta$ RI), a to ALK1 – ALK7 (Massague and Gomis, 2006). Po navázání ligandu TGF- $\beta$ RII fosforyluje a aktivuje TGF- $\beta$ RI, a pomocí Smad proteinů (transkripčních faktorů) je signál veden do jádra buněk, kde dochází k regulaci genů, včetně těch, které hrají důležitou roli v procesu aterosklerózy.

Smad proteiny jsou vnitrobuněčnými posly pro TGF- $\beta$  cytokiny a lze je rozdělit do tří skupin: R-Smad (regulující) – Smad1, 2, 3, 5, 8, Co-Smad (mediátorové) – Smad4 a I-Smad (inhibující) – Smad6, 7 (Lebrin et al., 2005).



**Obrázek 4: TGF- $\beta$  signalizace.** Převzato a upraveno. (ten Dijke and Arthur, 2007). Členové TGF- $\beta$  signalizace jsou rozděleni do dvou hlavních intracelulárních signalizačních drah podle mediátorů Smad proteinů – Smad2/3 a Smad1/5/8. Členové TGF- $\beta$  signalizace se vážou ke specifickým serin/threonin kinázovým receptorům typu I a II. Signály TGF- $\beta$  jsou vedeny přes TGFBR2 a ALK5 (někdy označovaný jako TGFBR1) a signály BMP proteinů jsou vedeny přes BMP receptory typu II (BMPR2) a ALK1,2,3,6. Pomocné receptory betaglykan a endoglin mohou modulovat signalizaci přes receptory typu I a II. Aktivovaný receptor typu I indukuje fosforylaci R-Smad. Ve většině typů buněk TGF- $\beta$  indukuje Smad2/3 fosforylaci a BMP indukuje Smad1/5/8 fosforylaci. Aktivované (fosforylované) R-Smad vytváří komplex se Smad4, který je přenesen do jádra a dochází k regulaci exprese cílových genů, jako jsou SERPINE 1 (PAI-1) a ID1. Smad6 a Smad7 mohou inhibovat TGF- $\beta$  signalizaci inhibicí aktivace R-Smad.

### 2.2.1 Signální dráha ALK a Smad

Nejdůležitějšími a nejvíce prostudovanými typy TGF- $\beta$  receptoru I jsou ALK1 a ALK5.

TGF- $\beta$ RII aktivuje v endotelových buňkách jak ALK1, tak ALK5, ten má ale opačný vliv na chování buněk než ALK1 (Lebrin et al., 2005). ALK1 i ALK5 aktivují různé typy Smad proteinů. Bylo zjištěno, že ALK5 zastává důležitou úlohu

v začlenění ALK1 do TGF- $\beta$  receptorového komplexu a jeho kinázová aktivita je zásadní pro aktivaci ALK1 (Massague and Gomis, 2006). ALK1 a ALK5 jsou důležité pro regulaci endotelových buněk, kde jsou popisovány dvě rozdílné signalizační kaskády. TGF- $\beta$ /ALK1 signalizace stimuluje proliferaci a diferenciaci. TGF- $\beta$ /ALK5 tento proces inhibuje. ALK1 stimuluje expresi ID-1 (inhibitor DNA vazby), který inhibuje některé proteiny, a to má za následek podporu proliferace endotelových buněk a jejich migraci (Valdimarsdottir et al., 2002). ALK5 indukuje expresi proteinů extracelulární matrix, fibronektinu (Lebrin et al., 2005) a PAI-1 (inhibitor plazminogenového aktivátoru), který negativně reguluje migraci endotelových buněk a angiogenezi (Watabe et al., 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, TGF- $\beta$ 1 aktivuje TGF- $\beta$ RII a následuje aktivace různých typů TGF- $\beta$ RI, např. ALK1 a ALK5 s následnou fosforylací Smad proteinů (Goumans et al., 2009). Do těchto signálních drah mohou zasahovat pomocné TGF- $\beta$  receptory III, zejména endoglin (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Obecně lze říci, že TGF- $\beta$ /ALK5 signalizace indukuje fosforylací Smad2/3 komplexu a blokuje angiogenezi tím, že inhibuje proliferaci, migraci a formování endotelových buněk (Goumans et al., 2009). Naopak, TGF- $\beta$ /ALK1 signalizace indukuje fosforylací Smad1/5 komplexu, a to má za následek stimulaci, proliferaci a formování endotelových buněk (Goumans et al., 2003).

U pacientů s rozsáhlými tukovými lézemi byla pozorována silná exprese Smad2 a Smad3 v makrofázích, naproti tomu u zdravých jedinců tato exprese pozorována nebyla. Silná exprese Smad2 a Smad3 byla pozorována v buňkách hladké svaloviny fibrózního plátu aorty, což poukazuje na jejich význam při tvorbě kolagenu (Kalinina et al., 2004).

*In vitro* bylo potvrzeno, že Smad3 hraje významnou roli v potlačení zánětlivé odpovědi makrofágů, inhibici indukibilní NO syntázy (iNOS), MCP-1 a matrix metaloproteinasy-9 (MMP-9) (Werner et al., 2000; Feinberg et al., 2004). Pro Smad1 obecně platí, že jeho aktivaci může způsobit přítomnost ligandu kostního růstového proteinu (BMP), dále také aktivace TGF- $\beta$ /ALK1 (Goumans et al., 2002). Tato aktivace souvisí s aktivací buněčné proliferace a angiogeneze (Oh et al., 2000).

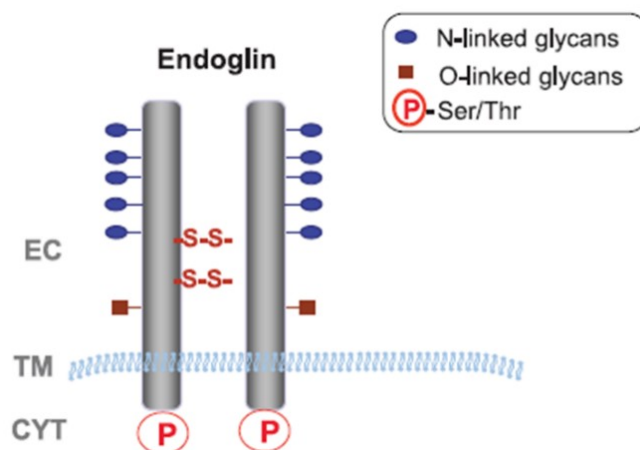


## 2.3 Tkáňový endoglin

Endoglin (Eng, CD105, TGF- $\beta$  receptor III) je homodimerní transmembránový glykoprotein, který slouží jako pomocný receptor v receptorovém komplexu pro TGF- $\beta$  signalizační kaskádu. Eng vytváří komplexy zejména s TGF- $\beta$ RI a TGF- $\beta$ RII (Cheifetz et al., 1992). Signalizační kaskáda Eng/ALK-1/Smad1/5 hraje roli ve stimulaci migrace, proliferace a formování endotelových buněk, což má za následek podporu angiogeneze (ten Dijke et al., 2008). Naopak signalizační kaskáda Eng/ALK-5/Smad2/3 má opačný účinek a tento proces inhibuje (Goumans et al., 2009; Tian et al., 2010).

### 2.3.1 Struktura

Struktura Eng je složena ze dvou identických 95 kDa podjednotek spojených disulfidickými můstky (Cheifetz et al., 1992). Lidský Eng má dlouhou extracelulární doménu čítající 561 aminokyselin, jednoduchou hydrofóbní transmembránovou doménu a krátkou cytosolickou doménu (Gougos and Letarte, 1990). Extracelulární doména obsahuje tripeptid složený z aminokyselin Arg-Gly-Asp, který je důležitým místem pro rozpoznávání adhezivními molekulami nacházejícími se v extracelulární matrix. Nutno zmínit, že tato sekvence peptidů chybí u myši, psa, prasete a krysy (Ge and Butcher, 1994; Yamashita et al., 1994; Llorca et al., 2007). Extracelulární doména dále obsahuje čtyři místa pro N-glykosylaci a jedno místo pro O-glykosylaci. Intracelulární doména obsahuje serin a threonin (Koleva et al., 2006). Lidský gen pro Eng je umístěný na chromosomu 9 a skládá se z patnácti exonů. Extracelulární doména je kódována exony 1 – 13 (Fernandez-Ruiz et al., 1993). Homology Eng byly objeveny u myši a prasete. Zajímavé je, že sekvence aminokyselin těchto homologů je z více jak 70% identická s lidským Eng (St-Jacques et al., 1994). Byly pozorovány dvě isoformy endoglinu: long (L)- Eng a short (S)- Eng, které se liší v délce cytoplasmatické domény. L – Eng obsahuje 47 aminokyselin, vyznačuje se vysokým stupněm fosforylace a je převážně exprimován v endotelových buňkách, zatímco S – Eng obsahuje pouze 14 aminokyselin a jeho intracelulární doména vykazuje nízký stupeň fosforylace (Cheifetz et al., 1992; Bellon et al., 1993).



**Obrázek 5: Schéma struktury endoglinu.** Převzato a upraveno (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). EC – extracelulární, TM- transmembránová, CYT – cytoplasmatická doména.

### 2.3.2 Exprese endoglinu u lidí a zvířat

Zvýšenou expresi Eng lze pozorovat během vývoje cév, angiogeneze. Eng je v malém množství exprimován v nedělících se endotelových buňkách, jeho exprese je však náhle zvýšena v endotelových buňkách v místě aktivní angiogeneze, během embryogeneze (Jonker and Arthur, 2002), ve tkáních postižených zánětem, hojících se ranách (Torsney et al., 2002) a nádorech (Bernabeu et al., 2009). Vysokou expresi Eng najdeme i po ischemii a reperfuzi v ledvinách u myši (Docherty et al., 2006).

Vědecké práce ukazují, že během vývoje kardiovaskulárního systému lidského embrya lze pozorovat expresi Eng v cévním endotelu, a v průběhu čtyř týdnů se jeho exprese stále zvyšovala (Qu et al., 1998). Exprese byla pozorována i u lidského plodu se srdeční vadou (Barresi et al., 2008). U člověka nebyla exprese Eng zaznamenána ve zdravé aortě bez aterosklerotických plátů, ani v endotelu, ani v buňkách hladké svaloviny, zatímco aterosklerotické pláty vykazovaly silnou expresi Eng, a to bez zjevné závislosti na morfologii buněk hladké svaloviny a stupni infiltrace leukocytů (Conley et al., 2000). Bylo také zjištěno, že v aterosklerotických lézích lidské aorty lze pozorovat jeho koexpresi s TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ R2. Některé studie popisují, že makrofágy, buňky hladké svaloviny a endotelové buňky vykazují vysokou expresi Eng ve fázi časně tvorby léze (Piao and Tokunaga, 2006). Silnou expresi Eng vykazovaly i pláty, které obsahovaly velké množství kolagenu a méně trombů, a proto se zdá, že exprese Eng je spojena s vyšší stabilitou plátu. Exprese Eng také koreluje s fosforylovanou formou proteinu Smad2/3, proto se předpokládá, že Eng aktivuje Smad2/3 signální kaskádu (Bot et al., 2009).

Vysoká exprese Eng byla detekována taky v srdečních fibroblastech potkana, kde reguluje působení angiotenzinu II směrem k tvorbě fibrinu (Chen et al., 2004). Byla studována i úloha Eng v procesu aterosklerózy u prasat. V endotelových buňkách zdravé koronární artérie, buňkách hladké svaloviny média a v přilehlých fibroblastech byla pozorována nízká exprese Eng. Avšak po následně provedeném mechanickém poškození (balónkový katetr) byla po 3, 7 a 14 dnech od zákroku pozorována zvýšená exprese Eng, dokazující účast endoglinu v procesu hojení (Ma et al., 2000). Exprese Eng u myši je omezena výhradně na endotelové buňky, které se nachází ve zdravé i aterosklerotické cévě. Není však přítomen v buňkách hladké svaloviny a makrofázích (Nachtigal et al., 2007; Nachtigal et al., 2009b; Strasky et al., 2011). Exprese Eng v endotelu aorty může být ovlivněna hladinou cholesterolu. Zvýšená exprese Eng v endotelu aorty byla pozorována současně se zvýšenou hladinou cholesterolu u myšního modelu na cholesterolové dietě, kde ale nebyly pozorovány aterosklerotické léze (Nachtigal et al., 2007). Naopak u ApoE/LDLr deficientních myši měla zvýšená hladina cholesterolu a velikost plátu za následek sníženou expresi Eng současně se snížením Smad2 (DiChiara et al., 2000; Bot et al., 2009) a Smad1 exprese, což může znamenat závislost této signalizace na přítomnosti Eng v procesu aterosklerózy (Strasky et al., 2011). Toto snížení exprese endoglinu bylo doprovázeno zvýšením hladiny Eng v krevním séru, proto se někteří vědci domnívají, že hypercholesterolemie zvyšuje hladiny Eng v krvi, a naopak snižuje jeho expresi v cévách (Nachtigal et al., 2012).

Expresí Eng může být také ovlivněna použitím hypolipidemik, statinů, které snižují hladinu cholesterolu u člověka i myši (Koh et al., 2004; Nachtigal et al., 2008). Následkem podávání atorvastatinu ApoE/LDLr deficientním myším došlo ke snížení hladiny cholesterolu, zmenšení velikosti plátů a snížení hladiny sérového Eng v aortě a zároveň došlo ke zvýšení exprese tkáňového Eng, ALK, Smad proteinů, VEGF a eNOS (Nachtigal et al., 2009a; Rathouska et al., 2011).

### **2.3.3 Endoglin a NO**

Jak již bylo zmíněno výše, eNOS je klíčový enzym zodpovědný za produkci NO endotelovými buňkami. Jeho exprese a aktivita je důležitá v procesu ochrany endotelu. Jeho snížená exprese je spojená s endotelovou dysfunkcí, která je stěžejním krokem v procesu aterogeneze. Společná exprese Eng a eNOS je předmětem bádání mnoha studií.

Bylo prokázáno, že exprese Eng je úzce spojena s expresí eNOS u myší. U myšího modelu s haploinsuficiencí endoglinu (Eng<sup>+/-</sup>) byla potvrzena snížená hladina eNOS, což mělo za následek poruchu vazodilatace (Jerkic et al., 2004). Je tedy zřejmé, že NO hraje spolu s Eng důležitou roli v procesu vazodilatace, angiogeneze a celkově funkce endotelu (Jerkic et al., 2006). Jiné studie ukazují, že Eng je základní složkou komplexu aktivující eNOS, stabilizující eNOS protein a usnadňuje spojení eNOS s Hsp90, což dokazuje zásadní roli Eng pro funkci endotelových buněk a regulaci tonu cévy (Toporsian et al., 2005). Další *in vitro* studie endotelových buněk ukazuje pravděpodobný mechanismus, jakým Eng zvyšuje expresi eNOS a také jeho funkci. Eng zvyšuje Smad2, fosforylaci Smad2 a stabilitu Smad2, což má za následek zvýšenou expresi eNOS i v přítomnosti či nepřítomnosti TGF- $\beta$ 1 cytokinu (Santibanez et al., 2007).

## 2.4 Solubilní endoglin

### 2.4.1 Vznik a struktura

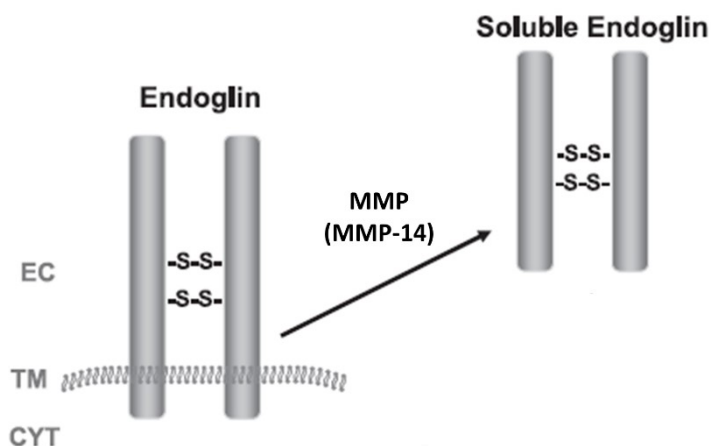
Solubilní endoglin (sEng) představuje extracelulární část tkáňového Eng, která se odštěpuje a je součástí systémové cirkulace při různých stavech spojených s poškozením, aktivací, zánětem nebo stárnutím endotelu (Venkatesha et al., 2006). K odštěpení extracelulární části dochází na leucinu v pozici 586 pomocí MMP-14, která je nejvíce exprimována v endotelových buňkách.

Bylo zjištěno, že MMP-14 hraje důležitou roli v odštěpování Eng u pacientů s preeklampií nebo nádorovým onemocněním (Hawinkels et al., 2010).

Na druhou stranu bylo *in vitro* u buněčné kultury HUVEC zjištěno, že MMP-14 není hlavní proteinázou odštěpující extracelulární část tkáňového Eng (Brownfoot et al., 2014) a tedy role MMP-14 ve štěpení endoglinu je stále předmětem dalších studií. 80kDa molekula sEng odštěpována z povrchu HUVEC je štípána v pozici 586, což znamená, že je odštěpována celá extracelulární doména (Hawinkels et al., 2010). Tento konstrukt byl vzorem pro vytvoření rekombinantního sEng.

Dále se podařilo izolovat sEng ze séra preeklamptických žen a zjistit, že jeho molekulová hmotnost je 65kDa, což znamená, že tato forma sEng není štípána v pozici 586 (Gregory et al., 2014).

Nutno zmínit, že hladina sEng v plazmě u zdravých jedinců byla zjištěna okolo 5ng/ml (Rana et al., 2012).



*Obrázek 6: Vznik solubilního endoglinu proteolytickým štěpením z tkáňového endoglinu (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).*

#### **2.4.2 Solubilní endoglin, hypercholesterolémie a endotelová dysfunkce**

Hypercholesterolémie je považována za jeden z hlavních rizikových faktorů, jehož následkem dochází k rozvoji endotelové dysfunkce a aterosklerózy.

Byl studován vztah mezi vysokou hladinou cholesterolu a sEng u pacientů s aterosklerózou a zjistilo se, že hladina jiných markerů endotelové dysfunkce nebo poškození endotelu zvýšená není, např. E-selektin (Blann et al., 1996). Dále bylo zjištěno, že je hladina sEng zvýšena jen v časně fázi aterosklerózy jako následek poškození endotelových buněk, v pozdějších fázích tohoto onemocnění docházelo k jejímu snížení následkem zvýšené tvorby Eng/TGF- $\beta$ 1 komplexů (Li et al., 2000b). sEng se považuje za marker, který se zvyšuje při vysoké hladině celkového cholesterolu u pacientů s familiární hypercholesterolémií (Blaha et al., 2008).

V další studii byly vysoké hladiny sEng pozorovány i u primární kultury HUVEC, u které byl navozen oxidační stres použitím H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a následně byly buňky ovlivněny TNF $\alpha$  cytokinem (Ikemoto et al., 2012). Studie provedená v laboratoři prof. Nachtigala také potvrzuje nárůst sEng po ovlivnění buněk TNF $\alpha$  cytokinem (Zemankova et al., 2015).

V další studii byly použity jak buňky HUVEC, tak explantáty z myší placenty a bylo zjištěno, že HO-1 inhibuje uvolňování sEng a působí tak protektivně z hlediska endotelové dysfunkce (Cudmore et al., 2007).

Co se týká endotelové dysfunkce a aterosklerózy, tak důležitou roli hrají i další rizikové faktory jako je např. hypertenze nebo DM 2. Byla provedena studie u pacientů s DM 2, hypertenzí a u zdravých jedinců a zjistilo se, že hladina sEng významně koreluje s endotelovou dysfunkcí, glykemií, glykovaným hemoglobinem, systolickým krevním tlakem a hypertrofií levé komory. Hladina sEng byla také zvýšena u pacientů s DM 2, u kterých se projevila retinopatie a u pacientů s DM 2 a hypertenzí (Blazquez-Medela et al., 2010).

sEng je také považován za marker zánětu, oxidačního stresu a stárnutí endotelu v srdečních cévách, kde tyto procesy přispívají k nežádoucím účinkům u pacientů s ICHS. (Ikemoto et al., 2012).

Zvýšená hladina sEng je také spojena se změnou morfologie aterosklerotického plátu a jeho hladina koreluje s výskytem nestabilního plátu a také u jeho ruptury u pacientů s nestabilní anginou pectoris, akutním infarktem myokardu (AIM) a u stavu po infarktu myokardu (Cui et al., 2008).

Hladina sEng byla sledována i u pacientů s AIM. Snížená hladina tkáňového Eng, ale i sEng, byla detekována u pacientů se špatnou prognózou, což může znamenat jistou spojitost mezi tkáňovou a solubilní formou. Ve srovnání se zdravými pacienty, byla pozorována nižší hladina sEng u pacientů s AIM. Nižší hladina sEng může tedy znamenat poškození funkce endotelu. Vědci došli k závěru, že snížená hladina sEng v časně fázi AIM může být považována za marker časného úmrtí (Cruz-Gonzalez et al., 2008).

Bylo také zjištěno, že provedením LDL aferézy dochází nejen ke snížení hladiny cholesterolu v krvi, ale i ke snížení sEng a dalších markerů endotelové dysfunkce (např. hs-CRP, CD40L) u pacientů s familiární hypercholesterolémií. Pozorovaný pokles sEng není však přičítán LDL aferéze, ale snížené aktivitě endotelových buněk a imunitnímu systému po odstranění aterogenních markerů (Blaha et al., 2008).

