

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LEKÁRSKÝCH VIED



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Vplyv dlhodobého pôsobenia solubilného
endoglínu na markery endotelovej dysfunkcie
v myšacej aorte**

Lenka Kalmanová

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Pod'akovanie

Rada by som sa pod'akovala predovšetkým svojmu školiteľovi prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedenie tejto diplomovej práce, za jeho cenné rady, pripomienky, ochotu a poskytnutý čas. Veľká vďaka patrí taktiež Mgr. Barbore Vitverovej za pomoc s experimentálnou časťou práce, za jej priateľský prístup, trpezlivosť a podporu. V neposlednom rade patrí veľké pod'akovanie mojej rodine, ktorá mi bola oporou počas celej doby štúdia.

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

V Hradci Králové, dňa:

Podpis:

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lekárskeho vied

Názov diplomovej práce: Vplyv dlhodobého pôsobenia solubilného endoglinu na markery endotelovej dysfunkcie v myšacej aorte

Autor diplomovej práce: Lenka Kalmanová

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Cieľ práce: Cieľom tejto diplomovej práce bolo identifikovať a následne vyhodnotiť expresiu markerov endotelovej dysfunkcie (ICAM-1, VCAM-1, P-selektín) v aortách dvoch skupín transgénnych myší. Kontrolná a experimentálna skupina myší sa líšili hladinou ľudského solubilného endoglinu.

Metódy: Pre experiment boli použité 12 mesiacov starí samci myšacieho kmeňa CBAXC57BL/6J, ktorým bola do organizmu vložená genetická informácia pre expresiu ľudského sEng. Pomocou ELISA analýzy hladín sEng v plazme boli myši rozdelené do dvoch skupín - experimentálna skupina (vysoké hladiny sEng) a kontrolná skupina (nízke hladiny sEng). Obidve skupiny myší boli kŕmené štandardnou laboratórnou diétou pre hlodavce. Bola vykonaná Western blot analýza adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín v myšacej aorte a následne ELISA analýza plazmatických hladín molekuly sVCAM-1. Hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolov boli stanovené pomocou biochemickej analýzy.

Výsledky: Western blot analýza nepreukázala signifikantné rozdiely v expresii adhézných molekúl ICAM-1 a VCAM-1 medzi kontrolnou a experimentálnou (Sol-Eng⁺) skupinou myší. V prípade adhéznej molekuly P-selektín došlo k signifikantne nižšej expresii u Sol-Eng⁺ skupiny oproti kontrolnej skupine jedincov. ELISA analýza nepreukázala štatisticky významný rozdiel v plazmatickej hladine molekuly sVCAM-1 medzi porovnávanými skupinami myší. Biochemická analýza hladín celkového cholesterolu a TAG nepreukázala signifikantný rozdiel medzi sledovanými skupinami.

Záver: Výsledky ukázali, že vysoká hladina solubilného endoglinu nespôsobuje signifikantné zvýšenie expresie markerov endotelovej dysfunkcie ICAM-1, VCAM-1

v myšacej aorte. Zároveň sa preukázalo, že spôsobuje signifikantné zníženie expresie markeru P-selektín. Na základe týchto výsledkov sa dá usúdiť, že dlhodobé pôsobenie sEng nevedie k rozvoju endotelovej dysfunkcie v myšacej aorte. Tento neočakávaný záver však bude potrebné overiť aj ďalšími metódami.

Kľúčové slová: endotel, endotelová dysfunkcia, VCAM-1, ICAM-1, P-selektín, solubilný endoglin, Western blot

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Soluble endoglin effects on endothelial dysfunction markers in mouse aorta

Author of Diploma Thesis: Lenka Kalmanová

Supervisor of Diploma Thesis: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Background: The aim of the presented diploma thesis was to identify and subsequently evaluate the expression of endothelial dysfunction markers (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin) in aortas of two groups of transgenic mice. The difference between control and experimental group was in the level of human soluble endoglin.

Methods: 12 months old male mice of transgenic strain CBAxC57BL/6J with inserted genetic information for the expression of human soluble endoglin were utilized for the experiment. The mice were divided into two groups - the experimental group (high levels of sEng) and the control group (low levels of sEng) by ELISA analysis of levels of sEng in plasma. Both groups of mice were fed with standard laboratory rodent diet. Western blot analysis of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin in mouse aorta and subsequently ELISA analysis of plasma levels of sVCAM-1 molecule were performed. Total cholesterol and triacylglycerol levels were demonstrated by biochemical analysis.

Results: Western blot analysis showed no significant difference in the expression of ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules between the control and the experimental (Sol-Eng⁺) group of the mice. P-selectin adhesion molecule showed significantly lower expression in the Sol-Eng⁺ group compared to the control group. ELISA analysis did not show statistically significant difference in plasma level of sVCAM-1 molecule between the control and the Sol-Eng⁺ group. Biochemical analysis of total cholesterol and TAG levels did not show significant difference between the two groups.

Conclusions: Results revealed that the high level of soluble endoglin does not cause a significant increase in the expression of endothelial dysfunction markers ICAM-1,

VCAM-1 in mouse aorta. Moreover, significant decrease in the expression of P-selectin marker was demonstrated in Sol-Eng⁺ group of mice. Based on these results it can be concluded that long-term exposure to high levels of sEng does not induce endothelial dysfunction in the mouse aorta. However, this unexpected conclusion will have to be verified by other methods.

Keywords: endothelium, endothelial dysfunction, VCAM-1, ICAM-1, P-selectin, soluble endoglin, Western blot

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD | 10 |
| 2. TEORETICKÁ ČASŤ | 11 |
| 2.1 Histológia ciev | 11 |
| 2.1.1 Artérie | 12 |
| 2.1.2 Vény | 13 |
| 2.1.3 Kapiláry | 13 |
| 2.2 Endotel | 15 |
| 2.2.1 Fyziologická funkcia endotelu | 15 |
| 2.2.1.1 Endotel a permeabilita | 16 |
| 2.2.1.2 Endotel a regulácia cievneho tonusu | 16 |
| 2.2.1.3 Endotel a hemostáza | 18 |
| 2.2.1.4 Endotel a angiogenéza | 18 |
| 2.3 Endotelová dysfunkcia a aterogenéza | 19 |
| 2.4 Adhézne molekuly | 22 |
| 2.4.1 ICAM-1 | 25 |
| 2.4.1.1 Regulácia expzie ICAM-1 vo vzťahu k endotelu | 26 |
| 2.4.2 VCAM-1 | 27 |
| 2.4.2.1 Regulácia expzie VCAM-1 vo vzťahu k endotelu | 29 |
| 2.4.3 P-selektín | 30 |
| 2.4.3.1 Regulácia expzie P-selektínu vo vzťahu k endotelu | 31 |
| 2.5 Endogln | 32 |
| 2.5.1 Štruktúra endoglínu | 33 |
| 2.5.2 Solubilný endogln | 35 |
| 2.6 Myšacie modely aterosklerózy | 37 |
| 2.6.1 Prehľad myšacích modelov aterosklerózy | 39 |
| 2.6.2 Myšací model s vysokými hladinami solubilného endoglínu | 41 |
| 2.7 Western blot | 41 |
| 3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE | 47 |
| 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 48 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1 | Použité zvieratá | 48 |
| 4.2 | ELISA analýza | 48 |
| 4.3 | Biochemická analýza | 49 |
| 4.4 | Western blot analýza | 49 |
| 4.4.1 | Homogenizácia a stanovenie koncentrácie proteínu | 49 |
| 4.4.2 | Gélová elektroforéza | 51 |
| 4.4.3 | Prenos proteínov na membránu | 55 |
| 4.4.4 | Detekcia proteínov..... | 56 |
| 5. | VÝSLEDKY | 60 |
| 5.1 | Váha | 60 |
| 5.2 | Biochemická analýza | 61 |
| 5.2.1 | Biochemická analýza hladín celkového cholesterolu..... | 61 |
| 5.2.2 | Biochemická analýza hladín triacylglycerolov | 62 |
| 5.3 | ELISA analýza | 62 |
| 5.3.1 | ELISA analýza hladín sEng..... | 63 |
| 5.3.2 | ELISA analýza hladín sVCAM-1 | 64 |
| 5.4 | Western blot analýza | 64 |
| 5.4.1 | Western blot analýza molekuly ICAM-1 | 65 |
| 5.4.2 | Western blot analýza molekuly VCAM-1 | 66 |
| 5.4.3 | Western blot analýza molekuly P-selektín | 67 |
| 6. | DISKUSIA..... | 68 |
| 7. | ZÁVER | 71 |
| 8. | POUŽITÉ SKRATKY | 72 |
| 9. | ZOZNAM TABULIEK..... | 74 |
| 10. | ZOZNAM OBRÁZKOV | 74 |
| 11. | ZOZNAM GRAFOV | 74 |
| 12. | POUŽITÁ LITERATÚRA | 76 |

1. ÚVOD

Kardiovaskulárne ochorenia sú v súčasnosti považované za celosvetovo najvýznamnejšiu príčinu mortality. Veľký podiel na patogenéze týchto ochorení má ateroskleróza, ktorá vzniká na podklade endotelovej dysfunkcie (Ghosh *et al.*, 2017).

