

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- β 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- β 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 α cytokin (TNF α),

což mělo za následek snížení exprese endoglinu i eNOS. Preventivní podávání atorvastatinu, před podáváním TNF α 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 κ 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- β signalizační kaskády ALK-1, ALK-5, TGF β 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 κ 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.