Na lidských explantátech placenty a u primární kultury HUVEC bylo pozorováno, že hladinu sEng mohou zvyšovat i oxysteroly, nicméně ovlivnění pravastatinem nemělo žádný efekt na pokles sEng (Brownfoot et al., 2014).

Bylo provedeno i velké množství studií na myších a bylo zjištěno, že hladina sEng byla signifikantně zvýšena u ApoE/LDLr deficientních myší kmených cholesterolovou dietou, u těchto myší byla také pozorována vysoká hladina cholesterolu. Zajímavé je, že vysoká hladina sEng a cholesterolu neměla vliv na velikost aterosklerotického plátu (Rathouska et al., 2015).

### **2.4.3 Solubilní endoglin jako možný induktor endotelové dysfunkce v různých částech cévního řečiště**

Jak již bylo zmíněno výše, sEng může být považován za biomarker poškození endotelu. Další studie se však zabývají otázkou, zda sEng může být alespoň částečně zodpovědný za navození nebo vývoj endotelové dysfunkce.

sEng je schopen inhibovat tvorbu kapilár, což poukazuje na jeho antiangiogenní efekt. V *in vivo* experimentu bylo zjištěno, že myši se zvýšenou expresí sEng mají zvýšenou propustnost kapilár v plicích, ledvinách a játrech. Na izolovaných potkaních kapilárách a mezenterických cévách bylo dále zjištěno, že ovlivnění rekombinantním sEng zvyšovalo vazbu TGF- $\beta$ 1 cytokinu k TGF- $\beta$ R2, což vedlo k redukcii Smad2/3 a následné inhibici eNOS a poté k vazodilataci (Venkatesha et al., 2006). V tomto případě lze říci, že sEng může mít vliv na rozvoj hypertenze (Rathouska et al., 2015). Hypertenze a endotelová dysfunkce jsou stavy, u kterých hladina sEng koreluje s jejich závažností, a právě tyto stavy lze pozorovat u preeklampsie (Levine et al., 2006).

Dále byla provedena studie na endotelu mezenterických cév s použitím adenoviru exprimujícího sEng, následkem toho byly utlumeny účinky TGF- $\beta$  a VEGF se současným zvýšením exprese P-selektinu a zvýšením množství leukocytů adhezi k endotelu, dále se zvýšily hladiny solubilního E-selektinu a solubilního VCAM-1 a došlo k porušení vazodilatace (Walshe et al., 2009).

Jiní autoři zjistili, že sEng je schopen inhibovat adhezi leukocytů ve venulách, avšak mechanismus, jakým se tak děje, zůstává stále neznámý (Rossi et al., 2013).

Dále byla provedena studie u myší, které mají vysoké hladiny sEng (více než 2000 ng/ml) nebo metaloproteinázy MMP-14. Vysoká hladina MMP-14 měla za následek zvýšení hladiny sEng a zvýšení systolického krevního tlaku v porovnání

s "wild type" skupinou myši. Vyšší systolický krevní tlak byl pozorován i u myši, které měly vysokou hladinu lidského sEng (Valbuena-Diez et al., 2012).

V jiné studii byl opět potvrzen zvýšený systolický krevní tlak u myši s vysokou hladinou sEng v porovnání se skupinou myši s nízkými hladinami sEng. Avšak výsledky této studie ukazují, že sEng není jediným faktorem, který má vliv na rozvoj endotelové dysfunkce (Nemeckova et al., 2015).

Je tedy zřejmé, že sEng působí v různých částech cévního řečiště různě a vždy je nutné zhodnotit, zda kombinace více faktorů, které přispívají k endotelové dysfunkci, např. hypercholesterolemie, může mít aditivní vliv spolu se zvýšenou hladinou sEng (Rathouska et al., 2015).

#### **2.4.4 Předpokládaný mechanismus působení solubilního endoglinu v endotelu**

První práce o interakci sEng – TGF- $\beta$  popisují, že zvýšená hladina sEng má za následek snížení účinků TGF- $\beta$  spojených s proaterogenním efektem (Li et al., 2000b; Stefoni et al., 2002). Další hypotézou bylo, že sEng je schopen snižovat koncentraci nevázané, aktivní formy TGF- $\beta$ , což vede k rozvoji procesu aterogeneze (Li et al., 2000a; Rathouska et al., 2015).

Později bylo ale zjištěno, že TGF- $\beta$  vykonává dvojí funkci v průběhu rozvoje aterosklerózy. V prvních fázích aterogeneze může TGF- $\beta$  aterogenezi podporovat, a to stimulací produkce kolagenu a zvětšováním velikosti plátu. V pozdějších fázích může působit proti tomuto procesu a přispívat tak k větší stabilitě plátu. Naopak v poslední fázi aterogeneze přispívá opět k tvorbě plátu a tvorbě okluze (Majesky et al., 1991; Grainger, 2004, 2007; Redondo et al., 2007).

Je důležité zmínit, že TGF- $\beta$  signalizaci lze z hlediska protekce cév ovlivnit také léčivy, např. acetylsalicylová kyselina indukuje TGF- $\beta$  signalizaci, což má za následek inhibici proliferace buněk hladké svaloviny cév a pravděpodobně brání růstu aterosklerotického plátu (Redondo et al., 2003). Podobný protektivní účinek má i perorální antidiabetikum pioglitazon podávaný u DM 2, který zprostředkovává aktivaci TGF- $\beta$ /Smad2 signalizace, následkem čehož je proapoptotické působení na buňky hladké svaloviny cév (Redondo et al., 2005).



Z výše uvedeného vyplývá, že sEng může kompetovat o vazebná místa s TGF- $\beta$ 1 cytokinem a předpokládá se, že zasahuje dále do signalizace tak, že působí zeslabení aktivace eNOS v endotelových buňkách (Venkatesha et al., 2006).

Pokles funkce eNOS je spojena se zvýšením exprese adhezních molekul, zvyšuje se i propustnost cév, rozvíjí se endotelová dysfunkce, arteriální hypertenze a ateroskleróza (Forstermann and Sessa, 2012). Všechny tyto účinky mohou být do jisté míry přisuzovány působení sEng (Rathouska et al., 2015).

Recentní práce *Gregory et al.* ukazuje, že sEng vytváří přímou vazbu s jinou biologicky aktivní molekulou, a to s BMP9. V této studii bylo zjištěno, že solubilní TGF- $\beta$ R2 může vytvářet vazbu s TGF- $\beta$ 1 cytokinem a blokovat fosforylaci Smad1/5/8, zatímco sEng tohoto procesu schopen není. Ví se však, že sEng blokuje fosforylaci Smad1/5/8 a to tak, že vytváří vazbu s BMP9 (Gregory et al., 2014).

Vazbu sEng-BMP9 potvrzuje i předchozí studie z roku 2011 (Castonguay et al., 2011). Je ale zřejmé, že pokud je sEng součástí komplexu sEng-TGF $\beta$ R2, není schopen přímo vychytávat TGF- $\beta$ 1 cytokin (Castonguay et al., 2011).

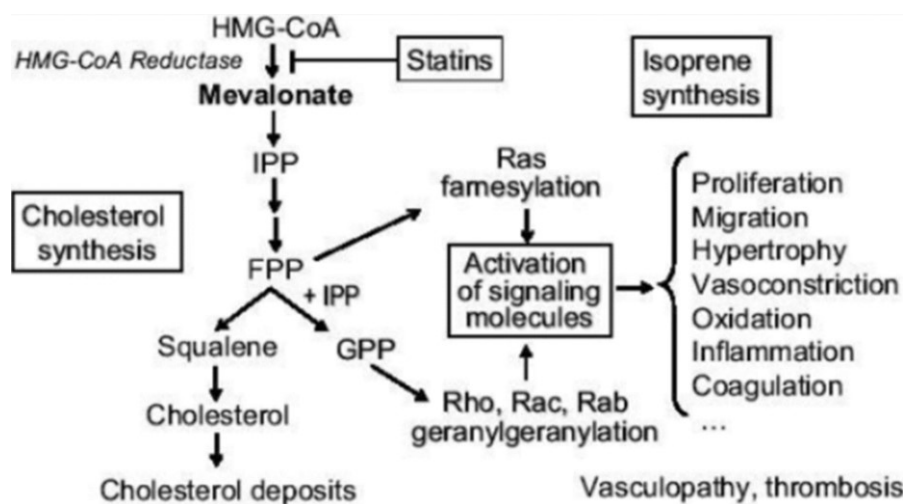
Bylo také zjištěno, že BMP9 (jako součást kaskády ALK-1/BMPR-2, p38 a MAPK) může indukovat endotel k produkci významného vazokonstriktoru ET-1 (Star et al., 2010), který hraje důležitou roli v regulaci krevního tlaku (Gregory et al., 2014).

## 2.5 Statiny

Statiny jsou kompetitivními reverzibilními inhibitory enzymu HMG-CoA reduktázy, který katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát, a tak dochází k syntéze cholesterolu v játrech. Inhibice tohoto enzymu má pak za následek pokles syntézy cholesterolu v játrech (**Obrázek 7**), zvýšení exprese LDL receptorů (LDLr) a zvýšené vychytávání LDL částic z plazmy (Zhou and Liao, 2010). První inhibitory tohoto enzymu jsou přírodního původu, pochází z plísně *Penicilium citrinum* a byly objeveny v roce 1976 (Bedi et al., 2016). Od té doby bylo publikováno velké množství studií zabývajících se využitím statinů v klinické praxi.

Klinické studie uvádějí, že statiny jsou prospěšné v primární a sekundární prevenci ICHS (Shepherd et al., 1995; Downs et al., 1998; Liao and Laufs, 2005). Statiny jsou bezpečná a účinná léčiva široce předepisována pro snížení hladiny cholesterolu.

Mezi další důležité účinky statinů patří např. účinky imunomodulační, neuroprotektivní, antidiabetické, antiproliferační, protizánětlivé, antitrombotické a působí i zeslabení cévní remodelace a nachází využití při chronických zánětlivých onemocněních, jako je např. revmatoidní artritida nebo systémový lupus erythematosus. Tyto tzv. nelipidové (na hypolipidemickém efektu statinů nezávislé) účinky označujeme jako pleiotropní (Bedi et al., 2016).



**Obrázek 7:** Schéma inhibice HMG-CoA reductázy statiny. Převzato z [https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC1993933\\_vhrm0101-029-f1&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC1993933_vhrm0101-029-f1&req=4), 20.3.2017.

### 2.5.1 Rozdělení, farmakokinetika, používané statiny

Statiny lze rozdělit do tří kategorií, a to na základě jejich chemické struktury, původu a rozpustnosti (Bedi et al., 2016).

#### *Klasifikace statinů na základě jejich chemické struktury*

- statiny obsahující hexahydronaftalenový kruh: mevastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin.
- statiny obsahující fluorfenylový kruh: fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin.

*Klasifikace statinů na základě jejich původu nebo zdroje*

- a) přírodního původu: lovastatin, simvastatin, pravastatin.
- b) syntetického původu: atorvastatin, fluvastatin, cerivastatin.

*Klasifikace statinů na základě jejich rozpustnosti*

- a) lipofilní: atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin, cerivastatin, piatavastatin.
- b) hydrofilní: pravastatin, rosuvastatin.

Všechny statiny mají ale rozdílné charakteristické vlastnosti na základě jejich mechanismu působení, renální exkrece, průniku do CNS a dalších terapeutických, farmakokinetických a farmakodynamických vlastností. Vlastnosti vybraných statinů jsou shrnuty v tabulce 1 (Bedi et al., 2016).

**Tabulka 1: Terapeutické, farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti statinů.**

*Převzato a upraveno (Bedi et al., 2016).*

	Atorvastatin	Simvastatin	Rosuvastatin	Pravastatin	Pitavastatin	Fluvastatin
Dávkovací rozmezí [mg/dl]	10 - 80	10 - 80	5 - 40	10 - 80	5 - 10	20 - 80
Maximální redukce LDL-C (%)	60	47	55	34	43	24
Redukce triglyceridů v séru (%)	29	18	43	24	18	10
Zvýšení HDL-C v séru (%)	6	12	9,2	12	5	8
Průnik do CNS	Ne	Ano	Ne	Ne	Ano	Ne
Renální exkrece (%)	2	13	10	20	10	<6
Biotransformace	Cytochrom P450 3A4	Cytochrom P450 3A4	Cytochrom P450 3A4	Cytochrom P450 2C9	Cytochrom P450 3A4	Cytochrom P450 3A4
Hydrofilní/lipofilní vlastnosti	Lipofilní	Lipofilní	Hydrofilní	Hydrofilní	Hydrofilní	Lipofilní

**LDL-C** – LDL cholesterol, **HDL-C** - HDL-cholesterol

### 2.5.2 Vliv statinů na endotel

Jak už bylo popsáno výše, velmi důležitým mediátorem endotelové funkce je NO, a existuje mnoho klinických studií, které popisují mechanismy, jakými statiny zvyšují produkci eNOS, tedy i NO, a následně tak zlepšují funkci endotelu.

Jedním z mechanismů je Rho/ROCK signalizační kaskáda. Rho kinázy jsou serin/threonin kinázové proteiny. Kritickým krokem pro funkci těchto proteinů je posttranslační modifikace zprostředkovaná isoprenylací (Hall, 1998), kterou statiny mohou inhibovat (Laufs et al., 2002).

Důsledkem této inhibice je pak zvýšení stability eNOS mRNA, což má za následek zvýšení exprese a aktivity eNOS (Laufs and Liao, 1998). Dalším mechanismem, kterým statiny mohou aktivovat eNOS je prostřednictvím serin/threonin kinázy Akt a PI3-kinázy. Statiny zvyšují regulaci PI3-kinázy a tím podporují aktivaci Akt v endotelových buňkách, což vede k fosforylaci eNOS a zvýšení angiogeneze (Kureishi et al., 2000). Dokonce i inhibice Rho/ROCK signalizace vede k aktivaci PI3/Akt signalizace a následné kardioprotekci (Wolfrum et al., 2004). Statiny mohou regulovat aktivitu eNOS působením na cav-1. Jak již bylo popsáno v kapitole 2.1.1, cav-1 je membránový protein, který se váže na eNOS v kaveolách, a tím dochází k negativní regulaci tohoto enzymu a následně inhibici produkce NO (Plenz et al., 2004). *In vitro* experimenty ukázaly, že v přítomnosti atorvastatinu dochází k redukci cav-1, což má za následek obnovení aktivity eNOS v endotelových buňkách. Tento účinek byl zrušen přidáním mevalonátu, což poukazuje na pleiotropní efekt statinů v tomto účinku (Feron et al., 2001).

### 2.5.3 Statiny a ateroskleróza

Ateroskleróza je komplexní zánětlivé onemocnění vyznačující se nadměrnou kumulací lipidů ve stěně cév (Schonbeck and Libby, 2004). Bylo zjištěno, že statiny dokážou svým působením na cévní stěnu inhibovat zánětlivou reakci v aterosklerotickém plátu (Vaughan et al., 2000). Mechanismem tohoto působení je snížení exprese adhezních molekul, např. VCAM-1, ICAM-1, E-selektinu (Rasmussen et al., 2001; Rezaie-Majd et al., 2003). Statiny dále snižují expresi P-selektinu a adhezi leukocytů zvýšením produkce NO (Scalia et al., 2001). Experimenty u eNOS deficientních myší prokázaly, že eNOS zprostředkovává některé protektivní účinky statinů na cévní endotel – především protizánětlivé účinky (Stalker et al., 2001).

## 2.5.4 Statiny a endoglin

Experimentální studie na ApoE/LDLr deficientních myších modelech potvrzují vliv atorvastatinu na hladiny tkáňového i solubilního Eng, a to zejména v cévním endotelu aterosklerotických plátů v aortě. Podávání atorvastatinu mělo také za následek snížení hladiny cholesterolu, sérového Eng a zmenšení velikosti aterosklerotických plátů. Zároveň docházelo v aortě ke zvýšení exprese tkáňového Eng, eNOS, VEGF, ALK a Smad proteinů (Nachtigal et al., 2009a; Rathouska et al., 2011; Vecerova et al., 2012).

## 2.6 Modely pro *in vitro* studium endotelu

Endotelové buňky produkují velké množství antikoagulačních a antitrombotických molekul (např. prostacyklin) (Riederer et al., 2010), protrombotických molekul (např. PAI-1) (Smyth et al., 1997), regulátory zánětlivých a imunitních procesů (např. adhezivní molekuly nebo IL-1) (Akeson et al., 1992; Sprague and Khalil, 2009) a regulátory buněčného růstu (např. TGF- $\beta$ ) (Pintavorn and Ballermann, 1997).

Velmi častým modelem pro *in vitro* studium endotelu jsou lidské endotelové buňky aorty Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) a lidské endotelové buňky pupečnickové žíly HUVEC. Jejich využití najdeme v experimentálních pracích, které se zabývají endotelovou dysfunkcí a jejím vztahem ke kardiovaskulárním onemocněním, jako je např. DM 2, ateroskleróza (Rabini et al., 2002; Cai et al., 2005; Onat et al., 2011) nebo preeklampsie (Sanchez-Aranguren et al., 2014). Nicméně, použití modelů pro *in vitro* studium endotelu bývá velmi častým cílem kritiky z důvodu relevance výsledků ve vztahu ke klinickým studiím (Onat et al., 2011).

Vhodným modelem pro realizaci transfekce je buněčná linie Human Embryonic Kidney (HEK293T), jedná se o lidskou embryonální linii ledvinových buněk (Lin et al., 2014).

### 2.6.1 HAEC

Lidské endotelové buňky aorty jsou primární buněčná kultura obvykle získaná od jednoho dárce. Kultivace probíhá ve speciálním médiu s růstovými faktory a suplementy při stálé vlhkosti, teplotě 37 °C a za kontinuální dodávky 5% CO<sub>2</sub>.

Pro správný růst a vývoj buněk je nezbytnou součástí média fetální bovinní sérum (FBS). Pro zajištění optimálních podmínek pro růst a vývoj by mělo být médium měněno každý druhý den. Buňky vytváří v kultivační nádobě jednu souvislou vrstvu. Vzhledem k tomu, že se jedná o primární kulturu, jsou buňky udržovány v kultivaci mezi druhou až osmou pasáží. K pasážování buněk se obvykle přistupuje nejdříve při 70% - 80% konfluenci (Kowalsky et al., 2008; Linden et al., 2008; Stratmann et al., 2016). Nevýhodou použití těchto buněk a interpretace výsledků může být fakt, že se jedná o kulturu získanou pouze od jednoho dárce.

### **2.6.2 HUVEC**

Lidské endotelové buňky pupečnickové žíly jsou také primární buněčná kultura, jejich zdrojem ale může být jeden dárce nebo i více dárců. Kultivace probíhá za stejných podmínek jako u buněk HAEC, tj. při stálé vlhkosti a teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> (Babbitt et al., 2015). Buňky rostou v kultivačních nádobách potažených želatinou, která pomáhá buňkám přisednout a zároveň plní úlohu extracelulární matrix. Velmi často se do média přidává 1% penicilin/streptomycin jako prevence infekcí (Inglis et al., 2016). Výhodou použití těchto buněk je větší variabilita díky původu od různých dárců.

### **2.6.3 HEK293T**

Lidská embryonální linie ledvinových buněk je často používanou buněčnou linií pro biologický výzkum, díky svým vlastnostem je vhodná zejména pro transfekci. Součástí této buněčné linie je T antigen, který indukuje maligní transformaci těchto buněk a zajišťuje tak jejich nesmrtelnost. Kultivace probíhá v podmínkách stálé teploty 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> v Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM). Médium obvykle obsahuje 10% FBS, 2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu G, 110 mg/l pyruvátu sodného a 100 µg/ml streptomycinu (Lin et al., 2014).

Tato buněčná linie byla použita pro měření luciferázové aktivity IL-6 a NFκB. Experimenty byly provedeny v rámci spolupráce v laboratoři prof. Carmela Bernabeu, CIB v Madridu.

### 3 CÍLE STUDIE

- Analýza současné odborné literatury zabývající se úlohou endoglinu v procesu aterosklerózy a problematikou vlivu solubilního endoglinu na cévní endotel.
- Analýza exprese endoglinu a eNOS po ovlivnění buněk atorvastatinem a TNF $\alpha$  cytokinem.
- Analýza potenciálního mechanismu působení solubilního endoglinu u lidských endotelových buněk za využití metod PCR, Western blot, imunofluorescenční průtokové cytometrie, Luminex analýzy, ELISA a měřením luciferázové aktivity.
- Sledování změn exprese vybraných členů TGF- $\beta$  signalizační kaskády, Smad proteinů a markerů dysfunkce endotelu po ovlivnění buněk různými koncentracemi solubilního endoglinu *in vitro*.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Buněčné kultury

K experimentům byla použita primární buněčná kultura HUVEC (Lonza, Švýcarsko) a buněčná linie HEK293T (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA).