V minulosti bol endotel chápaný len ako mechanická bariéra oddelujúca stenu cievy od krvi. Dnes sa však vie, že je aj metabolicky veľmi aktívnym orgánom (Karásek *et al.*, 2004). Jeho funkcia je zaistovaná prostredníctvom uvoľňovania biologicky aktívnych látok, ktoré majú vplyv napríklad na cievnu permeabilitu, cievny tonus, hemostázu, fibrinolýzu či angiogénu (Cines *et al.*, 1998; Deanfield *et al.*, 2007; Michiels, 2003). Pôsobením rôznych škodlivých faktorov môže dôjsť k narušeniu jeho funkcie, čím dochádza k rozvoju endotelovej dysfunkcie (Ghosh *et al.*, 2017).

Jedným z prejavov endotelovej dysfunkcie je zvýšenie cievnej permeability, ktorá hrá zásadnú úlohu v rozvoji zápalového procesu. Pre zápalové reakcie je typická nadmerná expresia adhézných molekúl. Tie umožňujú prichytenie leukocytov k endotelu a ich následný prienik k miestu zápalu (Karetová, 2002). Považujeme ich teda, rovnako ako ich solubilné formy, za markery endotelovej dysfunkcie. V tejto práci sme sledovali expresiu adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1, P-selektín a hladinu solubilnej formy VCAM-1 u dvoch skupín transgénnych myší.

Na základe štúdií zaoberajúcich sa kardiovaskulárnymi ochoreniami spojenými s endotelovou dysfunkciou sa zistilo, že na poškodení endotelu sa môže podieľať molekula solubilný endoglin. Ide o solubilnú formu transmembránového glykoproteínu endoglinu, prídavného receptora TGF- β signalizačnej kaskády (Strasky *et al.*, 2011). Účinky endoglinu a jeho solubilnej formy sú považované za protichodné. Predpokladá sa, že sEng je zodpovedný za narušenie TGF- β signalizácie, čo je spájané s rozvojom dysfunkcie endotelu (Ruiz-Remolina *et al.*, 2017).

Téme vplyvu dlhodobého pôsobenia solubilného endoglinu na markery endotelovej dysfunkcie je venovaná aj táto práca.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Histológia ciev

Systém krvných ciev zaisťuje rozvod krvi v tele a plní dôležitú úlohu v udržiavaní homeostázy (Čihák *et al.*, 2016; Tortora and Derrickson, 2011). Medzi základné typy krvných ciev patria artérie (tepny), ktorých úlohou je viesť krv smerom zo srdca. Tie sa vetvia v stále tenšie arterioly a tie prechádzajú v kapiláry (vlásočnice). Kapiláry sú mikroskopické cievy, ktoré spájajú arteriálny prietok s venóznym. Vény (žily) vedú krv späť do srdca, tá je do nich privádzaná z najtenších žíl nazývaných venuly (Tortora and Derrickson, 2011).

Stenu krvných ciev tvoria tri vrstvy (vid'. Obrázok č. 1), a to vnútorná vrstva *tunica intima (tunica interna)*, stredná vrstva *tunica media* a vonkajšia vrstva *tunica adventitia (tunica externa)* (Čihák *et al.*, 2016; Tortora and Derrickson, 2011; Tucker and Mahajan, 2018; Van de Graaff, 2000). Odlišnosti v ich štruktúre korelujú s rozdielmi vo funkciách jednotlivých úsekov cievneho riečiska (Tortora and Derrickson, 2011).

Tunica intima tvorí vnútornú výstelku krvných ciev a je teda v priamom kontakte s krvou, ktorá prúdi v *lumen* cievy (Tucker and Mahajan, 2018). Najvnútornejšia časť tejto vrstvy sa nazýva *endothelium* (endotel). Je to tenká vrstva plochých buniek, ktoré pokrývajú vnútorný povrch všetkých ciev. Endotelové bunky aktívne participujú v moduláciách prietoku krvi prostredníctvom sekrécie lokálne pôsobiacich chemických mediátorov, ktoré ovplyvňujú vazodilatáciu či vazokonstrikciu cievy (Tortora and Derrickson, 2011), trombogézu a fibrinolýzu, aktiváciu či inhibíciu bunkových elementov krvi (Karetová, 2002). Navyše, ich hladký luminálny povrch uľahčuje efektívny krvný prietok (Tortora and Derrickson, 2011). Endotel teda netvorí len bariéru, ktorá oddeľuje stenu cievy od krvi, ale je i metabolicky veľmi aktívnym orgánom s množstvom fyziologických funkcií (Karásek *et al.*, 2004). Druhým komponentom vrstvy *tunica intima* je bazálna membrána, ktorej základnú kostru tvoria kolagénne vlákna zabezpečujúce pružnosť. Predstavuje fyzickú podporu pre epitelovú vrstvu. Hranicu medzi vrstvami *tunica intima* a *tunica media* tvorí *lamina elastica interna*, ktorá je tvorená elastickými vláknami (Tortora and Derrickson, 2011).

Tunica media je vrstva, ktorá vykazuje najväčšie odlišnosti v rámci jednotlivých typov ciev. Vo väčšine ciev je to relatívne hrubá vrstva obsahujúca hlavne hladkosvalové bunky, ktoré regulujú priemer *lumen* cievy (Tucker and Mahajan, 2018), na základe čoho dochádza buď k cievnej vazokonstrikcií alebo k vazodilatácií (Tortora and Derrickson, 2011; Van de Graaff, 2000). Ďalej obsahuje elastické a kolagénne vlákna (Čihák *et al.*, 2016; Tortora and Derrickson, 2011). Hranicu medzi vrstvami *tunica media* a *tunica adventitia* tvorí *lamina elastica externa* (Tortora and Derrickson, 2011).

Tunica adventitia pomáha upevňovať cievy k okolitému tkanivu. Pozostáva z elastických i kolagénnych vlákien a prebiehajú tu autonómne nervy (Tortora and Derrickson, 2011; Tucker and Mahajan, 2018). Kyslík a výživu pre steny ciev (hlavne pre cievy väčšieho priemeru) privádza tzv. *vasa vasorum*. Sú to slabé cievy, ktoré pozdĺžne prebiehajú v cievnych stenách (Čihák *et al.*, 2016).

2.1.1 Artérie

Artérie sú cievy, ktoré vedú krv smerom zo srdca (Tortora and Derrickson, 2011; Van de Graaff, 2000). Najsilnejšou vrstvou ich cievnej steny je *tunica media*. Na základe toho, či v nej prevažuje elastická alebo svalová zložka, delíme artérie na elastické a svalové. Veľké tepny, ako napríklad aorta, sú elastického typu. Naopak, s vetvením tepien na menšie cievy pribúda svalová zložka a tieto tepny radíme medzi artérie svalové. U stredne veľkých artérií je elastická a svalová zložka v rovnováhe (Čihák *et al.*, 2016).

Elastické artérie plnia dôležitú funkciu. Pri systole sú schopné sa rozpínať a naopak pri diastole sú schopné vrátiť sa do pôvodného stavu. Tým dochádza ku kontinuálnemu prúdeniu krvi, zachytávaniu systolického vzostupu tlaku a zároveň zabezpečujú rovnomernejšie prúdenie krvi (Čihák *et al.*, 2016; Tortora and Derrickson, 2011; Van de Graaff, 2000). Tento typ artérií má dobre vyjadrenú *lamina elastica interna* i *lamina elastica externa* (Tortora and Derrickson, 2011).

Svalové artérie majú taktiež dobre vyjadrenú *lamina elastica interna*, ale *lamina elastica externa* je u tohto typu tepien tenká. V porovnaní s elastickými artériami, ich cievna stena zaplňa väčšie percento celkového priemeru cievy. Pre svalové artérie je

typická výraznejšia vrstva *tunica adventitia*, ktorá obsahuje fibroblasty, kolagénne a elastické vlákna longitudinálne orientované (Tortora and Derrickson, 2011).

Arterie sa vetvia v arterioly. Tie tvorí endotel a tenká vrstva hladkosvalových buniek. Typická je pre ne silná cievna stena a malý priesvit (Čihák *et al.*, 2016). Majú tenkú vrstvu *tunica intima* s taktiež tenkou, fenestrovanou *lamina elastica interna*, ktorá sa na distálnom konci vytráca (Tortora and Derrickson, 2011). Arterioly prechádzajú v prekapiláry a napájajú sa na kapilárne riečisko (Čihák *et al.*, 2016).

2.1.2 Vény

Vény sú cievy, ktoré vedú krv späť do srdca. Krv je do nich privádzaná z malých a tenkých žíl nazývaných venuly. Zásadným rozdielom v stavbe artérií a žíl je hrúbka ich cievnej steny v pomere k priemeru cievy (Van de Graaff, 2000). Priemerná hrúbka steny žily je menej ako jedna desatina jej priemeru (Tortora and Derrickson, 2011). *Tunica media* žíl je tenšia a obsahuje menej hladkosvalových buniek ako *tunica media* artérií (Čihák *et al.*, 2016; Van de Graaff, 2000). Podobne aj *tunica intima* je v porovnaní s artériami, u vén tenšia. Ich najširšou vrstvou je *tunica adventitia*, ktorá pozostáva z kolagénnych a elastických vlákien. Ďalším rozdielom medzi tepnami a žilami je chýbajúca *lamina elastica interna* a *lamina elastica externa* u žíl (Tortora and Derrickson, 2011).

V porovnaní s artériami je objem žilného riečiska asi trojnásobne vyšší. Priemerný tlak v žilách je 5-20 mmHg, pričom arteriálny tlak dosahuje okolo 100 mmHg (u aorty až 140-150 mmHg). Pohonu krvi vo vénach pomáhajú tzv. *valvulae venosae* (žilné chlopne) (Čihák *et al.*, 2016; Van de Graaff, 2000). Ide o výbežky intimy, ktoré sú pokryté endotelom a vnútri vystužené väzivom. Ich množstvo a vzdialenosť sa u jednotlivých žíl líši (Čihák *et al.*, 2016).

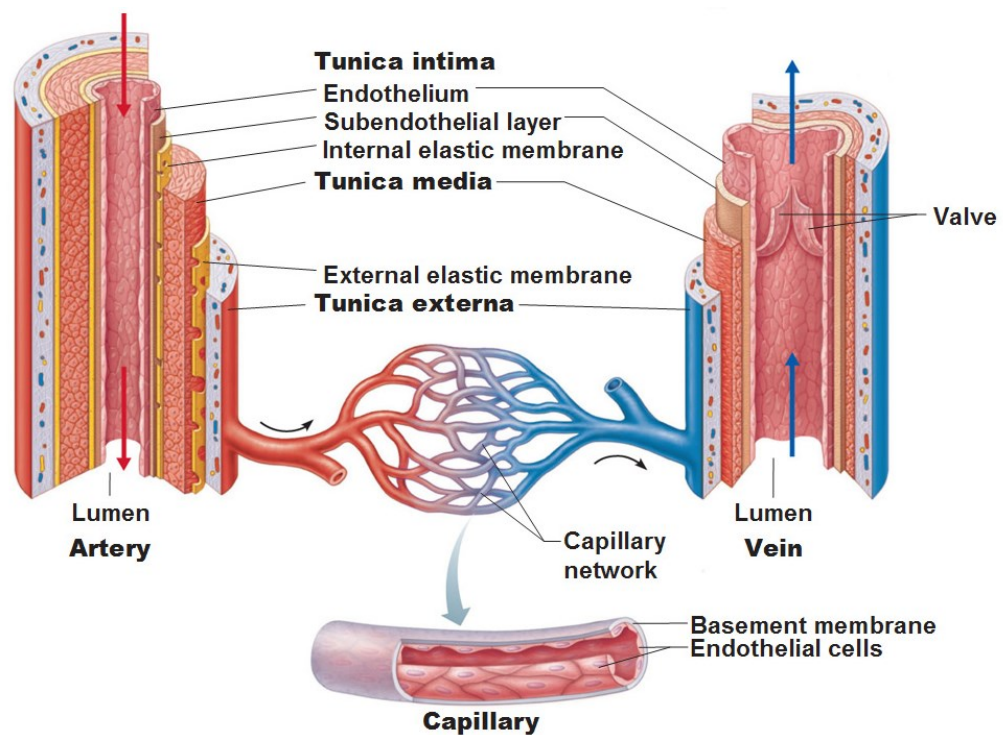
2.1.3 Kapiláry

Kapiláry spájajú venózne a arteriálne riečisko. Tok krvi z metarterioly cez kapiláry do postkapilárnych venúl sa nazýva mikrocirkulácia a predstavuje významnú súčasť krvného obehu. Spojenie medzi metarteriolou a kapilármi tvoria prstence vlákien hladkého svalstva, ktoré sa nazývajú prekapilárne sfinktery. Hrajú dôležitú

úlohu v kontrolovaní prietoku krvi cez kapiláry (Gutterman *et al.*, 2016; Tortora and Derrickson, 2011). Primárnou funkciou kapilár je výmena látok medzi krvou a intersticiálnou tekutinou (Gutterman *et al.*, 2016). Ich množstvo závisí na metabolickej aktivite daného tkaniva. Tkanivá s vysokými metabolickými požiadavkami (napr. mozog, pečeň či obličky) sú typické rozsiahlou sieťou kapilár, na rozdiel od tkanív s nižšími metabolickými požiadavkami (napr. šľachy či väzy). Tieto cievy neobsahujú vrstvy *tunica media* a *tunica adventitia*. Sú tvorené len jednou vrstvou endotelových buniek a bazálnou membránou (Tortora and Derrickson, 2011).

Miestami na kapiláru priliehajú tzv. pericyty (Armulik *et al.*, 2011), ktorým sa hovorí aj Rougetove bunky podľa ich objaviteľa, francúzskeho anatóma a histológa, Charlesa Rougeta (Čihák *et al.*, 2016). Tvoria ich bunkové telo s jadrom, malým obsahom cytoplazmy a niekoľkými výbežkami, pomocou ktorých obopínajú kapiláru. Priamym fyzickým kontaktom a parakrinnými signalizačnými cestami komunikujú s endotelovými bunkami a plnia dôležité metabolické, signalizačné a mechanické úlohy (Attwell *et al.*, 2016; Bergers and Song, 2005).

Obrázok č. 1 - Morfológická stavba krvných ciev



Obrázok zobrazuje morfológickú stavbu ciev. Na ľavej strane obrázku je zobrazená stavba artérie (artery), na pravej strane stavba žily (vein) a v spodnej časti obrázku stavba kapiláry (capillary). Tunica intima - vnútorná vrstva, endothelium - endotel, subendothelial layer - subendotelová vrstva, internal elastic membrane - vnútorná elastická membrána, tunica media - stredná vrstva, external elastic membrane - vonkajšia elastická membrána, tunica externa - vonkajšia vrstva, valve - chlopňa, lumen - priestor ciev, capillary network - kapilárna sieť, basement membrane - bazálna membrána, endothelial cells - endotelové bunky.

Prevzaté a upravené z: *The Cardiovascular System: Blood Vessels* [online]. Dostupné z: <<https://anatomyandphysiology.com/cardiovascular-system-blood-vessels/>> [2019-03-02]

2.2 Endotel

Endotel je tvorený jednou súvislou vrstvou buniek, ktoré pokrývajú vnútorný povrch krvných a lymfatických ciev (Čihák *et al.*, 2016; Karásek *et al.*, 2004; Karetová, 2002; Tortora and Derrickson, 2011; Van de Graaff, 2000). Pre endotelové bunky je typický nepravidelný, podlhovastý tvar. Ako už bolo uvedené, endotel nie je len bariérou, ktorá oddeľuje cievnu stenu od krvi, ale je aj metabolicky veľmi aktívnym orgánom s množstvom fyziologických funkcií (Karásek *et al.*, 2004).

Endotel predstavuje endokrinný orgán nevyhnutný pre udržanie homeostázy v celom organizme. Funguje prostredníctvom širokého spektra signalizačných molekúl (Bernatova *et al.*, 2014). Je vysoko dynamický a nepretržite reaguje na rôzne zmeny v mechanických či biochemických stimuloch (Kerr *et al.*, 2011). Senzorická aktivita jednotlivých endotelových buniek je obmedzená, avšak vďaka ich vzájomnej komunikácii a neustálemu zdieľaniu informácií medzi sebou, je zabezpečená mimoriadna senzorická schopnosť endotelu (McCarron *et al.*, 2017).

2.2.1 Fyziologická funkcia endotelu

Funkcia endotelu je zaisťovaná prostredníctvom uvoľňovania biologicky aktívnych látok, ktoré majú vplyv napríklad na permeabilitu, cievny tonus, hemostázu, fibrinolýzu či angiogénu (Cines *et al.*, 1998; Deanfield *et al.*, 2007; Michiels, 2003).