Buňky HUVEC byly kultivovány v základním médiu Endothelial Basal Medium – 2 (EBM-2) (Lonza, Švýcarsko) spolu s dalšími suplementy určenými pro kultivaci endotelových buněk (EGM-2 SingleQuot Kit, Lonza, Švýcarsko). Seznam suplementů je uvedený v tabulce 2. Médium obsahovalo 10% FBS (Sigma-Aldrich) nutného pro růst buněk. Kultivace probíhala v Petriho miskách potažených 0,1% želatinou (Sigma-Aldrich) při teplotě 37°C v podmínkách 5% CO<sub>2</sub>. Všechny experimenty byly provedeny mezi 4. a 9. pasáží. Pro detekci exprese fosforylovaných forem proteinů byly buňky vystárčovány, tzn. před ovlivněním buněk sEng byly HUVEC inkubovány 24 hodin v médiu, které obsahovalo 0% FBS. Tento způsob kultivace je standardní metoda, která se běžně používá ke zvýšení buněčné odpovědi na přítomnost solubilních faktorů. Buňky HEK293T byly kultivovány v médiu Dulbecco modified Eagle's (DMEM) (Gibco, Massachusetts, USA) s 10% FBS (Gibco), 100 jednotek/ml penicilinu a 100 jednotek/ml streptomycinu (Gibco) při teplotě 37°C v podmínkách 5% CO<sub>2</sub>.

Atorvastatin (trihdrát vápenaté soli) (ATV) byl zakoupen od společnosti Sigma-Aldrich. Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10mM v dimethylsulfoxidu (DMSO) (Sigma-Aldrich) a aliquoty byly uchovávány při -20°C.

Použité koncentrace ATV a doba inkubace byly vybrány na základě již publikovaných studií (Hernandez-Perera et al., 1998; Heeba et al., 2007).

Rekombinantní lidský endoglin (sEng) a TNF $\alpha$  byly zakoupeny od společnosti R&D Systems (Minnesota, USA). Použitím sterilního PBS (Sigma-Aldrich), které obsahovalo 0,1% bovine serum albumin (BSA) (Biosera, Francie) byly připraveny zásobní aliquoty sEng o koncentraci 250 ng/ml a TNF $\alpha$  o koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Aliquoty byly uchovávány při -20°C.

Použité koncentrace sEng (40 ng/ml a 500 ng/ml) byly vybrány s ohledem na rozmezí koncentrací sEng v plazmě preeklamptických pacientek a podle myšího preeklamptického modelu, kde plazma experimentálních zvířat obsahovala vysoké hladiny lidského sEng (Valbuena-Diez et al., 2012; Nemeckova et al., 2015; Jezkova et al., 2016).



**Tabulka 2: Seznam suplementů obsažených v EGM-2 SingleQuot Kit**

<b>Suplement</b>	<b>Objem (ml)</b>
GA-1000	0,5
Heparin	0,5
Hydrokortison	0,2
Kyselina citronová	0,5
R3 – IGF-1	0,5
rhEGF	0,5
rhFGF-B	2,0
VEGF	0,5

**GA** – gentamycin/amfotericin, **R3-IGF-1** – rekombinantní long R inzulin like růstový faktor, **rhEGF** – rekombinantní lidský epidermální růstový faktor, **rhFGF-B** – rekombinantní lidský růstový faktor fibroblastů-B

## 4.2 Western blot

K semikvantitativnímu hodnocení exprese námi sledovaných proteinů jsme použili WB analýzu.

Buňky HUVEC byly inkubovány se 40 ng/ml nebo 500 ng/ml sEng. Pro stanovení exprese fosforylovaných forem proteinů (peNOS<sup>S1177</sup>, pSmad1/5, pSmad2/3) byly buňky inkubovány 2 hodiny v podmínkách 0% FBS. Doba inkubace 16 hodin a 10% FBS byla zvolena pro stanovení exprese proteinů BMPR-2, COX-2, Eng, eNOS, ID-1, VCAM-1. 48 hodin a 10% FBS byly vzorky inkubovány v přítomnosti sEng pro stanovení exprese BMPR-2, fosforylované a nefosforylované formy proteinu NFκB. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS.

Vzorky byly homogenizovány v RIPA pufru (Sigma-Aldrich) s inhibitory proteáz (SERVA, Německo) a inhibitory fosfatáz (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), následně byl použit ultrazvukový homogenizátor UP50H (Maneko; nastavení: 0,5 cyklu, 80% amplituda). Následovala extrakce proteinů a měření jejich koncentrace BCA analýzou (ThermoFisher Scientific).

Homogenáty byly naředěny destilovanou vodou na výslednou koncentraci proteinu 20μg a inkubovány se vzorkovým puftrem 5 minut při 95°C. Proteiny byly separovány pomocí gelové elektroforézy (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) na 10% polyakrylamidových gelech. Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu (Millipore, Německo) pomocí Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell nebo pomocí Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, California, USA), která byla následně inkubována 1 hodinu v 5% roztoku sušeného mléka při pokojové teplotě. Následovala inkubace membrány s primární protilátkou, 16 hodin při teplotě 4°C, promytí membrán v roztoku 0,1% tris buffer saline - tween (TBS-T), a pak inkubace se sekundární protilátkou 1 hodinu při pokojové teplotě. Po promytí membrán v roztoku 0,1% TBS-T byla navázaná protilátka vizualizována za použití chemiluminiscenčních činidel (ThermoFisher Scientific) s následnou expozicí na film (Foma, Česká Republika).

Vyhodnocení bylo provedeno za použití softwaru NIS – Elements software, version 4.0 (Laboratory Imaging, Česká Republika).

## 4.2.1 Použité primární a sekundární protilátky

Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek je uvedený v tabulce 3.

**Tabulka 3: Přehled primárních a sekundárních protilátek**

Primární protilátka	Katalogové číslo, výrobce	Ředění primární protilátky	Sekundární protilátka	Katalogové číslo, výrobce	Ředění sekundární protilátky
BMPR-2	ab78422 (Abcam, UK)	1:200	anti-myš	A9917 (Sigma-Aldrich)	1:1000
COX-2	12375-1-AP (Proteintech, Illinois, USA)	1:500	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:1000
endoglin	sc-20635 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA)	1:500	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:2000
eNOS	sc-654 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:1000
GAPDH	G8795 (Sigma-Aldrich)	1:10000	anti-myš	A9917 (Sigma-Aldrich)	1:20000
ID1	ab134163 (Abcam)	1:1000	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:2000
NFκB p65	ab86299 (Abcam)	1:2000	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:4000
peNOS <sup>S1177</sup>	sc-21871-R (Santa Cruz Biotechnology)	1:200	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:1000
pSmad1/5	9516 (Cell Signaling, Massachusetts, USA)	1:500	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:2000
pSmad2/3	8828 (Cell Signaling)	1:500	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:1000
VCAM-1	ab106777 (Abcam)	1:500	anti-králík	ab6112 (Abcam)	1:1000
β-actin	A5316 (Sigma-Aldrich)	1:10000	anti-myš	A9917 (Sigma-Aldrich)	1:10000

### 4.3 Kvantitativní real-time PCR

Pro stanovení exprese sledovaných genů (Tabulka 4) byla použita metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR). Buňky HUVEC pro qRT-PCR analýzu byly inkubovány se 40 ng/ml nebo 500 ng/ml sEng po dobu 3 nebo 16 hodin. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS.

Celková RNA byla izolována z buněk použitím TRI reagent (Sigma-Aldrich) a její koncentrace byla měřena pomocí spektrofotometru. Pomocí aqua pro injectione (Braun, Itálie) byly vzorky naředěny na stejnou koncentraci messengerové RNA (mRNA). 10 $\mu$ l mRNA bylo použito do jedné reakční směsi pro přepis do komplementární DNA (cDNA) pomocí T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Přepis tedy probíhal ve 20 $\mu$ l reakční směsi. K přepisu vzorků z mRNA do cDNA byl použit komerčně dostupný kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Massachusetts, USA).

Do reakce pro detekci exprese jednotlivých genů bylo použito 30ng cDNA. Jako endogenní kontrola – housekeep gen byl použit *GAPDH* nebo *18S*.

Oligonukleotidy pro *IL6* gen byly navrhnuty v centru CIB pomocí Roche software pro qRT-PCR, sekvence oligonukleotidů byla: Fw 5'-GAAGGCAGCAGGCAACAC-3' a Rw 5'-CAGGAGCCCAGCTATGAACT-3'. Pro amplifikaci na 7500 Fast Real-Time PCR systému (Applied Biosystems) byl použit následující časový a teplotní profil: 3 min 95°C, následovalo 40 cyklů: 7 s 95°C, 25 s 60°C.

Relativní kvantifikace genové exprese byla vyhodnocena pomocí metody dle Pfaffla (Pfaffl, 2001). Vzorec pro výpočet je uveden pod odkazem Vzorec 1.

*Vzorec 1: Vzorec pro výpočet relativní kvantifikace genové exprese (Převzato a upraveno z <http://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>, dne 5.3.2017).*

$$R = \frac{E_{target}^{\Delta C_{t target}(kontrola-vzorek)}}{E_{housekeeping}^{\Delta C_{t housekeeping}(kontrola-vzorek)}}$$

$E$  – efektivita, **target** – stanovovaný gen, **housekeeping** – referenční gen (GAPDH, 18S),  
 $E_{target}$  a  $E_{housekeeping}$  – hodnoty efektivity stanovené z kalibrační křivky pro každý gen,  
 $C_t$  (cycle threshold) – prahové hodnoty určitých specifických cyklů,  
 $\Delta C_{t target}$  a  $\Delta C_{t housekeeping}$  – rozdíly v prahových hodnotách  $C_t$  mezi kontrolou a vzorkem pro každý gen

### 4.3.1 Použité primery

Seznam použitých primerů je uvedený v tabulce 4. Všechny primery byly zakoupeny od společnosti Applied Biosystems a naředěny roztokem TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix v poměru 1:10.

**Tabulka 4: Seznam použitých primerů**

Označení genu (označení příslušného proteinu)	Číslo eseje/Sekvence oligonukleotidů
<i>18S</i> (18S)	Hs03003631_g1
<i>ACVRL1</i> (ALK-1)	Hs00953798_m1
<i>BMP4</i> (BMP-4)	Hs00370078_m1
<i>BMPR2</i> (BMPR-2)	Hs00176148_m1
<i>CCL2</i> (MCP-1)	Hs00234140_m1
<i>CYBA</i> (p22-PHOX)	Hs03044361_m1
<i>ENG</i> (Endoglin)	Hs00923996_m1
<i>GAPDH</i> (GAPDH)	Hs02758991_g1
<i>HMOX1</i> (HO-1)	Hs01110250_m1
<i>ICAM1</i> (ICAM-1)	Hs00164932_m1
<i>ID1</i> (ID-1)	Hs03676575_s1
<i>IL6</i> (IL-6)	Fw 5'-GAAGGCAGCAGGCAACAC-3' Rw 5'-CAGGAGCCCAGCTATGAACT-3'
<i>NFKB3</i> (NFκB)	Hs00153294_m1
<i>NOS3</i> (eNOS)	Hs01574659_m1
<i>PTGS2</i> (COX-2)	Hs00153133_m1
<i>SERPINE1</i> (PAI-1)	Hs01126606_m1
<i>TGFBRI</i> (ALK-5)	Hs00610320_m1
<i>VCAM1</i> (VCAM-1)	Hs01003372_m1
<i>TGFBR2</i> (TGFβRII)	Hs00234253_m1
<i>BMP2</i> (BMP-2)	Hs00154192_m1

#### 4.4 Imunofluorescenční průtoková cytometrie

Pro analýzu vzorků za použití imunofluorescenční průtokové cytometrie bylo vytvořeno několik experimentálních skupin:

- ATV 5  $\mu\text{M}$  – buňky byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti 5  $\mu\text{M}$  ATV, následovala 16 hodinová inkubace v médiu s 0,1% (v/v) DMSO
- TNF $\alpha$  – buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s 0,1% (v/v) DMSO, následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$
- ATV 5  $\mu\text{M}$ /TNF $\alpha$  – buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s ATV o koncentraci 5  $\mu\text{M}$  a s 0,1% (v/v) DMSO, pak následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$
- kontrolní skupina – buňky byly inkubovány 40 hodin s médiem s 0,1% (v/v) DMSO

V případě těchto experimentálních skupin byly buňky po oplachu PBS inkubovány s trypsinem (Biosera, Francie), následovala inkubace s primární protilátkou po dobu 1 hodiny při 4°C, poté byly buňky inkubovány 30 minut při 4°C s kompatibilní sekundární protilátkou. Byla použita myší monoklonální protilátka anti-endoglin (P4A4, protilátku laskavě poskytl prof. Carmelo Bernabeu z CIB, Madrid) nebo anti-eNOS (ab76198, Abcam) nebo anti-VCAM-1 (BBA5, R&D Systems). Jako sekundární protilátka byla použita kozí anti-myší protilátka Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (A11001, Life Technologies, Massachusetts, USA) nebo kozí anti-myší Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 (A20173, Life Technologies). Pro detekci exprese endoglinu a VCAM-1 nebyly buňky fixovány ani permeabilizovány. Pro detekci exprese eNOS byly buňky před inkubací s primární a sekundární protilátkou fixovány 4% paraformaldehydem a následně permeabilizovány roztokem 0,1% Tween 20 v PBS.

Další experimentální skupiny:

- skupina 40 ng/ml – buňky byly inkubovány 16 hodin v médiu se 40 ng/ml sEng
- skupina 500 ng/ml – buňky byly inkubovány 16 hodin v médiu s 500 ng/ml sEng
- kontrolní skupina pro skupiny 40 ng/ml a 500 ng/ml – buňky byly inkubovány 16 hodin v médiu s 0,1% BSA v PBS

V případě těchto experimentálních skupin byly buňky po oplachu PBS inkubovány s trypsinem a po blokaci nespecifických vazebných míst následovala inkubace s myší monoklonální protilátkou anti-endoglin (P4A4, protilátku laskavě poskytl prof. Carmelo Bernabeu z CIB, Madrid) po dobu 1 hodiny při teplotě 4°C. U vzorků pro detekci exprese endoglinu následovala inkubace s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou kozí anti-myší Alexa 488 (A11001, Life Technologies) po dobu 45 minut při teplotě 4°C. Buňky nebyly fixovány ani permeabilizovány.

Expres sledovaných proteinů byla vyhodnocena za použití Cell Lab Quanta SC Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., California, USA). Výsledky byly hodnoceny pomocí softwaru Kaluza (Beckman Coulter) a získané hodnoty jsou prezentovány jako relativní index exprese, kde je počet pozitivních buněk násoben průměrem hodnot fluorescence a získané hodnoty jsou vztaženy ke kontrolní skupině.

## 4.5 Luminex analýza

Pro detekci solubilních forem proteinů byly buňky HUVEC ovlivněny sEng v koncentracích 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 16 a 48 hodin, médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS, následně byl odebrán supernatant a centrifugován při 13200RPM a teplotě 4°C po dobu 10 minut. K detekci proteinů BMP-4, BMP-2, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 byl použit komerčně dostupný kit Luminex Screening Assay (R&D Systems), který umožňuje detekci hned několika proteinů najednou.

Reakce probíhá v 96ti jamkové desce, kde každá jamka obsahuje směs barevných magnetických kuliček předem potažených směsí protilátek dle vlastního návrhu. Po přidání supernatantu – analytu dochází k navázání analytu na protilátku. Následuje přidání biotinylované protilátky a vzniká vazba protilátka-antigen. Poté je přidán streptavidin s navázaným phycoerythrinem, které se váží k biotinylované protilátce a zesilují tak reakci za vzniku signálu.

Měření bylo prováděno na Ústavu klinické imunologie a alergologie ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. K měření jsme využili Luminex BioPlex 200 System (Bio-Rad), který má v sobě zabudované dva lasery. První laser slouží ke snímání signálu fluorescence samotné kuličky a druhý snímá signál zesílený pomocí streptavidinu s phycoerythrinem. Signály byly vyhodnoceny pomocí softwaru BioPlex Manager 6.1 Software (Bio-Rad). Získané hodnoty byly vztaheny ke kontrolní skupině.

## 4.6 ELISA

Metodou ELISA jsme detekovali množství solubilních forem proteinů – endoglin, BMP4 a IL-6 v supernatantu buněk HUVEC.

Pro stanovení exprese sEng v supernatantu byly zavedeny následující skupiny:

- ATV 5  $\mu$ M – buňky byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti 5  $\mu$ M ATV, následovala 16 hodinová inkubace v médiu s 0,1% (v/v) DMSO
- TNF $\alpha$  – buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s 0,1% (v/v) DMSO, následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$
- ATV 5  $\mu$ M/TNF $\alpha$  – buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s ATV o koncentraci 5  $\mu$ M a s 0,1% (v/v) DMSO, pak následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$
- kontrolní skupina – buňky byly inkubovány 40 hodin s médiem s 0,1% (v/v) DMSO

Následně byl odebrán supernatant a centrifugován při 13200RPM a teplotě 4°C po dobu 10 minut. Pro detekci endoglinu byl použit komerčně dostupný kit Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (DNDG00, R&D Systems).

Pro stanovení exprese BMP4 a IL-6 byly buňky inkubovány se sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml, následně byl odebrán supernatant a centrifugován při 13200RPM a teplotě 4°C po dobu 10 minut. 48 hodinová inkubace byla zvolena pro detekci proteinu BMP-4, 24 hodin byly buňky inkubovány se sEng v médiu bez FBS pro detekci proteinu IL-6. K detekci proteinů byly použity komerčně dostupné kity Human BMP-4 Quantikine ELISA Kit (DBP400) a Quantikine Human IL-6 assay (D6050), oba zakoupené od firmy R&D Systems. Kultivace buněk pro analýzu proteinu



IL-6 a samotné měření bylo provedeno v laboratoři prof. Carmela Bernabeu v CIB v Madridu.

Signál byl vyhodnocen pomocí spektrofotometru a získané hodnoty byly vztaženy ke kontrolní skupině.

#### **4.7 Měření luciferázové aktivity**

Pro měření luciferázové aktivity byly buňky HEK293T ovlivněny sEng v koncentracích 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 48 hodin. Jako pozitivní kontrola byla použita stejná buněčná linie, která byla ovlivněna TNF $\alpha$  v koncentraci 5 ng/ml po dobu 24 hodin. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS.

Průběh transfekce: IL-6 vektor obsahuje IL-6 promotor a kóduje luciferázový reportérový gen. NF $\kappa$ B reportér kóduje luciferázový gen a je řízen regulační sekvencí obsahující motiv pro vazbu NF $\kappa$ B, a proto je citlivý k aktivaci NF $\kappa$ B. Plasmid pKBF-Luc/NF- $\kappa$ B obsahuje tři opakující se jednotky NF $\kappa$ B, které se nachází v H-2Kb genu, který byl vložen do herpes simplex genu thymidin kinázou. Konstrukt pGL3-IL-6-Luc reportéru řízený 651-bp promotorem fragmentu lidského IL-6 laskavě poskytl Dr. Manuel Fresno (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, Madrid). Přechodná kotransfekce z buněk HEK293T byla provedena za použití Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) přidáním 0,8  $\mu$ g pKBF promotoru luciferázového vektoru nebo pGL3-IL-6-Luc reportérového vektoru s 50 ng pCMV- $\beta$ gal vektoru (Clontech, Kalifornie, USA) k normalizaci účinnosti transfekce, vše provedeno dle instrukcí v manuálu výrobce.

48 hodin po transfekci a inkubaci buněk v přítomnosti sEng následovalo měření luminiscenční aktivity na přístroji Glomax multidetection system (Promega, Wisconsin, USA). Výsledek je prezentován jako poměr luminiscenční aktivity v buňkách inkubovaných v přítomnosti sEng a v buňkách kontrolních.

Kultivace buněk, transfekce i následné měření byly provedeny v rámci spolupráce s výzkumným centrem CIB v laboratoři prof. Carmela Bernabeu.

## 4.8 Statistické hodnocení

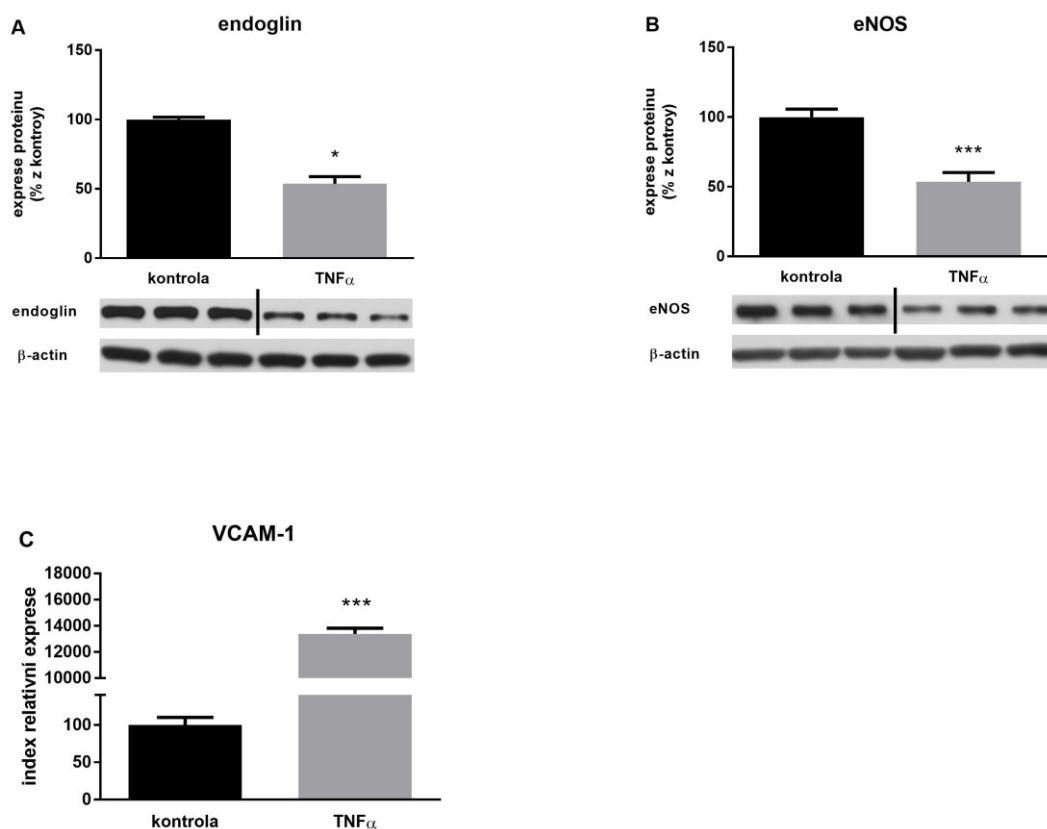
Statistické hodnocení bylo provedeno použitím softwaru GraphPad Prism 7.0 (Graph-Pad Software, Inc., California, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±směrodatná odchylka průměru (SEM, *standard error of mean*). Při porovnávání třech skupin byla data hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. Při porovnávání dvou skupin byla data hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. Pro určení statistických významností byla stanovena hladina  $P < 0,05$ .

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Zánět snižuje expresi membránového endoglinu a eNOS

Ateroskleróza je považována za zánětlivé onemocnění, proto jsme jako model zánětu zvolili ovlivnění buněk TNF $\alpha$ .

Zjistili jsme, že podávání TNF $\alpha$  v koncentraci 10 ng/ml po dobu 16 hodin mělo za následek signifikantní snížení exprese membránového endoglinu (Obr. 8A) a eNOS (Obr. 8B) na proteinové úrovni u endotelových buněk HUVEC. Abychom potvrdili zánětlivý efekt TNF $\alpha$ , provedli jsme analýzu VCAM-1 použitím průtokové cytometrie, kde došlo k signifikantnímu nárůstu exprese tohoto proteinu (Obr. 8C).

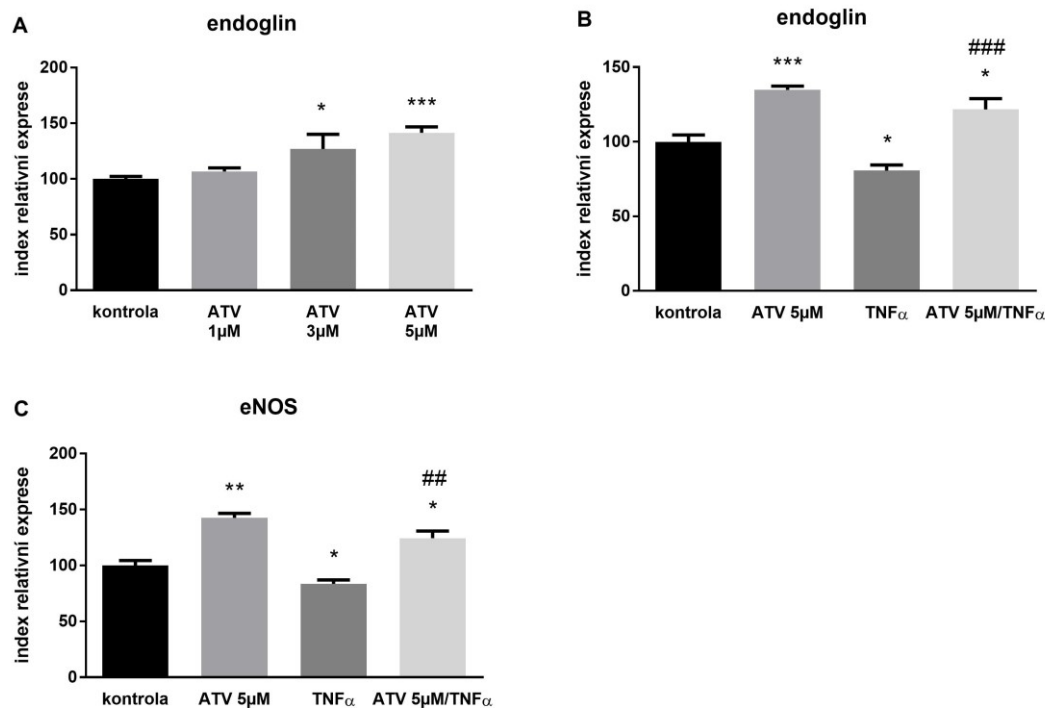


**Obrázek 8: Expres membránového endoglinu, eNOS a VCAM-1 po ovlivnění buněk HUVEC TNF $\alpha$  cytokinem.** Buňky byly kultivovány v médiu s 10 ng/ml TNF $\alpha$  po dobu 16 hodin. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% (v/v) DMSO. Byla provedena WB analýza exprese membránového endoglinu (A) a eNOS (B). Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 6 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem představuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce  $\beta$ -actinu. Byla provedena i průtoková cytometrie, exprese proteinu VCAM-1 byla měřena po 16 hodinách inkubace s 10 ng/ml TNF $\alpha$  (C). Data jsou prezentována jako index relativní exprese, což vyjadřuje počet pozitivních buněk ve stanovovaném vzorku násobený střední intenzitou fluorescence, vztaženo ke kontrolní skupině. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 6 vzorků pro každou skupinu. Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SEM. Data byla hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou.

## **5.2 Atorvastatin zvyšuje expresi membránového endoglinu a eNOS a brání poklesu exprese membránového endoglinu a eNOS u buněk ovlivněných TNF $\alpha$**

Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali expresi membránového endoglinu a eNOS u buněk ovlivněných ATV, dále jsme sledovali expresi membránového endoglinu a eNOS u buněk ovlivněných kombinací ATV a TNF $\alpha$ .

Po provedení koncentrační závislosti exprese membránového endoglinu na ATV jsme zjistili, že k signifikantnímu nárůstu exprese membránového endoglinu dochází při koncentraci 5  $\mu$ M ATV (Obr. 9A). Proto jsme tuto koncentraci zvolili do kombinace s TNF $\alpha$  (10 ng/ml) a zjistili jsme, že dochází k signifikantnímu nárůstu exprese membránového endoglinu, a to jak v porovnání s kontrolní skupinou, tak i se skupinou ovlivněnou pouze TNF $\alpha$ , zároveň došlo k signifikantnímu poklesu membránového endoglinu po ovlivnění buněk jen 10 ng/ml TNF $\alpha$  (Obr. 9B), čímž jsme potvrdili výsledky předchozího experimentu – WB analýzy (Obr. 8A). Po ovlivnění buněk kombinací 5  $\mu$ M ATV s 10 ng/ml TNF $\alpha$  (ATV5 $\mu$ M/TNF $\alpha$ ) došlo i signifikantnímu nárůstu exprese eNOS, a to jak v porovnání s kontrolní skupinou, tak i se skupinou ovlivněnou pouze TNF $\alpha$ , zároveň došlo k signifikantnímu poklesu eNOS po ovlivnění buněk jen 10 ng/ml TNF $\alpha$  (Obr. 9C).

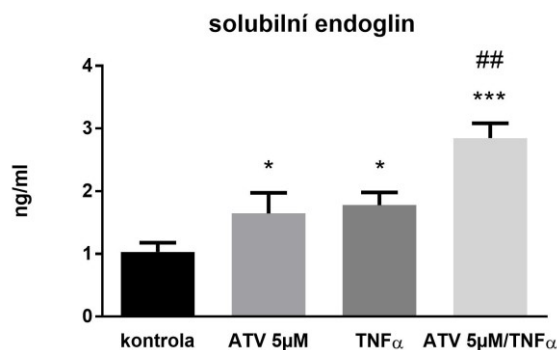


**Obrázek 9: Efekt ATV a TNF $\alpha$  na expresi membránového endoglinu a eNOS, hodnoceno metodou průtokové cytometrie.** Expres membránového endoglinu (A). Buňky byly inkubovány v přítomnosti ATV o koncentraci 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M a 5  $\mu$ M po dobu 24 hodin, pak následovala 16 hodinová inkubace buněk v médiu s 0,1% (v/v) DMSO. Expres membránového endoglinu (B) a eNOS (C). Pro skupinu ATV 5  $\mu$ M platí, že buňky byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti ATV, následovala 16 hodinová inkubace v médiu s 0,1% (v/v) DMSO. Pro skupinu TNF $\alpha$  platí, že buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s 0,1% (v/v) DMSO, následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$ . A pro skupinu ATV 5  $\mu$ M/TNF $\alpha$  platí, že buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s ATV o koncentraci 5  $\mu$ M a s 0,1% (v/v) DMSO, pak následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$ . Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% (v/v) DMSO (A, B, C). Byly provedeny dva na sobě nezávislé experimenty s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Data jsou prezentována jako index relativní exprese, což vyjadřuje počet pozitivních buněk ve stanovovaném vzorku násobený střední intenzitou fluorescence, vztaženo ke kontrolní skupině. Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SEM. Data byla hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou. ##P<0,01, ###P<0,001 v porovnání se skupinou ovlivněnou TNF $\alpha$ .

### **5.3 Společný efekt atorvastatinu a TNF $\alpha$ na hladiny solubilního endoglinu**

Pro stanovení exprese sEng v kultivačním médiu jsme použili metodu ELISA. Sledovali jsme expresi sEng po ovlivnění buněk ATV, TNF $\alpha$  nebo po kombinaci ATV5 $\mu$ M/TNF $\alpha$ .

Výsledky ukázaly, že došlo k signifikantnímu nárůstu exprese tohoto markeru i po ovlivnění buněk ATV o koncentraci 5  $\mu$ M také po působení TNF $\alpha$  o koncentraci 10 ng/ml. Navíc jsme zjistili, že po ovlivnění buněk kombinací ATV5 $\mu$ M/TNF $\alpha$  došlo k signifikantnímu nárůstu exprese sEng ve srovnání s kontrolou a TNF $\alpha$ . (Obr. 10).



**Obrázek 10: Efekt ATV a TNF $\alpha$  na hladiny sEng.** Pro skupinu ATV 5  $\mu$ M platí, že buňky byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti ATV, následovala 16 hodinová inkubace v médiu s 0,1% (v/v) DMSO. Pro skupinu TNF $\alpha$  platí, že buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s 0,1% (v/v) DMSO, následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$ . A pro skupinu ATV 5  $\mu$ M/TNF $\alpha$  platí, že buňky byly inkubovány 24 hodin v médiu s ATV o koncentraci 5  $\mu$ M a s 0,1% (v/v) DMSO, pak následovala 16 hodinová inkubace v prostředí 10 ng/ml TNF $\alpha$ . Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% (v/v) DMSO. Byly provedeny dva na sobě nezávislé experimenty s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Výsledek je uveden v ng/ml supernatantu. Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SEM. Data byla hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou. ##P<0,01 v porovnání se skupinou ovlivněnou TNF $\alpha$ .



## 5.4 Vliv rekombinantního lidského endoglinu na markery zánětu a adhezní molekuly

Sledovali jsme expresi markerů zánětu *NFKB3* (NFκB), *IL6* (IL-6), *PTGS2* (COX-2), *CCL2* (MCP-1) a adhezních molekul *VCAMI* (VCAM-1), *ICAMI* (ICAM-1) po ovlivnění sEng pomocí qRT-PCR analýzy, měřili jsme transkripční aktivitu vybraných molekul, a pomocí WB, Luminex a ELISA analýzy jsme sledovali expresi markerů na proteinové úrovni.

Zjistili jsme, že ovlivnění buněk sEng v koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml má za následek aktivaci NFκB promotorového vektoru, což znamená, že sEng stimuluje jeho transkripční aktivitu (Obr. 11A). Došlo i k signifikantnímu nárůstu exprese *NFKB3* (NFκB gen) na úrovni mRNA v přítomnosti 40 ng/ml a 500 ng/ml sEng (Obr. 11B). Po 48 hodinové inkubaci buněk se sEng v koncentraci 500 ng/ml došlo také k signifikantnímu nárůstu exprese fosforylované formy proteinu NFκB (Obr. 11C).

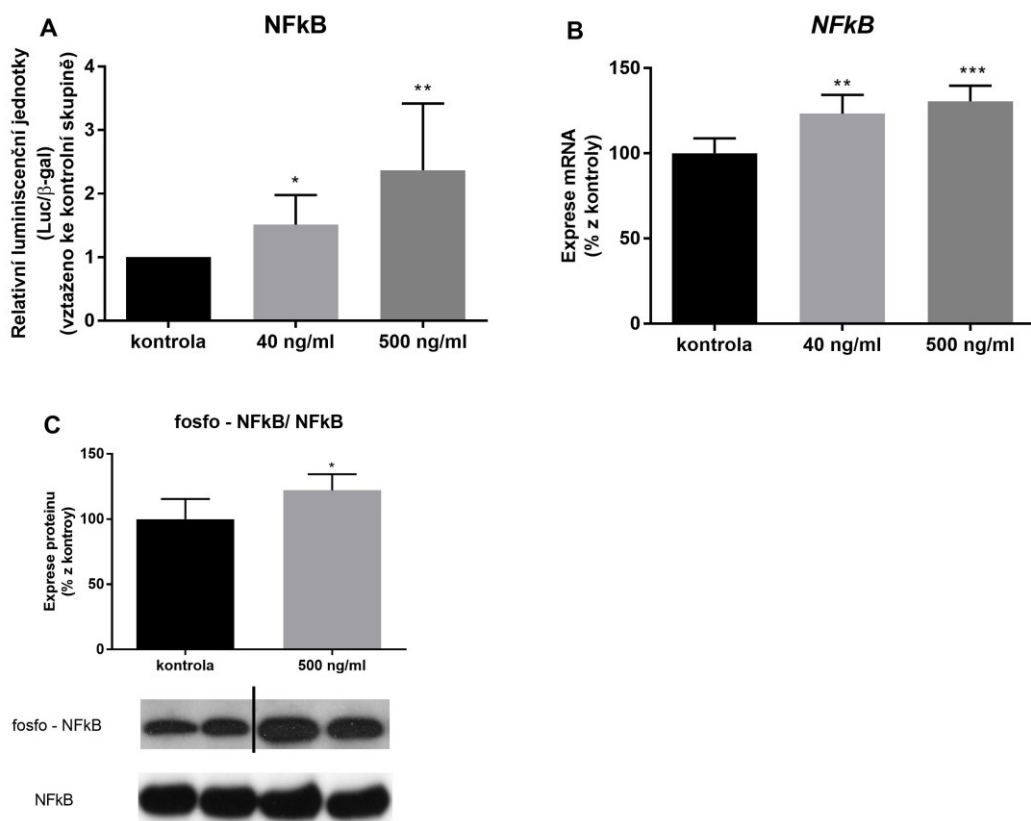
Zaznamenali jsme signifikantní nárůst exprese *VCAMI* mRNA po 3 hodinové inkubaci se 40 ng/ml sEng (Obr. 12A) a po 16 hodinové inkubaci s koncentrací 500 ng/ml sEng (Obr. 12B). Buňky byly inkubovány 16 hodin i pro stanovení exprese proteinu, ale ani WB analýza (Obr. 12C) ani Luminex analýza (Obr. 12D) nepotvrdily zvýšenou expresi VCAM-1. Dokonce ani 48 hodinová inkubace a následná Luminex analýza (Obr. 12E) zvýšenou expresi této adhezní molekuly nepotvrdily.

Druhou ze sledovaných adhezních molekul byl ICAM-1. K signifikantnímu nárůstu genové exprese došlo pouze po 3 hodinovém ovlivnění buněk sEng v koncentraci 40 ng/ml (Obr. 13A) a po 16 hodinové inkubaci s koncentrací 500 ng/ml sEng (Obr. 13B). Byla provedena i Luminex analýza, která ale nepotvrdila signifikantní nárůst exprese ICAM-1 na proteinové úrovni (Obr. 13C, 13D).

sEng je také stimuluje transkripční aktivitu genu *IL6*, a to po ovlivnění buněk v koncentracích 40 ng/ml i 500 ng/ml (Obr. 14A). Zaznamenali jsme i signifikantní nárůst exprese IL-6 mRNA (Obr. 14B), ale i na úrovni proteinu (Obr. 14C).

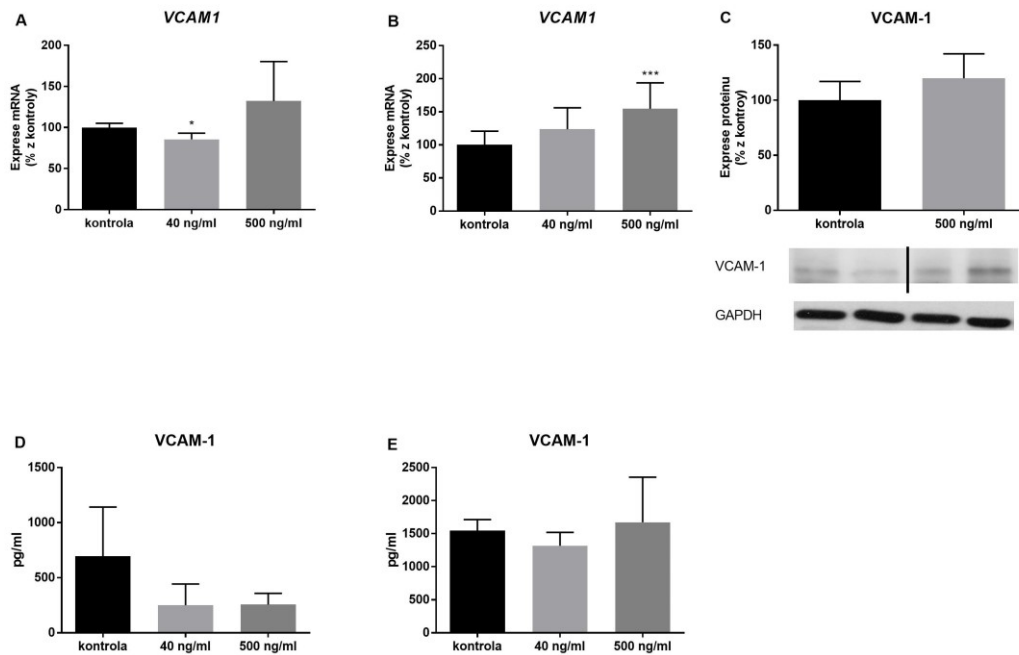
Dalším z markerů zánětu je i COX-2. Jeho exprese na úrovni mRNA byla signifikantně zvýšena po ovlivnění buněk sEng v koncentraci 500 ng/ml po dobu 3 hodin (Obr. 15A), po 16 hodinové inkubaci došlo k signifikantnímu nárůstu, a to jak po 40 ng/ml, tak i po 500 ng/ml (Obr. 15B). WB analýza však nepotvrdila zvýšenou expresi tohoto markeru na proteinové úrovni (Obr. 15C).

sEng neměl vliv na expresi MCP-1, dalšího z markerů zánětu, a to ani jak na úrovni exprese genu, tak i proteinu (Obr. 16A, 16B, 16C).

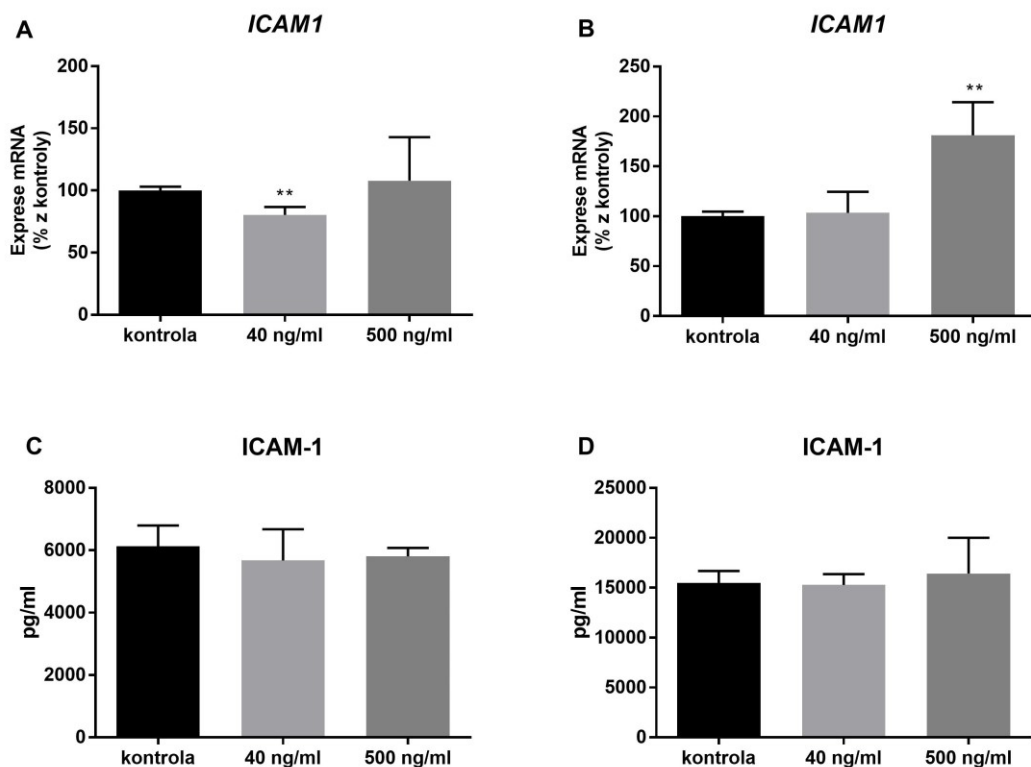


**Obrázek 11: Aktivita a stanovení genové exprese a množství proteinu NFkB3 (NFkB) v buňkách HEK293T a buňkách HUVEC.** Buňky HEK293T byly transfekovány pGL2-KBF-luc reportérovým vektorem a inkubovány 24 hodin v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml (A). Výsledky jsou prezentovány jako násobky kontroly. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Expres mRNA *NFkB3* (B). Buňky HUVEC byly inkubovány 16 hodin v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml. Obrázek 10B je reprezentativní graf, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Expres proteinu NFkB a jeho fosforylované formy (C). Buňky byly inkubovány v prostředí 500 ng/ml sEng po dobu 48 hodin. Následně byla provedena WB analýza. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem pak znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM.