2.2.1.1 Endotel a permeabilita

Medzi najvýznamnejšie homeostatické funkcie endotelu patrí regulácia výmeny látok medzi krvou a okolitými tkanivami. Endotel predstavuje semipermeabilnú bariéru medzi krvou a okolitým tkanivom a reguluje prestup bunkových i nebunkových elementov. Nebunkové krvné komponenty prestupujú paracelulárne či transcelulárne. Krvné elementy - leukocyty pre svoj prestup vyžadujú adhéziu na povrch endotelu, pričom využívajú adhézne molekuly, ktoré endotel exprimuje na svojom povrchu. Medzi tieto adhézne molekuly patrí napríklad vaskulárna bunková adhézna molekula-1 (VCAM-1), intercelulárna adhézna molekula-1 (ICAM-1), doštičková endotelová adhézna molekula-1 (PECAM-1) či E-selektín (Félétou, 2011; Karásek *et al.*, 2004). Prestup leukocytov cez stenu cievy sa nazýva diapedéza a práve adhézia leukocytov na povrch endotelu predstavuje prvý krok tohto viacstupňového procesu (Rajendran *et al.*, 2013). Interakcie medzi leukocytmi a vaskulárnym endotelom prispievajú k imunitnej odpovedi, reparácii rán, ako aj k rozvoju akútneho a chronického zápalu (Félétou, 2011; Karásek *et al.*, 2004).

2.2.1.2 Endotel a regulácia cievneho tonusu

Ďalšou dôležitou funkciou endotelových buniek je regulácia prietoku krvi a napätia cievnej steny (Rajendran *et al.*, 2013). Ich stimulácia hormónmi, neurotransmitermi, pôsobkami odvodenými z krvných doštičiek a koagulačného systému vedie k uvoľňovaniu substancií, ktoré pôsobia ako relaxačné faktory (Karetová, 2002). Príkladom je oxid dusnatý (NO). Tento endogénny vazodilatátor, ktorý produkujú a následne ako odpoveď na rôzne fyziologické i patofyziologické zmeny uvoľňujú endotelové bunky, spôsobuje prostredníctvom solubilnej guanylátcyklázy relaxáciu hladkého svalstva ciev (Pirahanchi and Brown, 2018). NO je syntetizovaný z L-arginínu pomocou NO syntázy (Daff, 2010; Oliveira-Paula *et al.*, 2016; Stuehr and Vasquez-Vivar, 2017). Najdôležitejšou izoformou NO syntázy je endotelová NO syntáza (eNOS), ktorá je kódovaná génom *NOS3* (Oliveira-Paula *et al.*, 2016). Vazodilatátor NO inhibuje expresiu adhézných molekúl endotelu, apoptózu endotelových buniek, adhéziu a agregáciu trombocytov a taktiež svojim protizápalovým pôsobením inhibuje proliferatívne procesy v cievnej stene (Karásek *et al.*, 2004; Karetová, 2002).

Ďalšou vazodilatačne pôsobiacou látkou produkovanou endotelom je prostacyklín (PGI₂) (Karásek *et al.*, 2004; Karetová, 2002; Kerr *et al.*, 2011). Je produktom metabolizácie kyseliny arachidónovej pomocou enzýmu cyklooxygenáza (COX). Napriek tomu, že endotelové bunky konštitutívne exprimujú COX-1 izoformu tohto enzýmu, je známe, že vaskulárny PGI₂ je generovaný hlavne prostredníctvom izoformy COX-2 (Brock *et al.*, 1999; Toniolo *et al.*, 2013). Okrem toho, že tento vazodilatátor pôsobí relaxačne, pôsobí aj ako významný inhibítor agregácie trombocytov (Moncada *et al.*, 1977).

Tretím relaxačným faktorom je endotelový hyperpolarizačný faktor (EDHF). Jeho hlavná funkcia je pravdepodobne dilatácia ciev v koronárnom riečisku (Karásek *et al.*, 2004). Uvedené substancie NO, PGI₂ a EDHF pôsobia synergicky (Karetová, 2002).

Okrem produkcie vazodilatačných faktorov, endotel pre zachovanie rovnováhy produkuje i faktory vazokonstričné (Rajendran *et al.*, 2013). Príkladom je peptid endotelín-1 (ET-1) a vazokonstričné prostanoidy – prostaglandín H₂, tromboxán A₂ (TXA₂). ET-1 má okrem vazokonstričného pôsobenia aj prozápalové a promitogénne vlastnosti. Jeho syntézu stimuluje napríklad trombín (aterogénny proteín) či oxidované lipoproteíny s nízkou denzitou (oxLDL) (Karásek *et al.*, 2004; Karetová, 2002). Prostanoidy prostaglandín H₂ a TXA₂ pôsobia antagonisticky voči NO prostredníctvom aktivácie tromboxánových receptorov doštičiek a cievnej hladkej svaloviny (Karetová, 2002).

Vazokonstrične pôsobí aj konverzia angiotenzínu I na angiotenzín II na povrchu endotelu, čím dochádza k degradácii vazodilatačne pôsobiaceho bradykinínu (Igić and Skrbic, 2014; Qu *et al.*, 2015). Tieto substancie pôsobia predovšetkým lokálne, ale do určitej miery môžu vykazovať i účinky systémové a podieľať sa tak na regulácii arteriálnej štruktúry a remodelácie (Deanfield *et al.*, 2007).

Z uvedeného vyplýva, že modulácia cievneho tonusu prostredníctvom endotelu je výsledkom produkcie a uvoľňovania vazodilatátorov (NO, PGI₂, EDHF), vazokonstriktorov (ET-1, prostanoidy) a konverzie angiotenzínu I na angiotenzín II na povrchu endotelu (Deanfield *et al.*, 2007; Mombouli and Vanhoutte, 1999).

2.2.1.3 Endotel a hemostáza

Endotel má kľúčovú úlohu pri zabezpečovaní správnej hemostatickej rovnováhy. Za fyziologických podmienok endotelové bunky zabraňujú vzniku trombózy prostredníctvom rôznych antikoagulačných a protidoštičkových mechanizmov. Tieto bunky majú zároveň dôležité miesto vo všetkých hlavných hemostatických dráhach vyvolaných vaskulárnym poškodením a limitujú tvorbu zrazenín v oblastiach, kde je potrebná hemostáza pre obnovenie cievnej integrity (Rajendran *et al.*, 2013). V prevencii trombózy sa endotel z veľkej časti uplatňuje prostredníctvom uvoľňovania už uvedených vazodilatátorov NO a PGI₂ (Karetová, 2002; Kerr *et al.*, 2011).

Naviac, endotelové bunky syntetizujú glykoproteín nazývaný von Willebrandov faktor (vWF), ktorý je skladovaný vo Weibel-Paladeho telieskach. Jeho uvoľnenie spôsobuje napríklad trombín či histamín prostredníctvom zvýšenia cytosolickej koncentrácie vápenatých iónov, ale aj iné faktory ako napríklad hypoxia. Glykoproteín vWF spôsobuje agregáciu krvných doštičiek a následne stabilizuje koagulačný faktor VIII (Vischer, 2006). Jeho zvýšená expresia, podobne ako zvýšená expresia tkanivového faktoru, navodzuje protrombogénny stav (Karásek *et al.*, 2004).

Ďalej sa na riadení hemostázy významne podieľajú faktory ako napríklad už uvedený TXA₂ či trombomodulín. Trombomodulín je proteín exprimovaný endotelom, komplex trombomodulín-trombín inhibuje koaguláciu (Karásek *et al.*, 2004). Endotel naviac kontroluje aj fibrinolýzu prostredníctvom uvoľňovania tkanivového aktivátoru plazminogénu, čo umožňuje transformáciu plazminogénu na plazmín, ktorý štiepi molekuly fibrínu (Nordt and Bode, 2000; Yakovlev and Medved, 2018). Tkanivový aktivátor plazminogénu môže byť inhibovaný svojim inhibítorom, ktorý sa nazýva inhibítor plazminogénového aktivátoru a tiež je syntetizovaný endotelom (Larsson *et al.*, 2016).

Pre správnu funkciu cievneho riečiska musí byť zachovaná rovnováha medzi prokoagulačnými a antikoagulačnými faktormi (Rajendran *et al.*, 2013).

2.2.1.4 Endotel a angiogenéza

Endotel zohráva úlohu aj pri angiogenézi. Tento proces sprostredkujú rastové faktory ako napríklad vaskulárny endotelový rastový faktor, doštičkový rastový faktor

či transformujúci rastový faktor-beta (TGF- β). Ide o mitogény stimulujúce rast hladkosvalových buniek, čo vedie k hypertrofií cievnej steny. Na druhej strane, dôležitým antimitogénom je NO, ktorý zabraňuje hypertrofií steny cievy tým, že proliferáciu hladkosvalových buniek inhibuje (Karásek *et al.*, 2004).

2.3 Endotelová dysfunkcia a aterogenéza

Endotelovú dysfunkciu chápeme ako komplexné poškodenie funkcie endotelu. Ide o multifaktoriálny proces, ktorý je asociovaný s výskytom ochorení, ako napríklad arteriálna hypertenzia, chronické srdcové zlyhávanie, ischemická choroba srdca, komplikácie ochorenia diabetes mellitus či chronická renálna insuficiencia (Bernatova *et al.*, 2014; Endemann and Schiffrin, 2004; Hadi *et al.*, 2005; Rajendran *et al.*, 2013). Medzi rizikové faktory asociované s poškodením endotelovej funkcie patrí fajčenie, obezita, starnutie, hypercholesterolémia, hypertenzia či hyperglykémia (viď. Obrázok č. 2) (Gokce *et al.*, 2002; Libby *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 1994; Steinberg *et al.*, 1996).