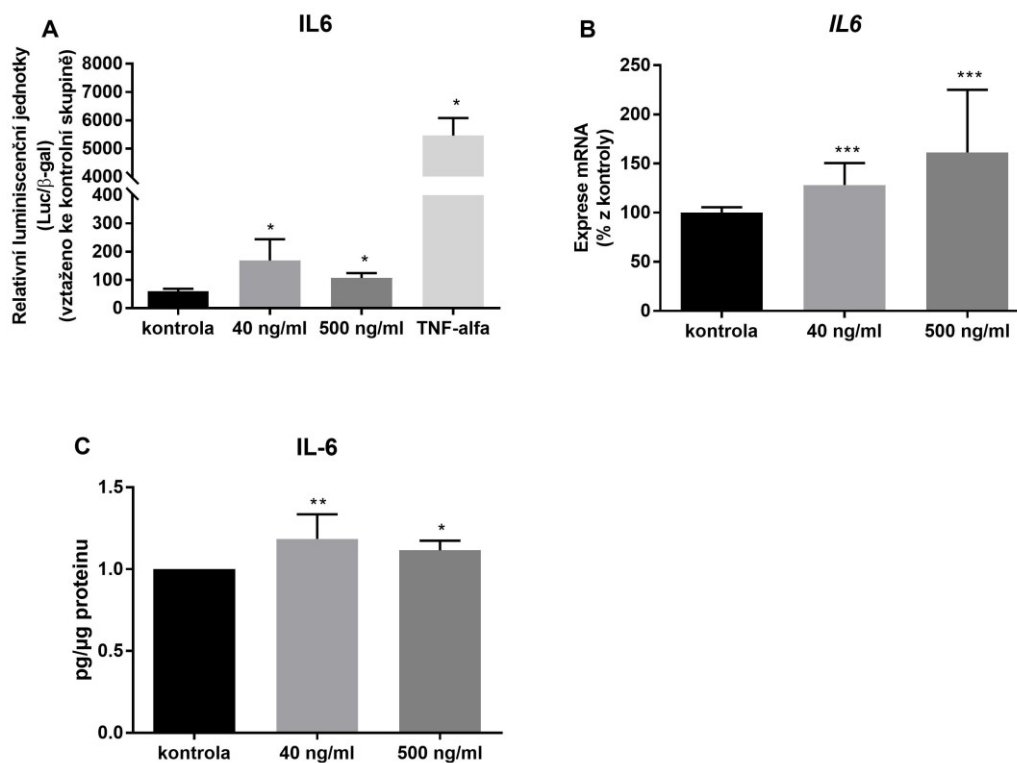
Při porovnávání třech skupin byla data hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. Při porovnávání dvou skupin byla data hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  v porovnání s kontrolní skupinou.



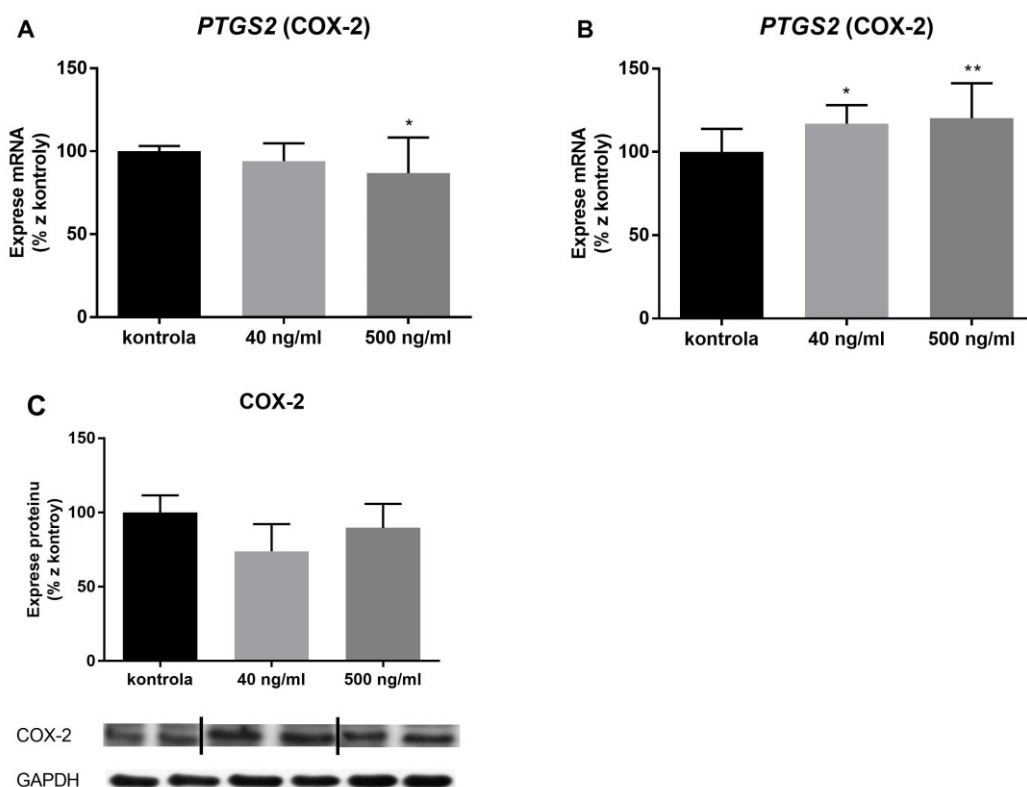
**Obrázek 12: Stanovení genové exprese a množství proteinu VCAM1 (VCAM-1) v buňkách HUVEC.** Pro analýzu exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Exprese proteinu VCAM-1 (C). Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Byla provedena i Luminex analýza, exprese proteinu VCAM-1 byla měřena po 16 hodinách (D) a 48 hodinách (E) inkubace se 40 ng/ml a 500 ng/ml sEng. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B, C, D, E). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Při porovnávání třech skupin byla data hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. Při porovnávání dvou skupin byla data hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou.



**Obrázek 13: Stanovení genové exprese a množství proteinu ICAM1 (ICAM-1) v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Expres proteinu ICAM-1 byla měřena pomocí Luminex analýzy, a to po 16 hodinách (C) a 48 hodinách (D) inkubace se 40 ng/ml a 500 ng/ml sEng. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B, C, D). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. \*\*P<0,01 v porovnání s kontrolní skupinou.

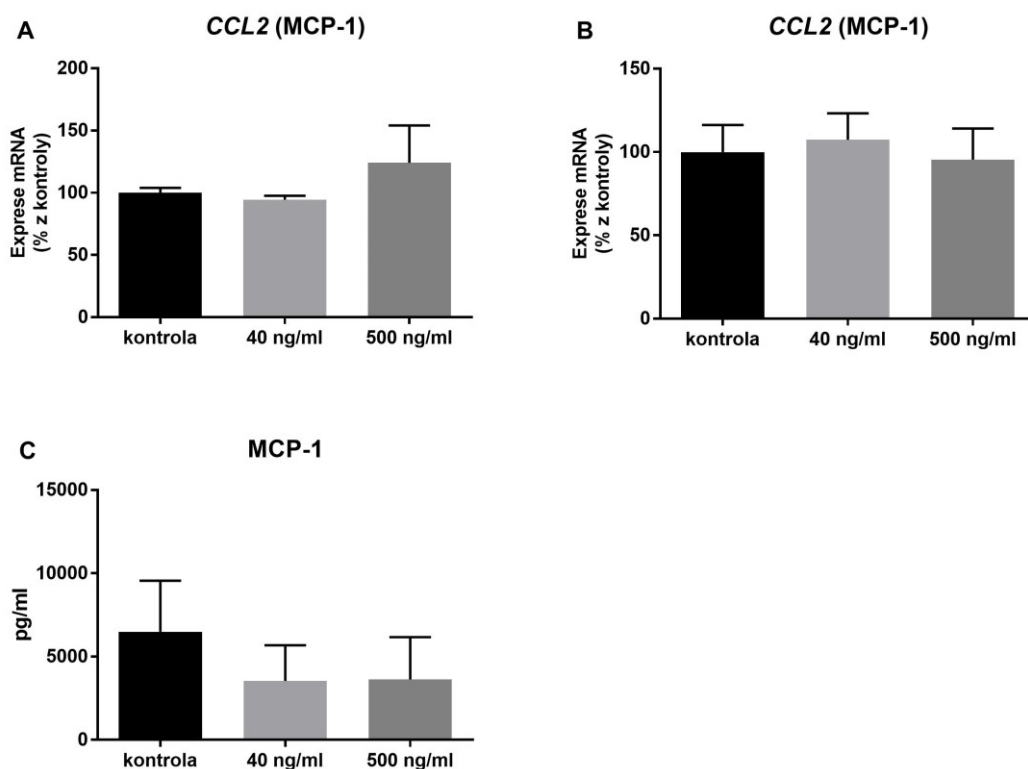


**Obrázek 14: Aktivita a stanovení genové exprese a množství proteinu IL6 (IL-6) v buňkách HEK293T a buňkách HUVEC.** Buňky HEK293T byly transfekovány pGL2-KBF-luc reportérovým vektorem a inkubovány 24 hodin v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml (A). Výsledky jsou prezentovány jako násobky kontroly. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Expresse mRNA *IL6* (B). Buňky HUVEC byly inkubovány 16 hodin v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml. Obrázek 13B je reprezentativní graf, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Expresse proteinu IL-6 byla měřena pomocí ELISA analýzy (C). Výsledek je uveden v pg/ $\mu$ g proteinu v supernatantu. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B, C). Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou.



**Obrázek 15: Stanovení genové exprese a množství proteinu *PTGS2 (COX-2)* v buňkách *HUVEC*.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Expres proteinu *COX-2* (C). Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem představuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce *GAPDH*. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B, C). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  v porovnání s kontrolní skupinou.



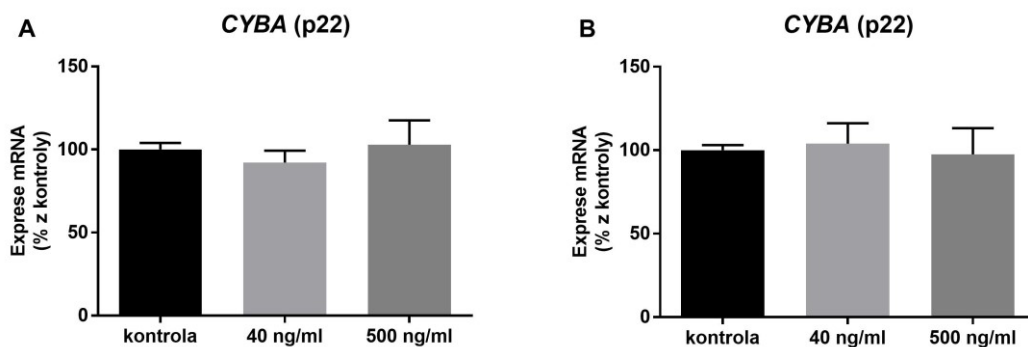


**Obrázek 16: Stanovení genové exprese a množství proteinu CCL2 (MCP-1) v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Exprese proteinu MCP-1 byla měřena pomocí Luminex analýzy (C). Výsledek je uveden v pg/ml supernatantu. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B, C). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem.

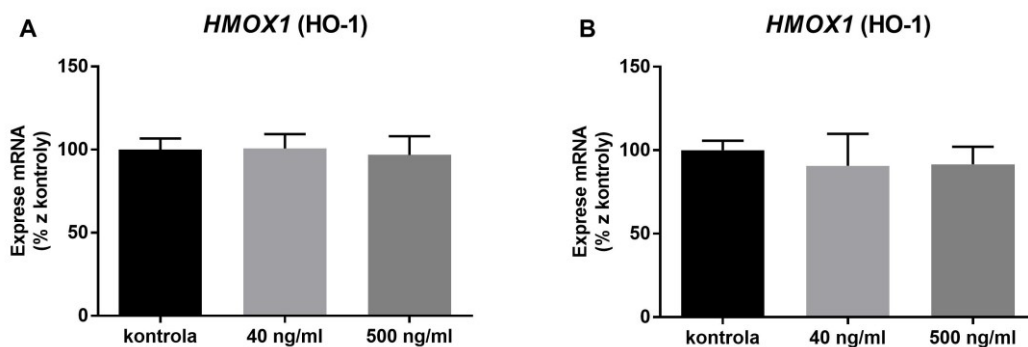
## **5.5 Vliv rekombinantního lidského endoglinu na markery oxidačního stresu**

Pro stanovení exprese markerů oxidačního stresu jsme použili qRT-PCR analýzu. Hodnotili jsme vliv sEng na vybrané markery – *HMOX1* (HO-1) a *CYBA* (p22-PHOX).

Buňky byly inkubovány v prostředí sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 a 16 hodin. Ani u jednoho z uvedených markerů jsme však nezaznamenali signifikantní změnu exprese mRNA (Obr. 17, 18).



**Obrázek 17: Genová exprese CYBA (p22-PHOX) v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem.



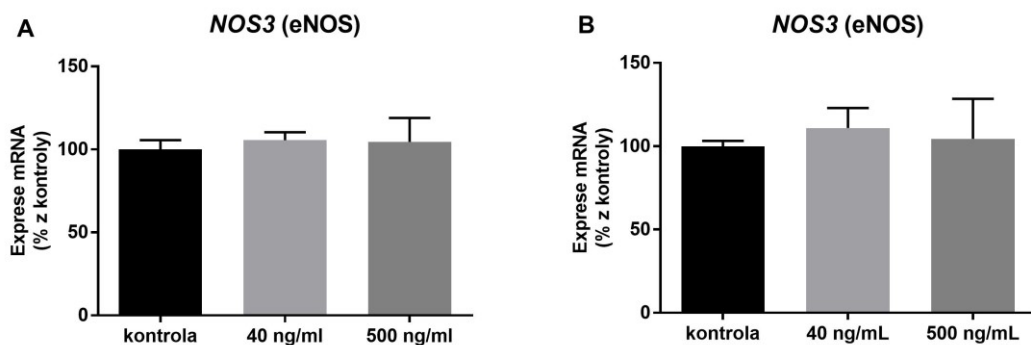
**Obrázek 18: Genová exprese HMOX1 (HO-1) v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem.

## 5.6 Vliv rekombinantního lidského endoglinu na expresi eNOS

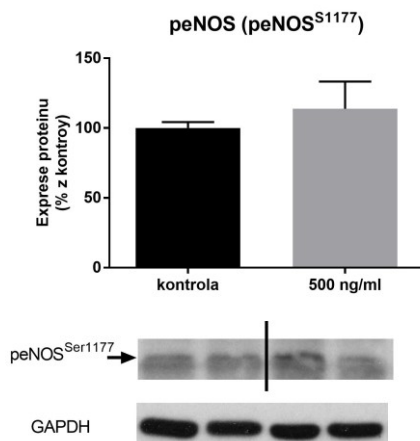
Pro stanovení exprese *NOS3* (eNOS) a její fosforylované formy eNOS<sup>Ser1177</sup> (peNOS<sup>Ser1177</sup>) v buňkách HUVEC jsme zvolili qRT-PCR a WB analýzu.

Pomocí qRT-PCR jsme zjistili, že sEng v koncentracích 40 ng/ml a 500 ng/ml neovlivňuje expresi *NOS3*, a to ani po 3 hodinové (Obr. 19A) ani po 16 hodinové (Obr. 19B) inkubaci.

WB analýza potvrdila výsledky qRT-PCR analýzy, po inkubaci HUVEC v prostředí sEng o koncentraci 500 ng/ml nedošlo k signifikantnímu nárůstu exprese peNOS<sup>Ser1177</sup> (Obr. 20).



**Obrázek 19: Genová exprese NOS3 v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem.



**Obrázek 20: Hodnocení peNOS<sup>Ser1177</sup> v buňkách HUVEC po ovlivnění sEng o koncentraci 500 ng/ml.** Buňky byly inkubovány v přítomnosti sEng 16 hodin. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem.

## **5.7 Vliv rekombinantního lidského endoglinu na membránový endoglin**

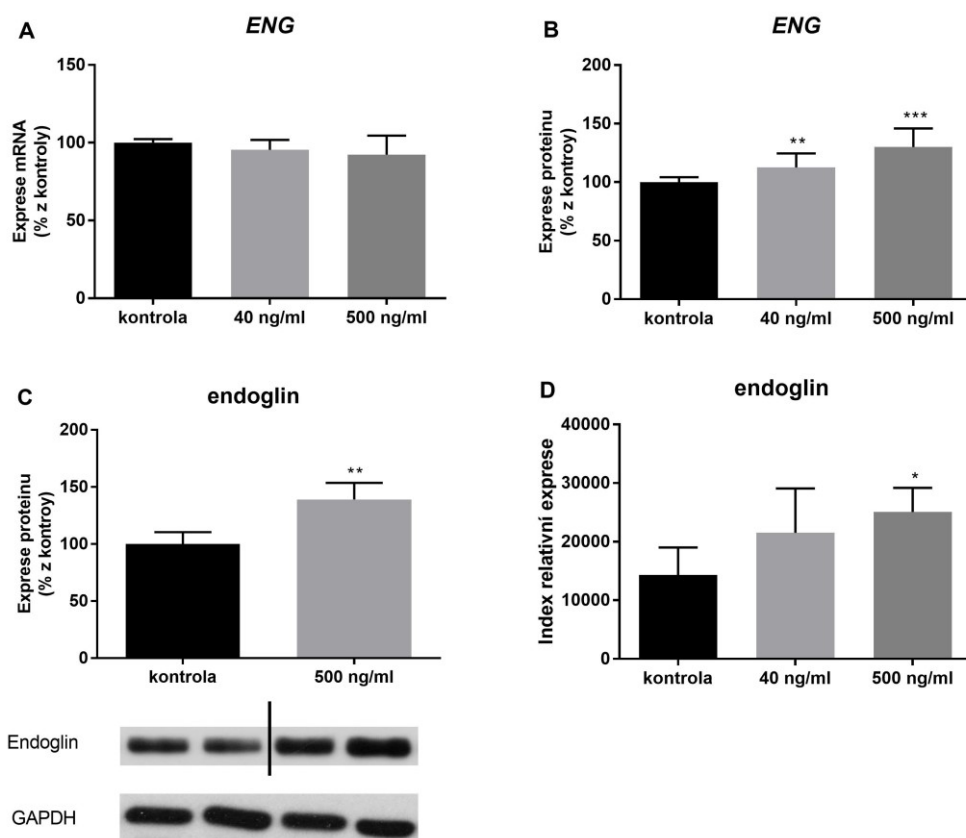
qRT-PCR, WB analýzu a průtokovou cytometrii jsme využili pro sledování exprese membránového endoglinu u primární buněčné kultury HUVEC po ovlivnění sEng. Buňky HUVEC byly inkubovány v prostředí sEng o koncentraci 40 ng/ml a/nebo 500 ng/ml.

3 hodinová inkubace se ukázala jako nedostatečná pro zvýšení exprese mRNA (Obr. 21A).

Následkem 16 hodinové inkubace však došlo k signifikantnímu nárůstu mRNA, a to jak po 40 ng/ml, tak i po 500 ng/ml sEng (Obr. 21B).

WB analýza (Obr. 21C) i průtoková cytometrie (Obr. 21D) potvrdily signifikantní nárůst exprese na úrovni proteinu, a to po ovlivnění 500 ng/ml sEng.





**Obrázek 21: Stanovení genové exprese a množství proteinu membránového endoglinu v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Expres membránového endoglinu po ovlivnění sEng o koncentraci 500 ng/ml (C). Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Expresi endoglinu jsme měřili i použitím průtokové cytometrie, a to po 16 hodinové inkubaci se sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml (D). Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Data jsou prezentována jako index relativní exprese, což vyjadřuje počet pozitivních buněk ve stanovovaném vzorku násobený střední intenzitou fluorescence, vztaženo ke kontrolní skupině. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo

0,1% BSA v PBS (A, B, C, D). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Při porovnávání třech skupin byla data hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. Při porovnávání dvou skupin byla data hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou.

## 5.8 Vliv rekombinantního lidského endoglinu na TGF- $\beta$ signalizaci

Sledovali jsme i expresi členů TGF- $\beta$  signalizační kaskády – ACVRL1 (ALK-1), *TGFBR1* (ALK-5), *TGFBR2* (TGF $\beta$ RII), *BMPR2* (BMPR-2), pSmad2/3, pSmad1/5, *SERPINE1* (PAI-1), *IDI* (ID-1), *BMP2* (BMP-2), *BMP4* (BMP-4) po ovlivnění buněk HUVEC sEng v koncentracích 40 ng/ml a/nebo 500 ng/ml. qRT-PCR analýzu jsme použili pro sledování exprese mRNA, WB, Luminex, ELISA analýzu pro stanovení exprese proteinu vybraných molekul.