Z predchádzajúcich podkapitol vyplýva, že pre správnu funkciu endotelu je nevyhnutná rovnováha medzi vazodilatačnými a vazokonstričnými faktormi, prokoagulačnými a antikoagulačnými činiteľmi i rovnováha medzi inhibítormi a promótormi rastu. Endotelová dysfunkcia predstavuje stav, ktorý je charakterizovaný práve narušením tejto rovnováhy (Karetová, 2002). Ide o posun k činiteľom prozápalovým, proliferatívnym a prokoagulačným (Anderson, 1999; Daiber *et al.*, 2017; Rajendran *et al.*, 2013). Prejavuje sa zvýšenou cievnu permeabilitou, sklonom k vazospazmu, nedostatočnou inhibíciou subendotelovej proliferácie a tendenciou k trombóze (Karásek *et al.*, 2004).

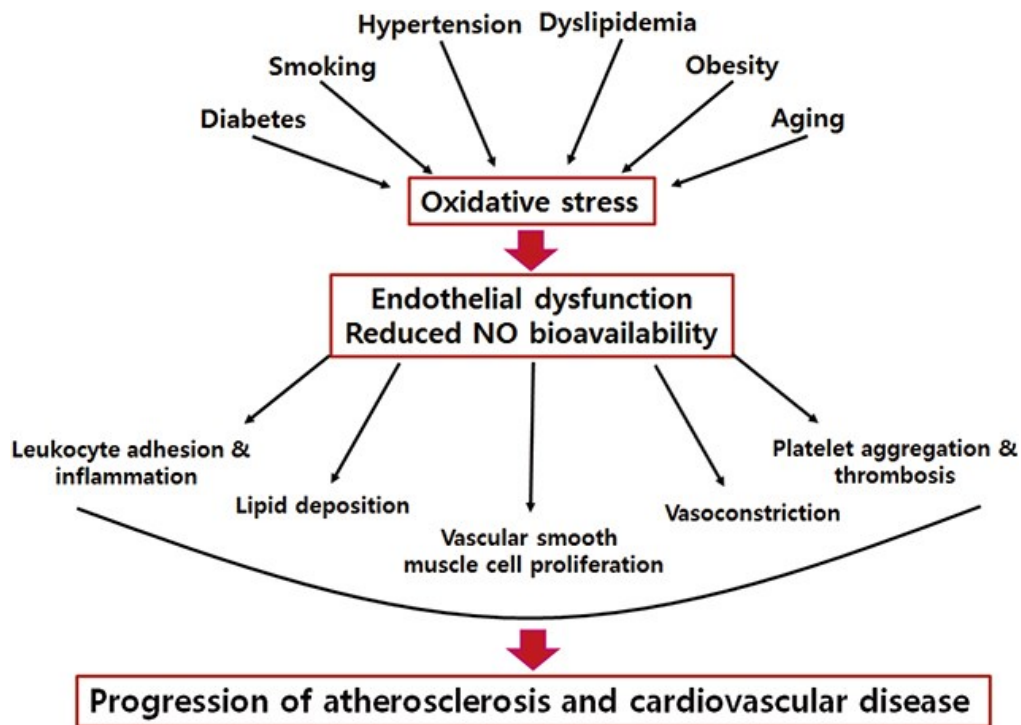
Významnú úlohu v rozvoji endotelovej dysfunkcie má oxidatívny stres, teda nerovnováha medzi antioxidačnou kapacitou a množstvom voľných radikálov (Rajendran *et al.*, 2013). Následkom toho dochádza k zníženiu dostupnosti NO, k zvýšeniu vaskulárnej permeability a k podpore adhézie leukocytov (Lum and Roebuck, 2001; Rajendran *et al.*, 2013). Znížením dostupnosti NO dochádza k poškodeniu vazodilatačnej schopnosti endotelu. Ide o kľúčový prejav endotelovej dysfunkcie (Anderson, 1999; Lerman and Burnett, 1992).

Endotelová dysfunkcia vyúsťuje v chronický zápalový proces charakteristický už spomínaným zvýšením vazokonstričných a protrombotických faktorov, čo zvyšuje riziko kardiovaskulárnych príhod (Bonetti *et al.*, 2003). Predchádza vzniku aterosklerotických lézií a zároveň prispieva ku klinickej manifestácii aterosklerózy (Bonetti *et al.*, 2003; Daiber *et al.*, 2017; Hadi *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 1994).

Poškodený endotel je zodpovedný za prienik aterogénnych lipidov i za zvýšenú expresiu adhézných molekúl (ICAM-1, VCAM-1, P-selektín či E-selektín) a produkciu cytokínov. Tým umožňuje kumuláciu monocytov v stene cievy. Tie sa menia na makrofágy, ktoré po pohltení oxLDL častíc tvoria penové bunky, čo vedie k tvorbe tukových prúžkov. Tukové prúžky sú prvou rozpoznateľnou aterosklerotickou léziou. Môžu regresovať, ostať statické ale môže dôjsť aj k ich progresii. Ich extracelulárnym rastom vzniká lipidové jadro. Dochádza k proliferácii buniek hladkého svalstva, ich migrácií do subendotelových priestorov a tvorbe extracelulárneho väziva. Formuje sa tzv. fibrózna čiapočka. Ako následok týchto dejov sa môže klinicky manifestovať sklon k vazospazmom (napr. mikrovaskulárna *angina pectoris*) (Cockerill and Xu, 2011; Fábryová, 2009; Karásek *et al.*, 2004; Karetová, 2002).

V pokročilých fázach aterosklerózy dochádza ku kumulácii lipidov v lipidovom jadre, čo je nasledované apoptózou penových buniek. Rastie lipidové jadro a rozvíja sa aterosklerotický plát (vid'. Obrázok č. 3). Následne môže dôjsť k jeho ruptúre až úplnému uzavretiu tepny. Podieľa sa na tom nedostatočná produkcia vazodilatátorov (NO, PGI₂) a zvýšená expresia vWF a tkanivového faktoru (Cockerill and Xu, 2011; Fábryová, 2009; Karásek *et al.*, 2004; Karetová, 2002).

Obrázok č. 2 - Schéma vzniku aterosklerózy

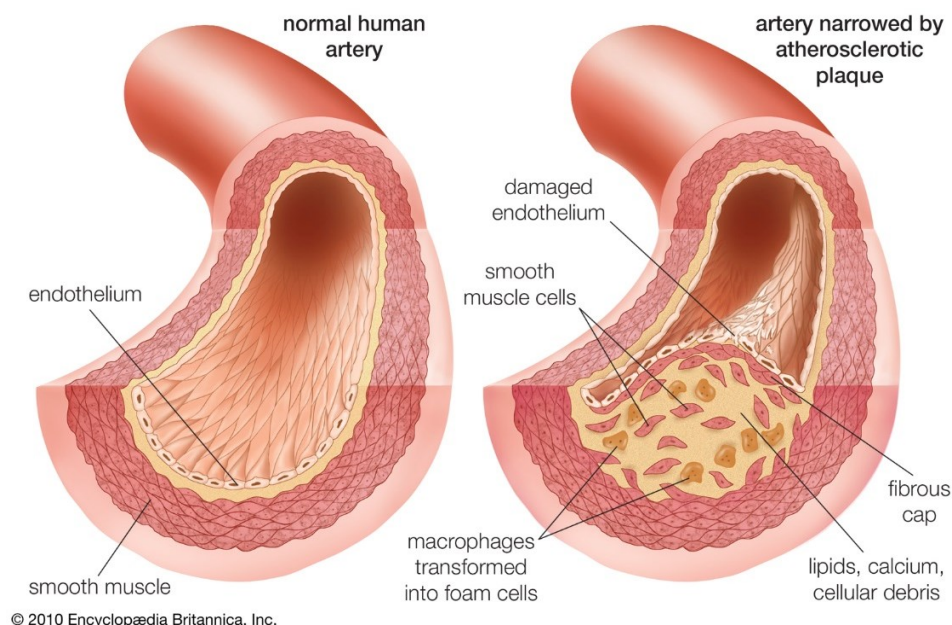


Na obrázku je zobrazená progresia od rizikových faktorov endotelovej dysfunkcie (diabetes - diabetes, smoking - fajčenie, hypertension - hypertenzia, dyslipidemia - dyslipidémia, obesity - obezita, aging - starnutie) až po vznik aterosklerózy. Táto progresia je sprostredkovaná oxidatívnym stresom (oxidative stress) a rozvojom endotelovej dysfunkcie (endothelial dysfunction).

Reduced NO bioavailability - znížená biodostupnosť oxidu dusnatého, leukocyte adhesion & inflammation - adhézia leukocytov & zápal, lipid deposition - ukladanie lipidov, vascular smooth muscle cell proliferation - proliferácia vaskulárnych hladkosvalových buniek, vasoconstriction - vazokonstrikcia, platelet aggregation & thrombosis - agregácia doštičiek & trombóza, progression of atherosclerosis and cardiovascular disease – progresia aterosklerózy a kardiovaskulárneho ochorenia.

Prevzaté z: *Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches* (Park and Park, 2015).

Obrázok č. 3 - Rozdiel medzi zdravou a aterosklerózou poškodenou cievou



Na ľavej strane obrázku je zobrazená nepoškodená ľudská atéria (normal human artery). Endothelium - endotel, smooth muscle - hladký sval.

Na pravej strane obrázku je zobrazená artéria zúžená aterosklerotickým plátom (artery narrowed by atherosclerotic plaque). Damaged endothelium - poškodený endotel; smooth muscle cells - hladkosvalové bunky; fibrous cap - fibrózna čiapočka; macrophages transformed into foam cells - makrofágy premenené na penové bunky; lipids, calcium, cellular debris – lipidy, vápnik, bunkové úlomky.

Prevzaté a upravené z: Atherosclerosis. Encyclopaedia Britannica [online]. Dostupné z: <<https://www.britannica.com/science/atherosclerosis>> [2019-03-09]

2.4 Adhézne molekuly

Adhézne molekuly sú bunkové povrchové štruktúry, ktoré sprostredkujú interakcie medzi bunkami alebo medzi bunkami a extracelulárnou hmotou (extracelulárnou matrix). Tieto interakcie vedú k vzájomnému priľnutiu buniek, čiže k adhézii. Bunkové adhézne molekuly (CAMs) patria medzi transmembránové glykoproteíny. Podieľajú sa na fyziologických a patologických procesoch, ako napríklad diferenciácia, proliferácia, apoptóza, angiogenéza či zápalové procesy (Golias *et al.*,

2007; Hua, 2013; Ohene-Abuakwa and Pignatelli, 2000; Windisch *et al.*, 2019). Dôležitú úlohu hrajú v imunitnej odpovedi organizmu, nakoľko umožňujú prichytenie leukocytov k endotelu a tým ich následný prienik k miestu zápalu (Karetová, 2002). Expresia konkrétnych CAMs, ako napríklad ICAM-1, VCAM-1, P-selektín či E-selektín, je v oblastiach zápalu lokálne indukovaná alebo zosilnená. Sú teda dobrými markermi endotelovej dysfunkcie. Up-regulácia alebo nadmerná expresia CAMs je typická pre mnohé zápalové ochorenia, či už kardiovaskulárneho systému (viď. tvorba aterosklerotického plátu - podkapitola 2.3), kože, obličiek, gastrointestinálneho traktu, mozgu alebo pečene (Bloemen *et al.*, 1995; Koning *et al.*, 2002).

CAMs delíme na základe rozdielov v ich štruktúre do štyroch hlavných skupín: kadheríny, selektíny, integríny a adhézne molekuly imunoglobulínového typu (Windisch *et al.*, 2019).

Selektíny (P-selektín, E-selektín, L-selektín) a ich ligandy (hlavne P-selektínový ligand) sa podieľajú na rolovaní a priľnutí leukocytov k endotelu. Adhézne molekuly imunoglobulínového typu (ICAM-1, VCAM-1) ako aj niektoré integríny indukujú pevnú adhéziu leukocytov k cievnemu povrchu. K aktivácii integrínov exprimovaných na povrchu leukocytov dochádza prostredníctvom chemokínov. Následne pomocou PECAM-1 dochádza k ich extravazácii cez endotel do subendotelového priestoru (viď. Obrázok č. 4) (Blankenberg *et al.*, 2003; Lawson and Wolf, 2009; Oettgen and Broide, 2012).

Táto diplomová práca je zameraná na adhézne molekuly imunoglobulínového typu, konkrétne ICAM-1 a VCAM-1 a molekulu zo skupiny selektínov - P-selektín. Ich lokalizácia a funkcia je zhrnutá v Tabuľke č. 1.

Obrázok č. 4 - Prestup leukocytov cez endotel do subendotelového priestoru

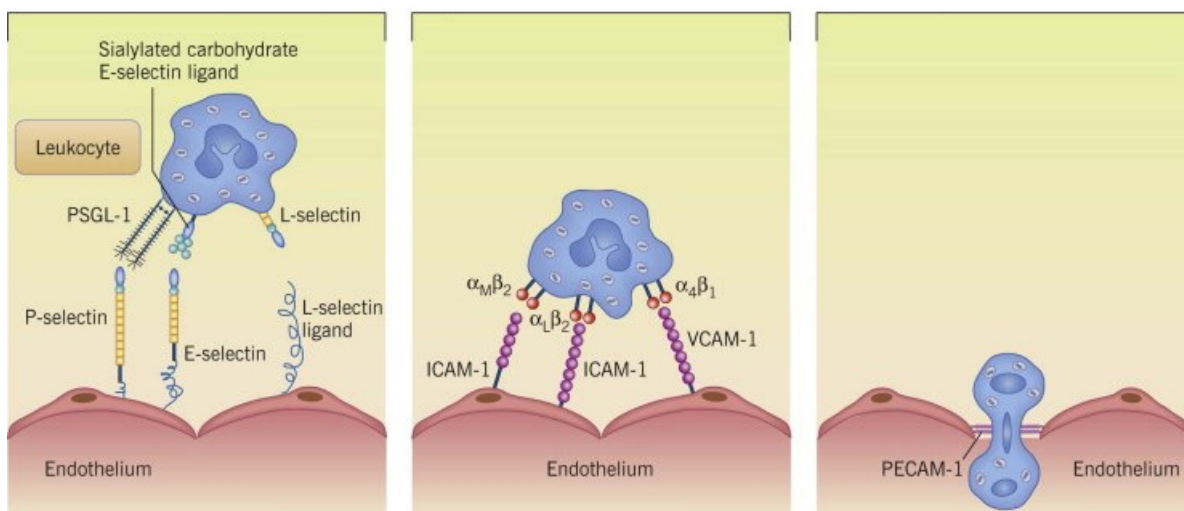


Schéma znázorňuje prestup leukocytov do subendotelového priestoru za pomoci adhézných molekúl. V ľavej časti obrázku je znázornený cirkulujúci leukocyt (leukocyte), ktorý sa spočiatku viaže k endotelu (endothelium) pomocou selektínov a ich ligandov. V strednej časti je znázornená pevná väzba (adhézia) leukocytu k endotelu prostredníctvom integrínov ($\alpha_M\beta_2$, $\alpha_L\beta_2$ a $\alpha_4\beta_1$) a molekúl imunoglobulínového typu (ICAM-1, VCAM-1). V pravej časti obrázku je vidieť transendotelovú migráciu leukocytu za pomoci molekuly PECAM-1.

Sialylated carbohydrate E-selectin ligand - sialylovaný karbohydrátový E-selektínový ligand, PSGL-1 - P-selektínový glykoproteínový ligand-1, L-selectin - L-selektín, P-selectin - P-selektín, E-selectin - E-selektín, L-selectin ligand - L-selektínový ligand, ICAM-1 - intercelulárna adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, PECAM-1 - doštičková endotelová adhézna molekula-1.

Prevzaté a upravené z: Introduction to mechanisms of allergic disease (Oettgen and Broide, 2012).

Tabuľka č. 1 - Lokalizácia a funkcia vybraných adhézných molekúl

| Adhézna molekula | Lokalizácia | Funkcia |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| Skupina selektínov | | |
| P-Selektín | Endotelové bunky a doštičky | Rolovanie |
| Rodina Ig adhézných molekúl | | |
| ICAM-1 | Endotelové bunky a monocyty | Adhézia/migrácia |
| VCAM-1 | Endotel | Adhézia |

Rodina Ig adhéznych molekúl - rodina imunoglobulínových adhéznych molekúl, ICAM-1 - intercelulárna adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula.

Prevzaté a upravené z: Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation Focusing on Inflammatory Heart Disease (Golias et al., 2007).