3 hodinová inkubace buněk v přítomnosti sEng neměla vliv na změnu exprese mRNA *ACVRL1* (Obr. 22A), ale zaznamenali jsme signifikantní nárůst exprese mRNA po 16 hodinové inkubaci, a to jak po 40 ng/ml tak i po 500 ng/ml sEng (Obr. 22B).

Při ovlivnění buněk sEng v koncentraci 500 ng/ml po dobu 3 hodin došlo k signifikantnímu poklesu mRNA *TGFBR1* (Obr. 23A), ale po 16 hodinové inkubaci již k signifikantní změně nebyla pozorována (Obr. 23B).

Při stanovení exprese mRNA *TGFBR2* jsme buňky inkubovali v prostředí sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 a 16 hodin, ale pouze po 3 hodinové inkubaci buněk s 500 ng/ml sEng došlo k signifikantnímu poklesu mRNA (Obr. 24A). 16 hodinová inkubace již neměla vliv na změnu exprese (Obr. 24B).

K signifikantní změně exprese došlo při inkubaci buněk v prostředí 500 ng/ml sEng, po 3 hodinové inkubaci jsme zaznamenali signifikantní pokles exprese mRNA *BMPR2* (Obr. 25A), po 16 hodinové inkubaci došlo naopak k signifikantnímu nárůstu mRNA (Obr. 25B). WB analýza nepotvrdila výsledky qRT-PCR, po 16 hodinovém ovlivnění buněk v prostředí 500 ng/ml sEng nedošlo k signifikantní změně exprese BMPR-2 na úrovni proteinu (Obr. 25C). Po 48 hodinách inkubace buněk v přítomnosti 500 ng/ml sEng došlo dokonce k poklesu BMPR-2 (Obr. 25D).

Pro stanovení exprese pSmad2/3 jsme použili WB analýzu. Po inkubaci buněk s 500 ng/ml sEng po dobu 16 hodin došlo k signifikantnímu nárůstu exprese tohoto proteinu (Obr. 26).

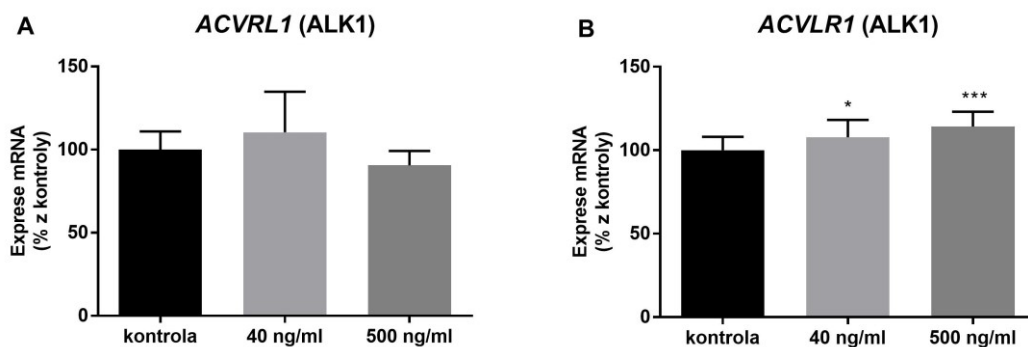
Pro stanovení pSmad1/5 jsme také použili WB analýzu. Avšak po inkubaci buněk s 500 ng/ml sEng nedošlo k signifikantní změně exprese tohoto proteinu (Obr. 27).

Po 16 hodinách inkubace neměl sEng vliv ani na změnu exprese *SERPINE1*, genu kódujícího protein PAI-1 (Obr. 28).

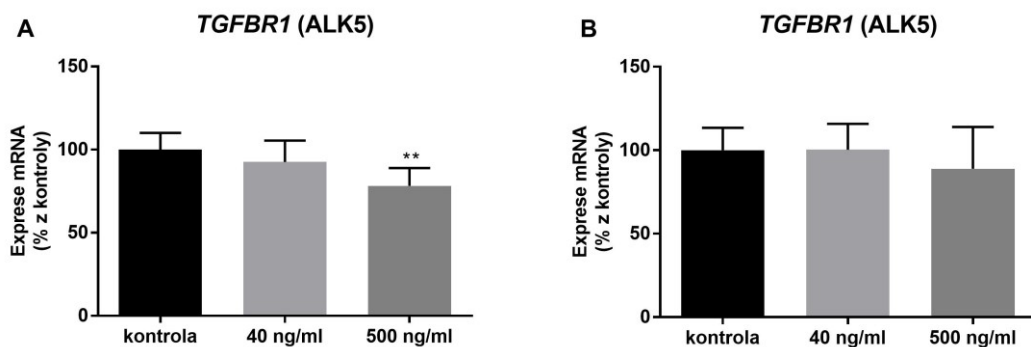
Překvapující byl výsledek qRT-PCR analýzy genu *IDI*. Po 16 hodinové inkubaci buněk v přítomnosti 500 ng/ml sEng došlo k signifikantnímu nárůstu mRNA tohoto genu (Obr. 29A). Avšak WB analýza tento výsledek nepotvrdila, naopak po 16 hodinové inkubaci buněk v přítomnosti 500 ng/ml sEng došlo k signifikantnímu poklesu exprese proteinu ID-1 (Obr. 29B).

Luminex analýza neprokázala vliv sEng na expresi proteinu BMP-2 ani po 16, ani po 48 hodinách inkubace (Obr. 30A, 30B).

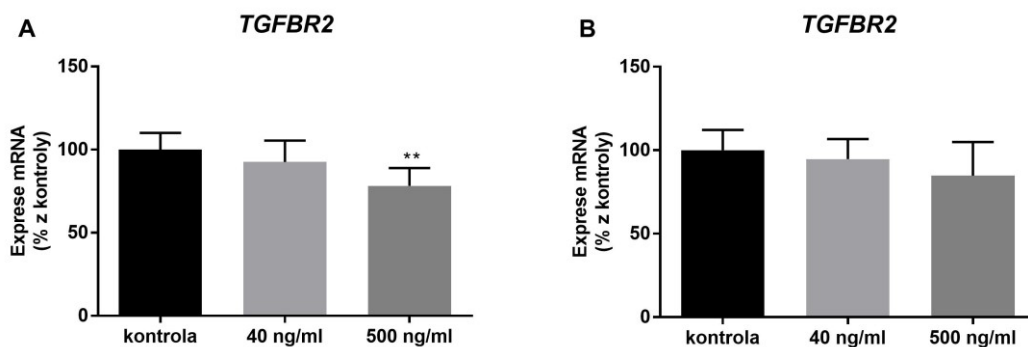
Signifikantní změnu exprese jsme nezaznamenali ani u BMP-4, a to jak v případě qRT-PCR analýzy (Obr. 31A), tak i u Luminex analýzy – pro detekci exprese proteinu BMP-4 byly buňky inkubovány 16 hodin (Obr. 31B) a 48 hodin (Obr. 31C) v prostředí sEng. Signifikantní změny nebyly pozorovány ani v případě ELISA analýzy (Obr. 31D).



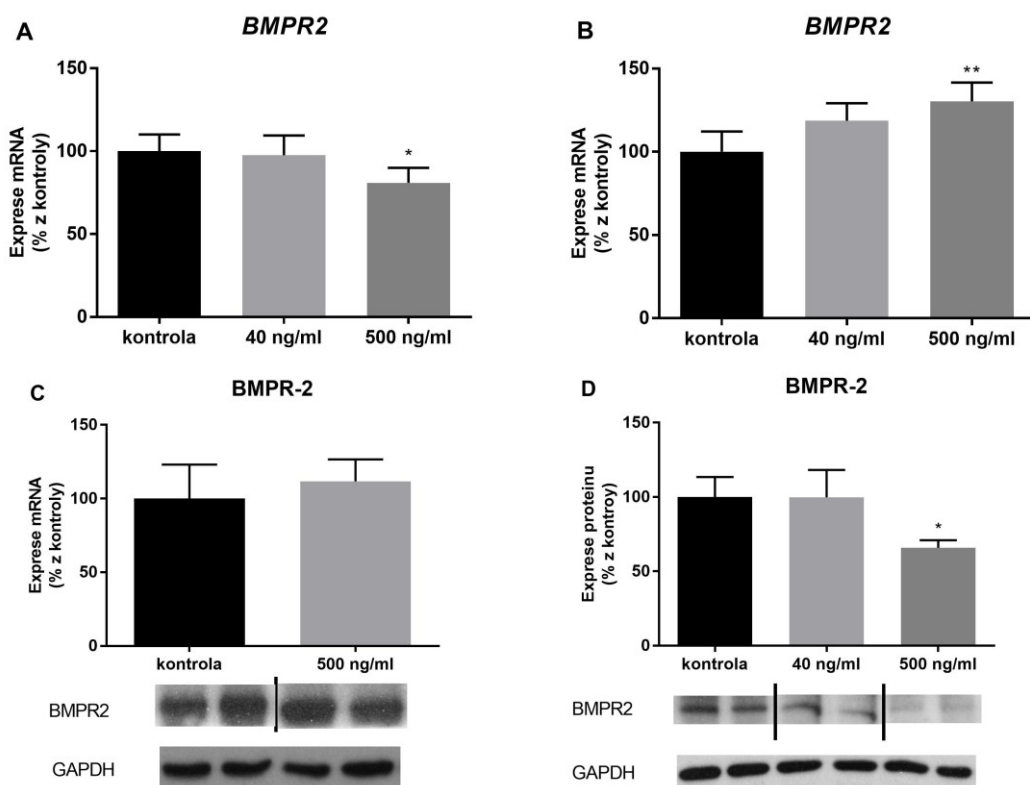
**Obrázek 22: Genová exprese ACVLR1 (ALK-1) v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou.



**Obrázek 23: Genová exprese TGFBR1 (ALK-5) v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. \*\*P<0,01 v porovnání s kontrolní skupinou.

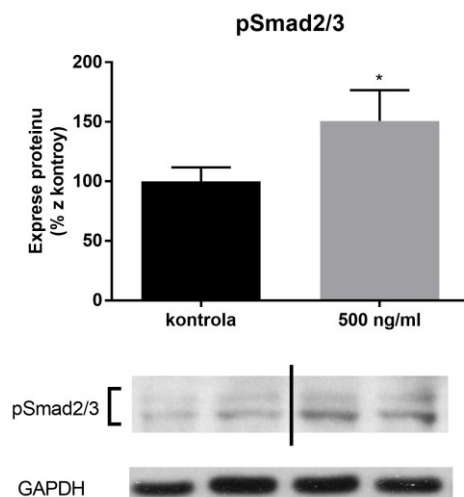


**Obrázek 24: Genová exprese TGFBR2 v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. \*\*P<0,01 v porovnání s kontrolní skupinou.

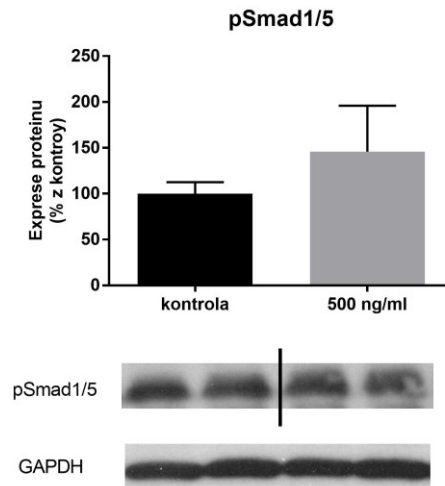


**Obrázek 25: Stanovení genové exprese a množství proteinu BMPR2 (BMPR-2) v buňkách HUVEC.** Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 3 hodin (A) a 16 hodin (B). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Pro WB analýzu byly buňky ovlivněny sEng o koncentraci 500 ng/ml po dobu 16 hodin (C) nebo 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 48 hodin (D). Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem pak znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B, C, D). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Při porovnávání třech skupin byla data hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. Při porovnávání dvou skupin byla data hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \*P<0,05, \*\*P<0,01 v porovnání s kontrolní skupinou.

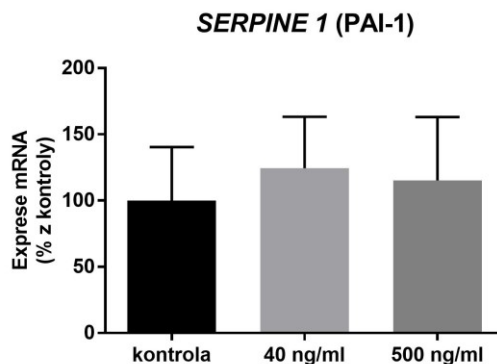




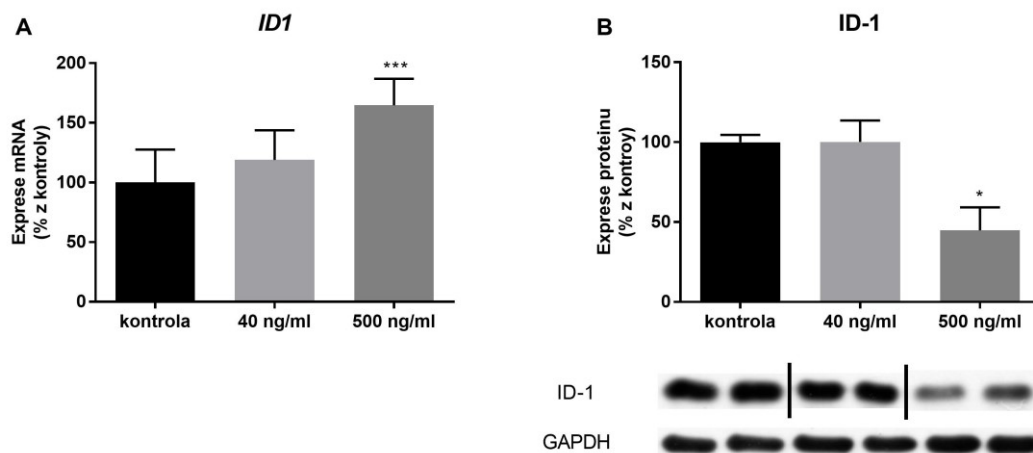
**Obrázek 26: Hodnocení exprese pSmad2/3 v buňkách HUVEC po ovlivnění sEng o koncentraci 500 ng/ml.** Buňky byly inkubovány v přítomnosti sEng 16 hodin. Následně byla provedena WB analýza proteinu. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem. \*P<0,05 v porovnání s kontrolní skupinou.



**Obrázek 27: WB analýza exprese pSmad1/5 v buňkách HUVEC po ovlivnění sEng o koncentraci 500 ng/ml.** Buňky byly inkubovány v přítomnosti sEng 16 hodin. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena neparametrickým Mann-Whitney testem.

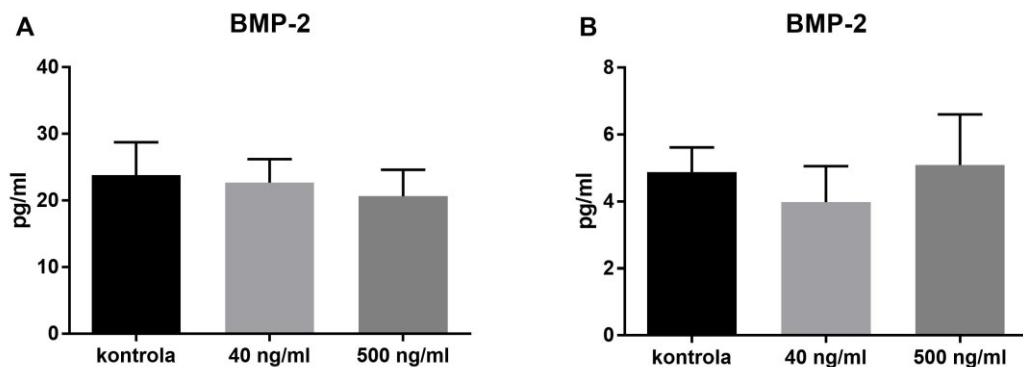


**Obrázek 28: Stanovení genové exprese *SERPINE1* (*PAI-1*) v buňkách *HUVEC*.** Pro analýzu exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 16 hodin. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem.

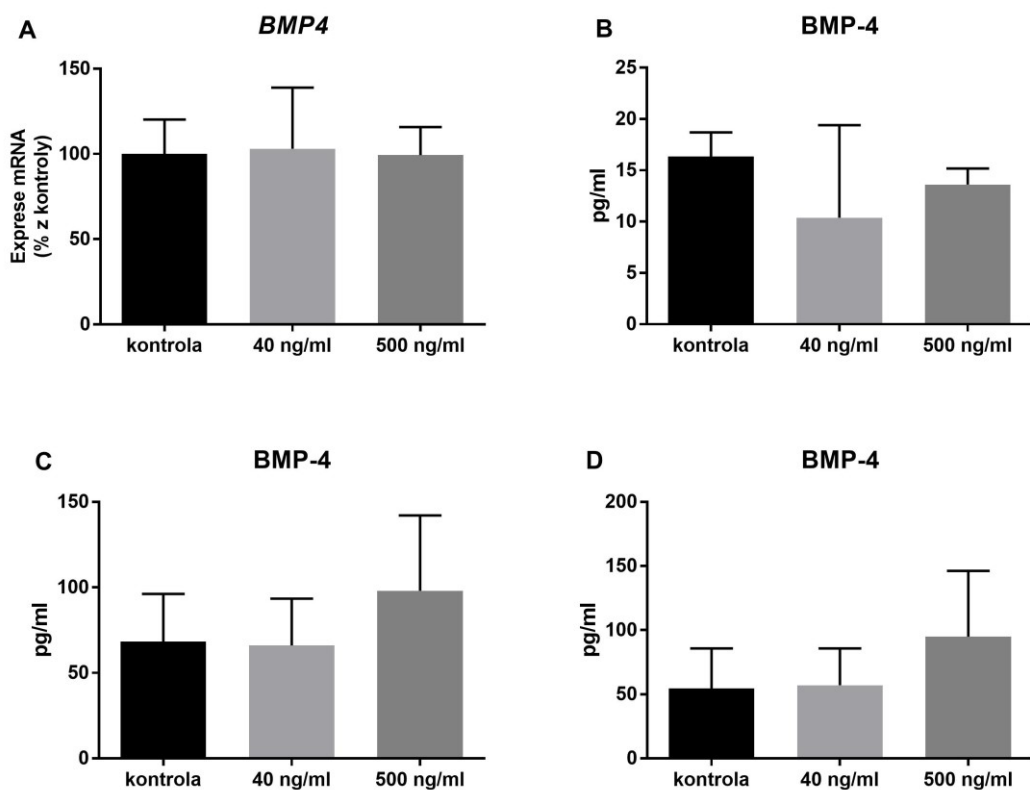


**Obrázek 29: Stanovení genové exprese a množství proteinu ID-1 v buňkách HUVEC.**

Pro stanovení exprese mRNA byly buňky inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 16 hodin (A). Obrázky grafů qRT-PCR analýzy jsou reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Pro WB analýzu byly buňky ovlivněny sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 16 hodin (B). Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 9 vzorků pro každou skupinu. Graf znázorňuje výsledky denzitometrické analýzy, kde je kontrolní skupina vyjádřena jako 100%, obrázek pod grafem znázorňuje reprezentativní immunoblot. Stejnou nanášku proteinu jsme potvrdili pomocí detekce GAPDH. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Při porovnávání třech skupin byla data hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolní skupinou.



**Obrázek 30: Stanovení množství proteinu BMP-2 v buňkách HUVEC Luminex analýzou.** Buňky byly inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 16 hodin (A) a 48 hodin (B). Grafy znázorňují množství proteinu v pg/ml supernatantu. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data byla hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem.



**Obrázek 31: Stanovení genové exprese a množství proteinu BMP-4 v buňkách HUVEC.** Buňky byly inkubovány v přítomnosti sEng o koncentraci 40 ng/ml a 500 ng/ml po dobu 16 hodin pro qRT-PCR analýzu (A). Obrázek znázorňující expresi mRNA je reprezentativní, bylo provedeno šest na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 18 vzorků pro každou skupinu. Expresce BMP-4 na úrovni proteinu byla hodnocena analýzou Luminex, a to po 16 hodinách (B) a 48 hodinách (C) inkubace se sEng. Expresce proteinu BMP-4 byla měřena i pomocí ELISA analýzy (D). Výsledek je uveden v pg/ml supernatantu. Reprezentativní obrázek grafu znázorňuje jeden ze tří na sobě nezávislých experimentů s celkovým počtem 12 vzorků pro každou skupinu. Médium pro kontrolní skupinu obsahovalo 0,1% BSA v PBS (A, B, C, D). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM. Data hodnocena ANOVOU s Kruskal-Wallis testem a porovnávacím Dunn's testem.

## 6 DISKUSE

Předkládaná disertační práce si dala za cíl sledovat změny exprese tkáňového (membránového) endoglinu u endotelových buněk a ve vztahu k zánětu a vlivu atorvastatinu, ale zejména byla zaměřena na vliv solubilního endoglinu na endotel za různých experimentálních podmínek, které měly simulovat procesy, které primárně probíhají během aterogeneze a souvisí se zánětem a endotelovou dysfunkcí. Dále jsme se zaměřili také na sledování biomarkerů zánětu, endotelové dysfunkce a TGF- $\beta$ /endoglinové signalizační kaskády.