2.4.1 ICAM-1

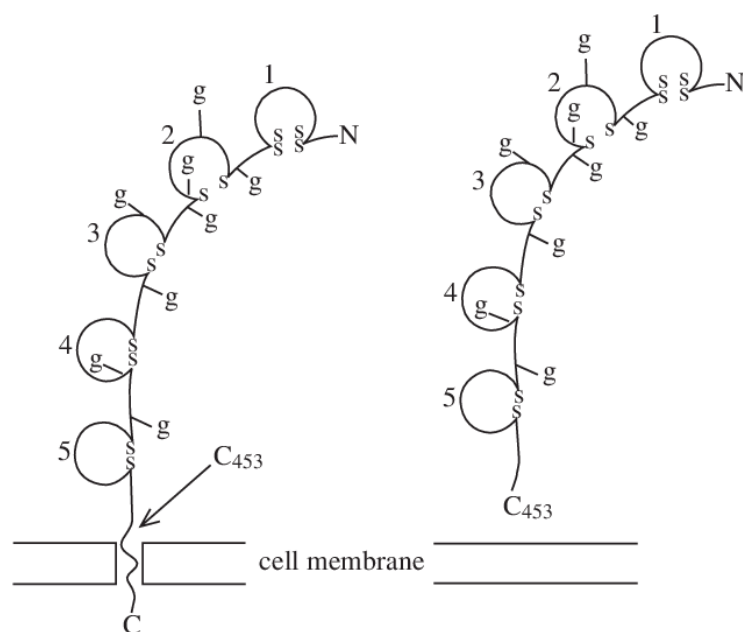
ICAM-1 (označovaný tiež CD54) je najintenzívnejšie preštudovaná molekula z dokopy piatich identifikovaných intercelulárnych adhéznych molekúl (Hubbard and Rothlein, 2000; Koning *et al.*, 2002; Muro and Muzykantov, 2005). Tento transmembránový glykoproteín, patriaci medzi adhézne molekuly imunoglobulínového typu, má veľkosť 80-114 kDa v závislosti od stupňa jeho glykozylácie. Jeho extracelulárnu časť tvorí 453 prevažne hydrofóbných aminokyselín, ktoré vytvárajú päť imunoglobulínových domén stabilizovaných disulfidovými väzbami. Nasleduje hydrofóbná transmembránová časť, ktorú tvorí 24 aminokyselín a cytoplazmatická časť tvorená 28 aminokyselinami (viď. Obrázok č. 5) (Lawson and Wolf, 2009).

Adhézna molekula ICAM-1 je exprimovaná predovšetkým na povrchu leukocytov a endotelových buniek (Lawson and Wolf, 2009; Windisch *et al.*, 2019). Na povrchu endotelových buniek je lokalizovaná apikálne i bazolaterálne, čo vytvára ideálne podmienky pre umožnenie transendotelovej migrácie leukocytov (Hua, 2013).

V cirkulácii je prítomná solubilná forma ICAM-1 (sICAM-1), ktorá je výsledkom proteolytického štiepenia molekuly špecifickými proteázami. Na rozdiel od ICAM-1 neobsahuje transmembránovú a cytoplazmatickú doménu (viď. Obrázok č. 5) (Witkowska and Borawska, 2004).

Zvýšené hladiny sICAM-1 sú pozorované u pacientov s aterosklerózou, srdcovou insuficienciou, ischemickou chorobou srdca či transplantáčnou vaskulopatiou (Lawson and Wolf, 2009; Muro and Muzykantov, 2005; Witkowska and Borawska, 2004). Hladiny cirkulujúcich adhéznych molekúl považujeme za markery endotelovej dysfunkcie alebo aktivácie (Pankow *et al.*, 2016).

Obrázok č. 5 - Štruktúra ICAM-1 a sICAM-1



Na ľavej strane obrázku je zobrazená štruktúra molekuly ICAM-1, ktorá sa skladá z extracelulárnej, transmembránovej (cell membrane - cytoplazmatická membrána) a cytoplazmatickej časti. Na pravej strane obrázku je znázornená štruktúra sICAM-1, ktorej transmembránová a cytoplazmatická časť molekuly chýba. Extracelulárnu časť tvorí päť imunoglobulínových domén (na obrázku sú očíslované 1-5). Písmenami „s“ sú vyjadrené disulfidové väzby, ktorými je stabilizovaná extracelulárna časť molekuly. Písmeno „g“ označuje miesta glykozylácie.

Prevzaté z: Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) (Witkowska and Borawska, 2004).

2.4.1.1 Regulácia expzie ICAM-1 vo vz'ahu k endotelu

Ako už bolo uvedené, adhézna molekula ICAM-1 zohráva dôležitú úlohu v transendotelovej migrácii leukocytov. Túto molekulu na svojom povrchu konštitutívne exprimuje niekoľko typov buniek, pričom jej expresia je najvýraznejšia vo vaskulárnych endotelových bunkách. Za fyziologických podmienok je exprimovaná v nízkych množstvách, avšak pôsobením určitých stimulačných podnetov môže dôjsť k nárastu tejto expzie (Hua, 2013).

Jej expresiu v endotelových bunkách zvyšujú patologické stimuly, ako napríklad prítomnosť prozápalových cytokínov, konkrétne interleukínu-1, tumor nekrotizujúceho

faktoru- α a interferónu- γ (Golias *et al.*, 2007; Muro and Muzykantov, 2005; Scholz *et al.*, 1996), či pôsobenie oxidačného stresu (Hubbard and Rothlein, 2000). Expresiu adhéznej molekuly ICAM-1 ďalej zvyšuje oxidovaná i natívna forma lipoproteínov s nízkou denzitou (LDL) (Galkina and Ley, 2007).

Prozápalové pôsobenie molekuly ICAM-1 potvrdila štúdia vykonaná za použitia apolipoproteín E (ApoE) deficientných myší. Myši experimentálnej skupiny sa na rozdiel od kontrolnej skupiny vyznačovali deficitom ICAM-1. Štúdia preukázala, že deficit tejto adhéznej molekuly u experimentálnej skupiny myší redukuje výskyt aterosklerotických lézií o 30 % v porovnaní s kontrolnou skupinou. Myši boli kŕmené štandardnou výživou pre hlodavce do 20. týždňa veku. Tento výsledok zdôrazňuje úlohu ICAM-1 v rozvoji aterosklerózy a teda potvrdzuje predpoklad, že táto molekula pôsobí prozápalovo (Collins *et al.*, 2000).

ICAM-1 interaguje s β_2 integrínmi exprimovanými na leukocytoch (vid'. Obrázok č. 4), čo vedie k podpore adhézie leukocytov k endotelu (Galkina and Ley, 2007; Golias *et al.*, 2007; Hubbard and Rothlein, 2000; Lawson and Wolf, 2009; Oettgen and Broide, 2012).

V prípade prítomnosti zápalu, pozorujeme silnú up-reguláciu molekuly ICAM-1 už v priebehu 24 hodín (Scholz *et al.*, 1996). Na rozdiel od selektínov, pre ktoré je typická rýchla down-regulácia po indukcií, ICAM-1 (aj VCAM-1) zostáva na povrchu bunky po dobu dlhšiu ako 48 hodín (Koning *et al.*, 2002; Mojcik and Shevach, 1997).

2.4.2 VCAM-1

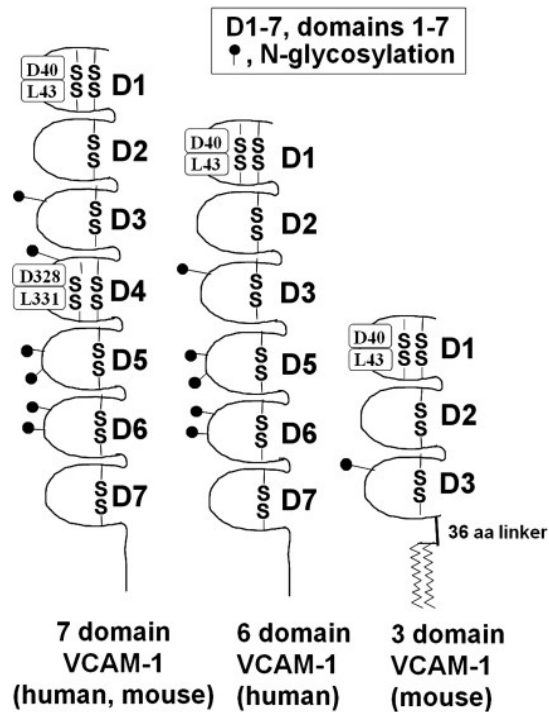
VCAM-1 (označovaný aj CD106) je transmembránový glykoproteín patriaci medzi adhézne molekuly imunoglobulínového typu. Jeho veľkosť je 100-110 kDa (Mantovani and Dejana, 1998; Windisch *et al.*, 2019). Extracelulárnu časť tohto integrálneho glykoproteínu, ktorá je rovnako ako u ICAM-1 stabilizovaná disulfidovými väzbami, tvorí sedem imunoglobulínových domén. Nasleduje transmembránová časť, ktorá pokračuje v cytoplazmatickú doménu tvorenú 19 aminokyselinami (Kumar *et al.*, 1994).

Charakterizovaná molekula VCAM-1 so siedmimi doménami je prevládajúcou formou. U ľudí sa však okrem extracelulárnej časti so siedmimi imunoglobulínovými

doménami vyskytuje aj molekula VCAM-1 so šiestimi doménami. U myši býva okrem sedem-doménovej extracelulárnej časti molekuly, prítomná aj troj-doménová forma (vid'. Obrázok č. 6) (Cook-Mills *et al.*, 2011).