První část disertační práce se zaměřila zejména na sledování změn exprese membránového endoglinu, eNOS během zánětlivé reakce a po podávání statinů, což probíhalo v úzké spolupráci s Mgr. Zemánkovou Ph.D., pro kterou byly tyto výsledky nosnou částí její disertační práce (Zemánková, Lenka. 2014) Vzhledem k tomu, že Mgr. Vařejčková dokončila některé zásadní experimenty, které byly nutné pro přijetí práce k publikaci, prezentujeme zásadní výsledky této publikace i v této disertační práci.

Protože je ateroskleróza považována za zánětlivé onemocnění, které se vyznačuje přítomností vysoké koncentrace zánětlivých cytokinů (Andersson et al., 2009), rozhodli jsme se simulovat tento stav podáváním prozánětlivého cytokinu TNF $\alpha$ . Výsledky WB analýzy ukázaly, že po ovlivnění HUVEC TNF $\alpha$  po dobu 16 hodin, došlo k poklesu exprese membránového endoglinu, což koreluje s výsledky předchozích studií (Bernabeu et al., 2009; Rossi et al., 2013) a do jisté míry také koreluje s našimi *in vivo* daty, kde rozvoj aterogeneze byl také spjat se snížením exprese endoglinu v endotelu aorty (Strasky et al., 2011). Ovlivnění buněk TNF $\alpha$  mělo také za následek pokles exprese eNOS a nárůst exprese prozánětlivé molekuly VCAM-1. Lze tedy konstatovat, že podáváním TNF $\alpha$  jsme v rámci možností *in vitro* studií nasimulovali změny, které jsou typické pro rozvoj endotelové dysfunkce. Vzhledem k tomu, že naše předchozí *in vivo* studie sledovaly vliv atorvastatinu na expresi endoglinu během aterogeneze (Rathouska et al., 2011), rozhodli jsme se i zde použít atorvastatin a popsat detailněji potenciální vliv atorvastatinu na membránovou expresi endoglinu u HUVEC buněk.

Existuje několik studií, které popisují, že statiny jsou schopné modulovat expresi endoglinu. Atorvastatin snižuje indukci Eng v srdečních fibroblastech (Shyu et al., 2010). Dále bylo zjištěno, že atorvastatin zvyšuje expresi endoglinu za různých

experimentálních podmínek u ApoE/LDLr deficientních myši (Nachtigal et al., 2009a). V průběhu procesu aterosklerózy dochází i k poklesu eNOS (Vecerova et al., 2012).

V této disertační práci prezentujeme výsledky analýzy průtokové cytometrie, které jasně ukazují koncentrační závislost exprese endoglinu po ovlivnění buněk atorvastatinem, nejvyšší exprese bylo dosaženo po 5  $\mu$ M. Vzhledem k relativně dlouhému poločasu endoglinu, přibližně 17 hodin (Paquet et al., 2001), jsme pro studium vlivu ATV na expresi membránového endoglinu zvolili čas 24 hodin. Zjistili jsme, že po ovlivnění buněk 5  $\mu$ M ATV došlo k nárůstu exprese jak endoglinu, tak i eNOS v endotelových buňkách HUVEC, což koreluje s výsledky našich *in vivo* studií (Rathouska et al., 2011).

Abychom zjistili, zda je ATV schopen zvýšit expresi endoglinu a eNOS během zánětu, provedli jsme několik experimentů. Zjistili jsme, že ATV je schopen zabránit poklesu exprese eNOS, což koreluje s výsledky předchozích studií (Endres and Laufs, 2004; Dayoub et al., 2011), ale zároveň je schopen zabránit poklesu exprese endoglinu. Bylo také zjištěno, že je ATV schopen zvyšovat uvolňování NO a snižovat krevní tlak u diabetických potkanů s hypertenzí (Mason et al., 2015) a má také výrazné anti-fibrilační účinky v srdci (Benova et al., 2015). Pomocí metody ELISA jsme také zjistili, že je ATV schopen zvýšit hladiny sEng v buněčném supernatantu, ale i po ovlivnění buněk TNF $\alpha$  dochází k nárůstu hladin sEng. Po ovlivnění buněk kombinací ATV a TNF $\alpha$  došlo dokonce k dvojnásobnému nárůstu exprese sEng. Domníváme se, že uvolňování sEng do supernatantu je závislé jednak na celkovém množství endoglinu (jeho produkcí endotelem) a také na množství a aktivitě MMP-14 nebo jiných MMP proteázách, které dokáží odštěpit a uvolnit do cirkulace sEng.

Celkově lze konstatovat, že výsledky této studie ukázaly, že atorvastatin je schopen zvyšovat expresi endoglinu, což by vzhledem k jeho příznivému vlivu na eNOS mohlo poukazovat na jeden z dalších mechanismů, jak atorvastatin může zlepšovat endotelovou dysfunkci.

Nicméně hlavním cílem a tématem této disertační práce bylo sledovat vliv solubilní formy endoglinu na endotelovou dysfunkci u endotelových buněk. Existuje několik prací, které poukázaly na možný význam solubilního endoglinu nejen jako biomarkeru různých patologických stavů kardiovaskulárního systému, ale také jako substanci, která může přímo ovlivňovat funkční stav cév.

V roce 1996 byla zveřejněna úplně první studie, která popisuje zvýšenou hladinu sEng u pacientů s hypercholesterolémií. V této studii autoři spekulují nad tím, zda zvýšená hladina sEng může korelovat s poškozením/dysfunkcí endotelu (Blann et



al., 1996). Byla publikována i studie skupiny prof. Bláhy, ve které popisují, že je hladina sEng zvýšena u pacientů s familiární hypercholesterolémií v porovnání s kontrolní skupinou pacientů. Dále zjistili, že je hladina sEng výrazně snížena po extrakorporální eliminaci ve srovnání s reoferézou nebo LDL aferézou. Po provedení eliminace bylo zjištěno, že došlo k poklesu nejen sEng, ale i k poklesu hladiny CRP a sCD40. Autoři se proto domnívají, že pokles hladiny sEng může být spojena se zlepšením funkce endotelu a poklesem aktivity imunitního systému po odstranění aterogenních substancí po provedení této extrakorporální eliminace (Blaha et al., 2008).

Zvýšenou hladinu sEng v cirkulaci můžeme pozorovat u dalších patologických stavů kardiovaskulárního systému, např. hypercholesterolémie (Rathouska et al., 2015), hypertenze (Valbuena-Diez et al., 2012), zánětu (Rossi et al., 2013), aterosklerózy (Jang and Choi, 2014), poškození endotelu (Gallardo-Vara et al., 2016), DM 2 (Blazquez-Medela et al., 2010) a preeklampsie (Gregory et al., 2014). sEng je považován za potenciálního ukazatele těchto patologických stavů a bylo zjištěno, že interakce sEng s členy TGF- $\beta$  signální kaskády má za následek rozvoj zánětu endotelu a endotelové dysfunkce (Venkatesha et al., 2006; Walshe et al., 2009; Jezkova et al., 2016). Na základě těchto prací a našich již publikovaných výsledků se domníváme, že vysoké hladiny sEng mohou skutečně přispívat ke vzniku zánětu endotelu a endotelové dysfunkce.

Další studie přímo prokázala, že v cévách ledvin u potkana sEng interaguje s TGF- $\beta$ /Smad2/3 signalizací a následkem toho dochází inhibici vazodilatace závislé na eNOS (Venkatesha et al., 2006). Dále se uvádí, že adenovirem řízená exprese sEng má za následek neutralizaci TGF- $\beta$  a VEGF efektů s následným zvýšením exprese P-selektinu, rolováním leukocytů po endotelu, zvýšenou hladinou E-selektinu, sVCAM-1 a je poškozená vazodilatace (Walshe et al., 2009). sEng může také blokovat fosforylaci Smad1/5/8, která je zprostředkována BMP-9 (Gregory et al., 2014).

Na základě výsledků těchto studií jsme se rozhodli provést experimenty, kterými bychom ověřili, zda sEng ovlivňuje expresi markerů zánětu endotelu a endotelové dysfunkce. Pro naše experimenty jsme zvolili koncentraci 40 ng/ml, která je blízká hodnotám naměřeným v krvi preeklamptických pacientek (Hirashima et al., 2008), a koncentraci 500 ng/ml, která je blízká hodnotám v našich *in vivo* experimentech (Nemeckova et al., 2015; Jezkova et al., 2016).

Endotelová dysfunkce je především spojena s funkčními změnami produkce NO a změnami vazodilatace závislé na eNOS (Davignon and Ganz, 2004). Bylo zjištěno, že zvýšená exprese adhezních molekul a dalších prozánětlivých molekul,

jako je např. MCP-1, COX-1, COX-2, hrají roli v endotelové dysfunkci a zánětu endotelu, které jsou zásadním krokem v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění, jakými jsou ateroskleróza a hypertenze (Feletou et al., 2011; Santos-Gallego et al., 2014; Bhaskar et al., 2016).

Výsledky našich experimentů ukazují na to, sEng přímo zvyšuje genovou expresi a fosforylaci NFκB, který je jedním z klíčových prozánětlivých transkripčních faktorů. Bylo zjištěno, že NFκB aktivuje expresi mnoha prozánětlivých molekul, jako např. IL-6 (Libermann and Baltimore, 1990). Navíc jsme v našich experimentech potvrdili zvýšenou expresi IL-6, a to opět přímým vlivem sEng. Bylo popsáno, že exprese NFκB a IL-6 souvisí s rozvojem endotelové dysfunkce a akutního zánětu (Aggarwal and Gehlot, 2009). Překvapivě však v našich experimentech nedošlo po ovlivnění buněk sEng ke zvýšené expresi jiných prozánětlivých markerů (markerů endotelové dysfunkce), které jsou regulovány NFκB, proto se domníváme, že ovlivnění buněk pouze samotným sEng nemá za následek kompletní aktivaci zánětu nebo endotelové dysfunkce.

Přesto lze jednoznačně konstatovat, že sEng je přímo schopen aktivovat expresi dvou klíčových mediátorů zánětu, což by mohlo být zásadní pro jeho potenciálně škodlivý vliv na cévní endotel v různých *in vivo* podmínkách, což v současné době prokazujeme u myších modelů s vysokými hladinami sEng.

Další data z těchto studií ukázala překvapivě zvýšení exprese membránového endoglinu po ovlivnění buněk sEng. Vysvětlením může být i to, že sEng zvyšuje expresi pSmad2/3, který je členem TGF-β signalizace. Bylo dokonce popsáno, že TGF-β výrazně zvyšuje expresi membránového endoglinu (Lastres et al., 1996). Bylo dále zjištěno, že membránový endoglin zesiluje aktivitu, stabilitu a expresi eNOS působením přes Smad2 signalizaci, která je důležitá pro udržení fyziologických vlastností endotelu *in vivo* (Santibanez et al., 2007). Na druhou stranu je však také důležité zmínit, že se membránový endoglin účastní i transmigrace leukocytů během zánětu (Rossi et al., 2013). Proto je velmi lákavé spekulovat nad otázkou, zda zvýšená exprese endoglinu spolu s aktivací NFκB/IL-6 signalizace může být alespoň částečně spojena s indukcí zánětu po ovlivnění endotelových buněk sEng (Mejia-Rangel et al., 2016). Přesto zcela jasné vysvětlení pro zvýšení exprese membránového endoglinu po podávání sEng v současné době nemáme.

Vzhledem k tomu, že je endoglin členem TGF-β receptorového komplexu, rozhodli jsme se pro analýzu exprese vybraných členů TGF-β signalizace, abychom zhodnotili případný vliv zvýšené exprese membránového endoglinu na tuto signalizaci

po podávání sEng. Předchozí studie ukazují, že endoglin moduluje signalizace TGF $\beta$ RII/ALK-1/Smad1/5/ID-1 a TGF $\beta$ RII/ALK-5/Smad2/3/PAI-1 (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Nicméně v našich studiích nebyla exprese členů těchto signalizací ovlivněna, s výjimkou pSmad2/3, kde došlo ke zvýšení exprese a ID-1, kde byla naopak exprese snížena. Po ovlivnění buněk sEng byla sice zvýšena exprese pSmad2/3, avšak bez změny exprese cílového genu pro PAI-1. Domníváme se proto, že sEng neaktivuje tuto signalizační dráhu úplně. ID-1 je transkripční faktor, který se je součástí TGF- $\beta$  signalizace, nicméně jeho přesná úloha v procesu zánětu není zcela objasněna. V našich experimentech došlo k poklesu exprese ID-1 na proteinové úrovni po 500 ng/ml sEng, nicméně na úrovni mRNA byl zaznamenán nárůst exprese. Jedním z možných vysvětlení je přítomnost posttranskripčních a posttranslačních mechanismů. Za více relevantní je však považována exprese ID-1 na proteinové úrovni. Dle našeho názoru může redukce proteinu ID-1 souviset se skutečností, že sEng antagonizuje funkci membránového endoglinu (Goumans et al., 2009; Oujó et al., 2013). Membránový endoglin

a ALK-1/Smad1/5/8 se podílejí na zvýšené regulaci ID-1, proto předpokládáme, že sEng regulaci ID-1 snižuje. Toto tvrzení je v souladu se skutečností, že je fosforylace Smad2/3 zvýšena, protože ALK-5 signalizace je zvýšena, když ALK-1/endoglin signalizace je inhibována. Nicméně otázkou stále zůstává, jaký dopad na expresi NF $\kappa$ B a IL-6 má redukce exprese ID-1. Také jsme zjistili, že sEng nemá vliv ani na expresi peNOS (Ser<sup>1177</sup>) v endotelových buňkách, proto se domníváme, že ani Eng/peNOS signalizace není aktivována v našich experimentálních podmínkách.

Bylo popsáno, že během rozvoje zánětu, oxidačního stresu a aterosklerózy dochází ke zvýšené expresi markerů oxidačního stresu HO-1 a p22PHOX (De Keulenaer et al., 1998; Azumi et al., 1999; Wu et al., 2011). Nám se však nepodařilo potvrdit zvýšenou expresi těchto markerů po ovlivnění buněk sEng, což zřejmě poukazuje na to, že sEng nevyvolává oxidační stres za daných experimentálních podmínek.

Jak již bylo uvedeno výše v diskusi, samotný sEng stimuluje zánět v endotelových buňkách jen z části, proto se domníváme, že pro úplný rozvoj zánětlivé reakce je zapotřebí více stimulů. Bylo popsáno, že sEng je zodpovědný za zvýšení krevního tlaku u myši (Valbuena-Diez et al., 2012), nicméně přítomnost vysokých koncentrací sEng však nevede k endotelové dysfunkci v myši aortě (Nemeckova et al., 2015). Je však důležité zmínit, že vysoká koncentrace sEng v cirkulaci bude vždy spojena ještě spolu s dalšími rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění, jakými jsou

hypercholesterolémie nebo hyperglykémie. V jedné z našich recentních studií ukazujeme, že kombinace mírné hypercholesterolémie a vysokých koncentrací sEng v myší aortě zvyšuje expresi markerů zánětu endotelu, včetně NFκB (Jezkova et al., 2016). Dle výše uvedených znalostí si dovoluujeme tvrdit, že působení sEng bude mít větší dopad na vznik kardiovaskulárních onemocnění za přítomnosti dalších potenciálních rizikových faktorů, jakými jsou oxLDL, glukóza nebo leukocyty. Nicméně k pochopení komplexního působení sEng jsou zapotřebí další experimenty, a právě několika z nich se v současné době věnují vědečtí pracovníci pod vedením prof. Nachtigala.

Výsledky této disertační práce tedy prokázaly vliv zánětu, atorvastatinu na expresi membránového endoglinu a zároveň prokázaly vliv sEng na významné komponenty zánětu.

## 7 ZÁVĚRY

Výsledky této disertační práce shrnují již publikované výsledky experimentů, v nichž bylo poprvé prokázáno, že atorvastatin zvyšuje expresi membránového endoglinu a eNOS a brání poklesu exprese membránového endoglinu a eNOS v prostředí zánětu (Zemankova et al., 2015). Zvýšená exprese eNOS po ovlivnění buněk atorvastatinem je silně závislá na expresi endoglinu v endotelových buňkách. Těchto poznatků lze využít u patologických stavů, které jsou charakterizovány sníženou hladinou endoglinu a eNOS, jako je např. hereditární hemoragická teleangiektázie nebo endotelová dysfunkce.

Na základě výsledků našich dalších experimentů také vyplývá, že sEng přímo aktivuje expresi prozánětlivých biomarkerů NFκB a IL-6, což může přispívat ke vzniku prozánětlivého fenotypu endotelu. Navzdory tomu jsme však nepotvrdili komplexní aktivaci zánětu a endotelové dysfunkce u endotelových buněk po podávání sEng.

V současné době probíhají další experimentální studie zaměřené na sledování vlivu kombinace sEng s jinými kardiovaskulárními rizikovými faktory, což by mohlo vést k objasnění významu sEng ve vztahu k rozvoji endotelové dysfunkce.

## 8 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

**Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- $\kappa$ B and IL-6 in cultured human endothelial cells.**

Varejckova M, Gallardo-Vara E, Vicen M, Vitverova B, Fikrova P, Dolezelova E, Rathouska J, Prasnicka A, Blazickova K, Micuda S, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P. 2017. *Life Sci* 175:52-60. (IF: 2.685)

**High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas from Mice Fed a High-Fat Diet.**

Jezkova K, Rathouska J, Nemeckova I, Fikrova P, Dolezelova E, Varejckova M, Vitverova B, Tysonova K, Serwaczak A, Buczek E, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P. 2016. *J Vasc Res* 53:149-162. (IF: 2.186)

**Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin.**

Zemankova L, Varejckova M, Dolezelova E, Fikrova P, Jezkova K, Rathouska J, Cerveny L, Botella LM, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P. 2015. In: *Journal of Physiology and Pharmacology*. p 403-413. (IF: 2.084) – zde je Mgr. Michala Vařejčková „equally contributed“ autor společně s Mgr. Lenkou Zemánkovou, Ph.D.

**Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis.**

Rathouska J, Nemeckova I, Zemankova L, Strasky Z, Jezkova K, Varejckova M, Nachtigal P. 2015b. *Heart Vessels* 30:241-248. (IF: 2.126)

**Endoglin is not expressed with cell adhesion molecules in aorta during atherogenesis in apoE-deficient mice.**

Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Zemankova L, Varejckova M, Nachtigal P. 2015b. *Histol Histopathol* 30:233-244. (IF: 2.281)

**High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Endothelial Dysfunction in Mouse Aorta.**

Nemeckova I, Serwaczak A, Oujo B, Jezkova K, Rathouska J, Fikrova P, Varejckova M, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P. 2015. *PLoS One* 10:e0119665. (IF: 3.057)

## 9 PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

Michala Varejkova, Eunate Gallardo-Vara, Barbora Vitverova, Petra Fikrova, Eva Dolezelova, Jana Rathouska, Katerina Blazickova, Matej Vicen, Martina Kolackova, Carmelo Bernabeu, Ivana Nemeckova, Petr Nachtigal;

**Soluble endoglin modulates the inflammatory pathway in endothelial cells *in vitro*.** XX. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn (2016)

Michala Varejkova, Ivana Nemeckova, Petra Fikrova, Eva Dolezelova, Barbora Vitverova, Eunate Gallardo-Vara, Carmelo Bernabeu, Petr Nachtigal;

**Soluble endoglin effects on endothelial cells *in vitro*.** 84<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress, Innsbruck, Rakousko (2016)

Varejkova M., I. Nemeckova I, Fikrova P., Dolezelova E., Vitverova B., Nachtigal P.;

**Soluble endoglin effects on endothelial cells.** 6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (2016)

M. Varejkova, I. Nemeckova, P. Fikrova, E. Dolezelova, B. Vitverova, P. Nachtigal;

**Soluble endoglin and inflammation – effects on endothelial cells *in vitro*.** XIX. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn (2015)

Michala Varejkova, Lenka Zemankova, Petra Fikrova, Eva Dolezelova, Katerina Jezkova, Jana Rathouska, Ivana nemeckova, Petr Nachtigal;

**Determination of ATV treatment effects on endoglin and eNOS expression in endothelial cells *in vitro*.** 5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (2015)

M. Varejkova, P. Fikrova, K. Jezkova, J. Rathouska, I. Nemeckova, P. Nachtigal;

**Effect of high soluble endoglin on endothelial cells *in vitro* – pilot study.** XVIII. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn (2014)



Lenka Zemankova, Michala Varejkova, Katerina Jezkova, Ivana Nemeckova, Jana Rathouska, Petr Nachtigal;

**Effects of atorvastatin treatment on endoglin and eNOS expression in endothelial cells.** 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society Congress, Madrid, Španělsko (2014)

Michala Varejkova, Lenka Zemankova, Ivana Nemeckova, Petr Nachtigal;

**Characteristics of L6E9 myoblasts - *in vitro* model for study of different endoglin isoforms.** 4. Postgraduální a 2. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové (2014)

Michala Varejkova, Lenka Zemankova, Ivana Nemeckova, Katerina Jezkova, Petra Fikrova, Jana Rathouska, Petr Nachtigal;

**Endoglin is critical for atorastatin-induced eNOS expression in endothelial cells.** New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, Smolenice, Slovensko (2014)

Michala Varejkova, Lenka Zemankova, Ivana Nemeckova, Petr Nachtigal;

**Characteristics of L6E9 myoblasts – *in vitro* model for study of different endoglin isoforms.** XVII. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn (2013)

## 10 POUŽITÁ LITERATURA

- Aggarwal BB, Gehlot P. 2009. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol* 9:351-369.
- Akeson AL, Mosher LB, Woods CW, Schroeder KK, Bowlin TL. 1992. Human aortic endothelial cells express the type I but not the type II receptor for interleukin-1 (IL-1). *J Cell Physiol* 153:583-588.
- Andersson J, Sundstrom J, Gustavsson T, Hulthe J, Elmgren A, Zilmer K, Zilmer M, Lind L. 2009. Echogenicity of the carotid intima-media complex is related to cardiovascular risk factors, dyslipidemia, oxidative stress and inflammation: the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Atherosclerosis* 204:612-618.
- Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. 1999. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 100:1494-1498.
- Babbitt DM, Kim JS, Forrester SJ, Brown MD, Park JY. 2015. Effect of Interleukin-10 and Laminar Shear Stress on Endothelial Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide in African American Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Ethn Dis* 25:413-418.
- Bai Y, Leng Y, Yin G, Pu X, Huang Z, Liao X, Chen X, Yao Y. 2014. Effects of combinations of BMP-2 with FGF-2 and/or VEGF on HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis in vivo. *Cell Tissue Res* 356:109-121.
- Balligand JL, Feron O, Dessy C. 2009. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 89:481-534.
- Barresi V, Grosso M, Vitarelli E, Granese R, Barresi G. 2008. Endoglin (CD105) immuno-expression in human foetal and neonatal lungs. *Histol Histopathol* 23:701-708.
- Bedi O, Dhawan V, Sharma PL, Kumar P. 2016. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389:695-712.
- Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabeu C. 1993. Identification and expression of two forms of the human

- transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23:2340-2345.
- Benova T, Knezl V, Viczenczova C, Bacova BS, Radosinska J, Tribulova N. 2015. Acute anti-fibrillating and defibrillating potential of atorvastatin, melatonin, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid demonstrated in isolated heart model. *J Physiol Pharmacol* 66:83-89.
- Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. 2009. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1792:954-973.
- Bhaskar S, Sudhakaran PR, Helen A. 2016. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF-kappaB signaling pathway. *Cellular immunology* 310:131-140.
- Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Jarolim P, Andrys C, Blazek M, Maly J, Smolej L, Zajic J, Masin V, Zimova R, Rehacek V. 2008. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 197:264-270.
- Blann AD, Wang JM, Wilson PB, Kumar S. 1996. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 120:221-226.
- Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C. 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8:86.
- Bobik A. 2006. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1712-1720.
- Bot PT, Hoefler IE, Sluijter JP, van Vliet P, Smits AM, Lebrin F, Moll F, de Vries JP, Doevendans P, Piek JJ, Pasterkamp G, Goumans MJ. 2009. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke* 40:439-447.
- Brasier AR. 2010. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 86:211-218.
- Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. 2001. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res* 89:866-873.

- Brownfoot FC, Hannan N, Onda K, Tong S, Kaitu'u-Lino T. 2014. Soluble endoglin production is upregulated by oxysterols but not quenched by pravastatin in primary placental and endothelial cells. *Placenta* 35:724-731.
- Cai S, Khoo J, Channon KM. 2005. Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 65:823-831.
- Calo LA, Zaghetto F, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Pessina AC. 2004. Effect of manidipine on gene expression and protein level of oxidative stress-related proteins: p22phox and HO-1: relevance for antihypertensive and anti-remodeling effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:531-538.
- Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N, Sako D, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R, Grinberg AV. 2011. Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem* 286:30034-30046.
- Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP. 2000. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153:323-335.
- Cruz-Gonzalez I, Pabon P, Rodriguez-Barbero A, Martin-Moreiras J, Pericacho M, Sanchez PL, Ramirez V, Sanchez-Ledesma M, Martin-Herrero F, Jimenez-Candil J, Maree AO, Sanchez-Rodriguez A, Martin-Luengo C, Lopez-Novoa JM. 2008. Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 12:955-961.
- Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devey LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW, Ahmed A. 2007. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation* 115:1789-1797.
- Cui S, Lu SZ, Chen YD, He GX, Meng LJ, Liu JP, Song ZY, Liu XL, Song XT, Ge CJ, Liu H. 2008. Relationship among soluble CD105, hypersensitive C-reactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study. *Chin Med J (Engl)* 121:128-132.
- Davignon J, Ganz P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109:III27-32.

- Dayoub JC, Ortiz F, Lopez LC, Venegas C, Del Pino-Zumaquero A, Roda O, Sanchez-Montesinos I, Acuna-Castroviejo D, Escames G. 2011. Synergism between melatonin and atorvastatin against endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide. *Journal of pineal research* 51:324-330.
- De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. 1998. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 329 ( Pt 3):653-657.
- DiChiara MR, Kiely JM, Gimbrone MA, Jr., Lee ME, Perrella MA, Topper JN. 2000. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *J Exp Med* 192:695-704.
- Docherty NG, Lopez-Novoa JM, Arevalo M, Duwel A, Rodriguez-Pena A, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Eleno N. 2006. Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 21:2106-2119.
- Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM, Jr. 1998. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 279:1615-1622.
- Drexler H. 1998. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol* 82:3S-4S.
- Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. 2001. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103:1955-1960.
- Endemann DH, Schiffrin EL. 2004. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15:1983-1992.
- Endres M, Laufs U. 2004. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 35:2708-2711.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK. 1998. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8880-8885.

- Feinberg MW, Shimizu K, Lebedeva M, Haspel R, Takayama K, Chen Z, Frederick JP, Wang XF, Simon DI, Libby P, Mitchell RN, Jain MK. 2004. Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. *Circ Res* 94:601-608.
- Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. 2011. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164:894-912.
- Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M, Bernabeu C. 1993. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* 64:204-207.
- Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. 2001. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103:113-118.
- Finkenzeller G, Hager S, Stark GB. 2012. Effects of bone morphogenetic protein 2 on human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 84:81-85.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131.
- Forstermann U, Munzel T. 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-1714.
- Forstermann U, Sessa WC. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33:829-837, 837a-837d.
- Fotis L, Giannakopoulos D, Stamogiannou L, Xatzipsalti M. 2012. Intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in children. Do they play a role in the progression of atherosclerosis? *Hormones (Athens)* 11:140-146.
- Galkina E, Ley K. 2007. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2292-2301.
- Gallardo-Vara E, Blanco FJ, Roque M, Friedman SL, Suzuki T, Botella LM, Bernabeu C. 2016. Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis* 19:155-171.
- Ge AZ, Butcher EC. 1994. Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand. *Gene* 138:201-206.

- Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. 2007. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo* 21:757-769.
- Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. 1998. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* 56:977-988.
- Gougos A, Letarte M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265:8361-8364.
- Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. 2009. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 19:116-127.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P. 2003. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* 12:817-828.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 21:1743-1753.
- Grainger DJ. 2004. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:399-404.
- Grainger DJ. 2007. TGF-beta and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74:213-222.
- Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M. 2014. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta* 35 Suppl:S93-99.
- Griendling KK, FitzGerald GA. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108:1912-1916.
- Hall A. 1998. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* 280:2074-2075.
- Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P. 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70:4141-4150.
- Heeba G, Hassan MK, Khalifa M, Malinski T. 2007. Adverse balance of nitric oxide/peroxynitrite in the dysfunctional endothelium can be reversed by statins. *J Cardiovasc Pharmacol* 50:391-398.
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. 1998. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-

- 1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101:2711-2719.
- Hirashima C, Ohkuchi A, Matsubara S, Suzuki H, Takahashi K, Usui R, Suzuki M. 2008. Alteration of serum soluble endoglin levels after the onset of preeclampsia is more pronounced in women with early-onset. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 31:1541-1548.
- Hoesel B, Schmid JA. 2013. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer* 12:86.
- Hope SA, Meredith IT. 2003. Cellular adhesion molecules and cardiovascular disease. Part I. Their expression and role in atherogenesis. *Intern Med J* 33:380-386.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-19030.
- Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J. 2004. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res* 95:1167-1173.
- Ikemoto T, Hojo Y, Kondo H, Takahashi N, Hirose M, Nishimura Y, Katsuki T, Shimada K, Kario K. 2012. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels* 27:344-351.
- Inglis S, Christensen D, Wilson DI, Kanczler JM, Oreffo RO. 2016. Human endothelial and foetal femur-derived stem cell co-cultures modulate osteogenesis and angiogenesis. *Stem Cell Res Ther* 7:13.
- Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. 1995. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1255-1261.
- Jaitovich A, Jaim Etcheverry G. 2004. [Adhesion molecules. Their role in cardiovascular physiopathology]. *Medicina (B Aires)* 64:455-462.
- Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. 1994. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24:1591-1601.
- Jang YS, Choi IH. 2014. Contrasting roles of different endoglin forms in atherosclerosis. *Immune network* 14:237-240.
- Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 18:609-611.



- Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, Obreo J, Wang A, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Bernabeu C, Letarte M, Lopez-Novoa JM. 2006. Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 69:845-854.
- Jezkova K, Rathouska J, Nemeckova I, Fikrova P, Dolezelova E, Varejckova M, Vitverova B, Tysonova K, Serwaczak A, Buczek E, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P. 2016. High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas from Mice Fed a High-Fat Diet. *J Vasc Res* 53:149-162.
- Jonker L, Arthur HM. 2002. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev* 110:193-196.
- Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, Ilyinskaya O, Smirnov V, Tararak E, Bobik A. 2004. Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1391-1396.
- Karin M, Lin A. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology* 3:221-227.
- Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I. 2002. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 33:125-130.
- Kinlay S, Libby P, Ganz P. 2001. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 12:383-389.
- Koh KK, Son JW, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, Choi YM, Ahn TH, Kim DS, Shin EK. 2004. Vascular effects of diet and statin in hypercholesterolemic patients. *Int J Cardiol* 95:185-191.
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, Vary CP. 2006. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 281:25110-25123.
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834-842.
- Kowalsky GB, Byfield FJ, Levitan I. 2008. oxLDL facilitates flow-induced realignment of aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C332-340.

- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. 2000. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6:1004-1010.
- Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, Lopez LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabeu C. 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 133:1109-1121.
- Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Bohm M, Nickenig G. 2002. Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res* 53:911-920.
- Laufs U, Liao JK. 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273:24266-24271.
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65:599-608.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 355:992-1005.
- Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. 2000a. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J* 14:55-64.
- Li CG, Bethell H, Wilson PB, Bhatnagar D, Walker MG, Kumar S. 2000b. The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 152:249-256.
- Liao JK, Laufs U. 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89-118.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.
- Libermann TA, Baltimore D. 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10:2327-2334.
- Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N. 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5:4767.

- Linden E, Cai W, He JC, Xue C, Li Z, Winston J, Vlassara H, Uribarri J. 2008. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:691-698.
- Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. 2007. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* 365:694-705.
- Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H959-974.
- Luscher TF, Barton M. 1997. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20:II-3-10.
- Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M, O'Brien E. 2000. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2546-2552.
- Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy MA. 1991. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest* 88:904-910.
- Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. 2001. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89:930-934.
- Mareckova Z, Heller S, Horoky K. 1999. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 45:46-50.
- Mason RP, Corbalan JJ, Jacob RF, Dawoud H, Malinski T. 2015. Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitroxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes. *J Physiol Pharmacol* 66:65-72.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
- Massague J, Gomis RR. 2006. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 580:2811-2820.
- McEver RP. 2002. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* 14:581-586.
- Mejia-Rangel J, Cordova E, Orozco L, Ventura-Gallegos JL, Mitre-Aguilar I, Escalona-Guzman A, Vadillo F, Vazquez-Prado J, Gariglio P, Zentella-Dehesa A. 2016. Pro-adhesive phenotype of normal endothelial cells responding to metastatic

- breast cancer cell conditioned medium is linked to NFkappaB-mediated transcriptomic regulation. *International journal of oncology* 49:2173-2185.
- Milstien S, Katusic Z. 1999. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263:681-684.
- Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S, Semecky V. 2008. Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci* 82:708-717.
- Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Semecky V. 2007. Endothelial expression of endoglin in normocholesterolemic and hypercholesterolemic C57BL/6J mice before and after atorvastatin treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 85:767-773.
- Nachtigal P, Pospisilova N, Vecerova L, Micuda S, Brackova E, Pospechova K, Semecky V. 2009a. Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* 16:265-274.
- Nachtigal P, Vecerova L, Pospisilova N, Micuda S, Brackova E, Navarro Hernandez E, Pospechova K, Semecky V. 2009b. Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 24:1499-1506.
- Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z. 2012. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 224:4-11.
- Nemeckova I, Serwaczak A, Oujó B, Jezkova K, Rathouska J, Fikrova P, Varejckova M, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P. 2015. High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Endothelial Dysfunction in Mouse Aorta. *PLoS One* 10:e0119665.
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2626-2631.

- Onat D, Brillon D, Colombo PC, Schmidt AM. 2011. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 11:193-202.
- Oujo B, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. 2013. Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Curr Mol Med* 13:1345-1357.
- Paquet ME, Pece-Barbara N, Vera S, Cymerman U, Karabegovic A, Shovlin C, Letarte M. 2001. Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Human molecular genetics* 10:1347-1357.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Piao M, Tokunaga O. 2006. Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study. *J Atheroscler Thromb* 13:82-89.
- Pintavorn P, Ballermann BJ. 1997. TGF-beta and the endothelium during immune injury. *Kidney Int* 51:1401-1412.
- Plenz GA, Hofnagel O, Robenek H. 2004. Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins. *Circulation* 109:e7-8; author reply e7-8.
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. 1995. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 11:409-414.
- Qiu Y, Tao L, Lei C, Wang J, Yang P, Li Q, Lei B. 2015. Downregulating p22phox ameliorates inflammatory response in Angiotensin II-induced oxidative stress by regulating MAPK and NF-kappaB pathways in ARPE-19 cells. *Scientific reports* 5:14362.
- Qu R, Silver MM, Letarte M. 1998. Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* 292:333-343.
- Rabini RA, Vignini A, Salvolini E, Staffolani R, Martarelli D, Moretti N, Mazzanti L. 2002. Activation of human aortic endothelial cells by LDL from Type 1 diabetic patients: an in vitro study. *Atherosclerosis* 165:69-77.

- Radhakrishnan N, Yadav SP, Sachdeva A, Pruthi PK, Sawhney S, Piplani T, Wada T, Yachie A. 2011. Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *J Pediatr Hematol Oncol* 33:74-78.
- Rana S, Cerdeira AS, Wenger J, Salahuddin S, Lim KH, Ralston SJ, Thadhani RI, Karumanchi SA. 2012. Plasma concentrations of soluble endoglin versus standard evaluation in patients with suspected preeclampsia. *PLoS One* 7:e48259.
- Rasmussen LM, Hansen PR, Nabipour MT, Olesen P, Kristiansen MT, Ledet T. 2001. Diverse effects of inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase on the expression of VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells. *Biochem J* 360:363-370.
- Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Nachtigal P. 2015. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 243:383-388.
- Rathouska J, Vecerova L, Strasky Z, Slanarova M, Brackova E, Mullerova Z, Andrys C, Micuda S, Nachtigal P. 2011. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 64:53-59.
- Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, Padilla E, Tejerina T. 2005. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta1, and a Smad2-dependent mechanism. *Diabetes* 54:811-817.
- Redondo S, Santos-Gallego CG, Ganado P, Garcia M, Rico L, Del Rio M, Tejerina T. 2003. Acetylsalicylic acid inhibits cell proliferation by involving transforming growth factor-beta. *Circulation* 107:626-629.
- Redondo S, Santos-Gallego CG, Tejerina T. 2007. TGF-beta1: a novel target for cardiovascular pharmacology. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:279-286.
- Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. 2003. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:397-403.
- Riederer M, Ojala PJ, Hrzenjak A, Graier WF, Malli R, Tritscher M, Hermansson M, Watzer B, Schweer H, Desoye G, Heinemann A, Frank S. 2010. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelial prostacyclin production. *J Lipid Res* 51:2957-2966.
- Rojas AI, Ahmed AR. 1999. Adhesion receptors in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:337-358.

- Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabanas C, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. 2013. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 121:403-415.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86:583-650.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124:2659-2670.
- Sanchez-Aranguren LC, Prada CE, Riano-Medina CE, Lopez M. 2014. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol* 5:372.
- Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L, Bernabeu C. 2007. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210:456-468.
- Santos-Gallego CG, Picatoste B, Badimon JJ. 2014. Pathophysiology of acute coronary syndrome. *Curr Atheroscler Rep* 16:401.
- Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, Lowenstein CJ. 2002. Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ Res* 91:806-813.
- Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM, 3rd, Trocha SD, Huang PL, Smith MB, Lefler AM, Lefler DJ. 2001. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 103:2598-2603.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 333:1301-1307.
- Sheppard D. 2006. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 3:413-417.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming

- growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
- Shyu KG, Wang BW, Chen WJ, Kuan P, Hung CR. 2010. Mechanism of the inhibitory effect of atorvastatin on endoglin expression induced by transforming growth factor-beta1 in cultured cardiac fibroblasts. *Eur J Heart Fail* 12:219-226.
- Schonbeck U, Libby P. 2004. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation* 109:II18-26.
- Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. 1997. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6:929-955.
- Smyth JV, Rooney OB, Dodd PD, Walker MG. 1997. Production of plasminogen activator inhibitor-1 by human saphenous vein endothelial cells seeded onto endarterectomy surfaces in vitro. *J Vasc Surg* 25:722-725.
- Sprague AH, Khalil RA. 2009. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78:539-552.
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. 1994. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134:2645-2657.
- Stalker TJ, Lefler AM, Scalia R. 2001. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol* 133:406-412.
- Star GP, Giovinazzo M, Langleben D. 2010. Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: a potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res* 80:349-354.
- Stefoni S, Cianciolo G, Donati G, Dormi A, Silvestri MG, Coli L, De Pascalis A, Iannelli S. 2002. Low TGF-beta1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int* 61:324-335.
- Steinberg D, Witztum JL. 2002. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105:2107-2111.
- Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Breckova E, Kudlackova Z, Andrys C, Micuda S, Nachtigal P. 2011. Cholesterol effects on endoglin and its



- downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J* 75:1747-1755.
- Stratmann B, Engelbrecht B, Espelage BC, Klusmeier N, Tiemann J, Gawlowski T, Mattern Y, Eisenacher M, Meyer HE, Rabbani N, Thornalley PJ, Tschoepe D, Poschmann G, Stuhler K. 2016. Glyoxalase 1-knockdown in human aortic endothelial cells - effect on the proteome and endothelial function estimates. *Scientific reports* 6:37737.
- Tandon A, Tovey JC, Sharma A, Gupta R, Mohan RR. 2010. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Curr Mol Med* 10:565-578.
- ten Dijke P, Arthur HM. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:857-869.
- ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. 2008. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11:79-89.
- Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E, Goumans MJ, Heldin CH, Boren J, Akyurek LM. 2010. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 392:283-288.
- Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M, Letarte M. 2005. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96:684-692.
- Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M, Arthur HM. 2002. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res* 51:464-470.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. 2002. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 90:1205-1213.
- Touyz RM, Schiffrin EL. 1999. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34:976-982.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. 1996. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system

- and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271:23317-23321.
- Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Gonzalez-Nunez M, Llano E, Pendas AM, Diaz M, Castrillo A, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. 2012. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* 126:2612-2624.
- Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, Sideras P, ten Dijke P. 2002. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106:2263-2270.
- Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. 2000. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 35:1-10.
- Vecerova L, Strasky Z, Rathouska J, Slanarova M, Breckova E, Micuda S, Nachtigal P. 2012. Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 19:115-126.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12:642-649.
- Walshe TE, Dole VS, Maharaj AS, Patten IS, Wagner DD, D'Amore PA. 2009. Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1185-1192.
- Watabe T, Nishihara A, Mishima K, Yamashita J, Shimizu K, Miyazawa K, Nishikawa S, Miyazono K. 2003. TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Biol* 163:1303-1311.
- Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P, Chin MT, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. 2000. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem* 275:36653-36658.
- Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, Gong Y, Scalia R, Dominiak P, Liao JK. 2004. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1842-1847.

- Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. 2003. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:729-736.
- Wu ML, Ho YC, Lin CY, Yet SF. 2011. Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* 1:150-158.
- Xia YF, Liu LP, Zhong CP, Geng JG. 2001. NF-kappaB activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289:851-856.
- Xu Q, Yuan F, Shen X, Wen H, Li W, Cheng B, Wu J. 2014. Polymorphisms of C242T and A640G in CYBA gene and the risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *PLoS One* 9:e84251.
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Moren A, ten Dijke P, Miyazono K. 1994. Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269:1995-2001.
- Yokoyama M, Inoue N, Kawashima S. 2000. Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 902:241-247; discussion 247-248.
- Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. 2007. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1706-1721.
- Zemankova L, Varejckova M, Dolezalova E, Fikrova P, Jezkova K, Rathouska J, Cerveny L, Botella LM, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P. 2015. Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin. *J Physiol Pharmacol* 66:403-413.
- Zemánková, Lenka. *Vliv statinů na TGF-β1 signalizační kaskádu in vivo a in vitro*. Hradec Králové, 2014. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Kalova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd, 19.6.2014.
- Zhou Q, Liao JK. 2010. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ J* 74:818-826.
- Openi.nlm.nih.gov* [online]. PubMed, 2017 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: [https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC1993933\\_vhrm0101-029-f1&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC1993933_vhrm0101-029-f1&req=4)

*Wikimedia commons* [online]. 2017 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/50/EDRF\\_regulation\\_diagram.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/50/EDRF_regulation_diagram.png)