V plazme je prítomná solubilná forma molekuly VCAM-1 (sVCAM-1), ktorej hladiny narastajú v prípade ochorení asociovaných s aktiváciou endotelu. Vzniká odštiepením extracelulárnej časti VCAM-1 z povrchu endotelu a rovnako ako sICAM-1 predstavuje biomarker endotelovej dysfunkcie a aktivácie (Arora *et al.*, 2010; Jha *et al.*, 2010; Pankow *et al.*, 2016).

Obrázok č. 6 - Štruktúra VCAM-1



V ľavej časti obrázku je znázornená sedem-doménová (7 domain) forma VCAM-1 (human - ľudská, mouse - myšacia). V strednej časti je zobrazená ľudská šesť-doménová forma (6 domain), ktorej na rozdiel od prvej formy chýba doména číslo 4. Myšacia troj-doménová forma extracelulárnej časti VCAM-1 je na pravej strane obrázku. D1-D7 sú očíslované imunoglobulínové domény. Integrín $\alpha_4\beta_1$ sa na extracelulárnu časť molekuly viaže v miestach D1 a D4. Taktiež sú znázornené miesta glykozylácie (vid'. legenda v hornej časti obrázku).

Prevzaté z: *Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants* (Cook-Mills *et al.*, 2011).

2.4.2.1 Regulácia expresie VCAM-1 vo vzťahu k endotelu

Napriek tomu, že VCAM-1 je štruktúrne podobná s adhéznou molekulou ICAM-1 i s inými adhéznymi molekulami, spôsob regulácie jej expresie je jedinečný. Za fyziologických podmienok nie je exprimovaná (na rozdiel od ICAM-1), avšak v miestach predisponovaných k ateroskleróze dochádza k rýchlej indukcii jej expresie (Iiyama *et al.*, 1999; Ley and Huo, 2001). Táto indukcia expresie je prítomná u králikov (Cybulsky and Gimbrone, 1991), myši (Nakashima *et al.*, 1998) i u ľudí (O'Brien *et al.*, 1993).

Výsledky štúdie Cybulsky *et al.* preukázali, že nedostatok VCAM-1 u LDL-receptor deficientných myši znižuje počiatočnú tvorbu penových buniek. Zistené údaje teda naznačujú, že adhézna molekula VCAM-1 zohráva hlavnú úlohu v iniciácii aterosklerotického procesu (Cybulsky *et al.*, 2001).

Podobne ako u ICAM-1, prítomnosť molekuly VCAM-1 nie je limitovaná len na bunky endotelu, avšak k jej expresii dochádza predovšetkým práve na povrchu aktivovaných endotelových buniek (Ley and Huo, 2001; Windisch *et al.*, 2019). Expresia tejto molekuly je indukovaná cytokínmi, reaktívnymi formami kyslíka, oxLDL či vysokou hladinou glukózy (Cook-Mills *et al.*, 2011; Windisch *et al.*, 2019).

Viaže sa prevažne s $\alpha_4\beta_1$ integrínom, ktorý je konštitutívne exprimovaný na leukocytoch (viď. Obrázok č. 4). Táto interakcia vedie k spusteniu kaskády vedúcej k migrácii leukocytov (Chen *et al.*, 1999; Windisch *et al.*, 2019).

Z uvedeného vyplýva, že ICAM-1 a VCAM-1 sú štruktúrne podobné, cytokínmi indukovateľné adhézne molekuly imunoglobulínového typu viažuce sa na integríny leukocytov. Zúčastňujú sa na rozvoji aterosklerózy a to tým, že sprostredkujú akumuláciu monocytov v cievnej vrstve *tunica intima*. Ich spoločným znakom je aj fakt, že obidve molekuly sú exprimované v oblastiach predisponovaných k rozvoju aterosklerózy a na periférii daných lézií. Pre molekulu ICAM-1 je však typická jej mohutnejšia expresia (Cybulsky *et al.*, 2001). Práve tieto dva markery endotelovej dysfunkcie (ICAM-1, VCAM-1) sú považované za najvýznamnejšie adhézne molekuly sprostredkujúce transendotelový prestup leukocytov k miestu zápalu (Koning *et al.*, 2002). Napriek svojim odlišnostiam spolu vzájomne spolupracujú pri rôznych

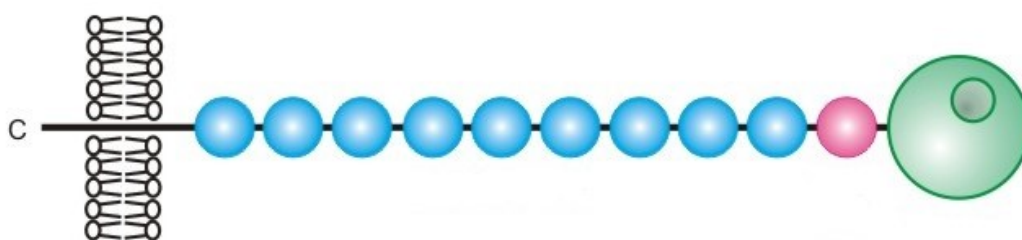
zápalových stavoch, tak ako je tomu aj v prípade P-selektínu a E-selektínu (Dong *et al.*, 1998).

2.4.3 P-selektín

P-selektín (CD62P) patrí spolu s E-selektínom a L-selektínom medzi Ca^{2+} dependentné transmembránové glykoproteíny (Mojcik and Shevach, 1997; Windisch *et al.*, 2019). Ako už bolo uvedené, selektíny sprostredkujú roľovanie leukocytov po vaskulárnom povrchu, čo predstavuje prvý adhézný krok počas zápalového procesu. Tento krok je nasledovaný adhéziou leukocytov a ich transendotelovým prestupom (Blankenberg *et al.*, 2003; Lawson and Wolf, 2009; McEver, 2015).

Základná štruktúra všetkých troch selektínov je zhodná. V ich molekule sa nachádza N-terminálna Ca^{2+} dependentná lektínová doména, ďalej doména podobná epidermálnemu rastovému faktoru (epidermal growth factor-like domain), série zhodných opakujúcich sa domén, transmembránová doména a cytoplazmatická časť (McEver and Zhu, 2010; Ushiyama *et al.*, 1993). P-selektín má veľkosť približne 90 kDa (Ghoshal *et al.*, 2014) a jeho štruktúra je znázornená na Obrázku č. 7.

Obrázok č. 7 - Štruktúra P-selektínu



Na obrázku je zobrazená štruktúra P-selektínu. Extracelulárnu časť tvorí zelenou farbou znázornený N-koncový C-typ lektínovej domény, ružovou farbou znázornená EGF-like (epidermal growth factor-like) doména a modrou farbou znázornených deväť zhodných opakujúcich sa domén (consensus repeat domains). Cytoplazmatickou membránou prechádza transmembránová doména a znázornená je i krátka cytoplazmatická časť molekuly.

Prevzaté a upravené z: P-selectin [online]. Dostupné z:

<<http://www.functionalglycomics.org/CFGparadigms/index.php/P-Selectin>> [2019-03-13]

2.4.3.1 Regulácia expresie P-selektínu vo vzťahu k endotelu

P-selektín je exprimovaný predovšetkým na povrchu endotelových buniek a krvných doštičiek. Skladovaný je v intracelulárnych granulách (α granuly krvných doštičiek a Weibel-Paladeho telieska endotelových buniek), čo umožňuje jeho rýchlu mobilizáciu po stimulácii cytokínmi či reaktívnymi formami kyslíka. P-selektín sa po stimulácii integruje do bunkovej membrány a umožní interakciu medzi leukocytmí a krvnými doštičkami i cievnou stenou (Galkina and Ley, 2007; McEver and Zhu, 2010; Windisch *et al.*, 2019).

Molekula P-selektín je exprimovaná pri akútnych i chronických zápalových procesoch (Galkina and Ley, 2007). Prispieva k rozvoju aterosklerózy, ischemicko-reperfúzneho poškodenia, arteriálnej trombózy či hlbkej žilovej trombózy (Dong *et al.*, 1998; Falati *et al.*, 2003; Thiagarajan *et al.*, 1997; Wakefield *et al.*, 2009). Pacienti so zápalovými a trombotickými ochoreniami majú typicky vyššie hladiny solubilného P-selektínu v periférnej krvi (McEver, 2015).

Solubilná forma P-selektínu vzniká alternatívnym zotríhom informačnej ribonukleovej kyseliny (mRNA - messenger ribonucleic acid) a je prítomná v plazme a krvných doštičkách. Táto forma molekuly neobsahuje transmembránovú doménu. Ďalším spôsobom tvorby solubilného P-selektínu je enzymatické odštiepenie fragmentu (Ushiyama *et al.*, 1993).

Predpoklad, že P-selektín pôsobí prozápalovo bol potvrdený aj štúdiou publikovanou v roku 2000, v ktorej sa porovnával výskyt aterosklerotických lézií medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou ApoE deficientných myší. Experimentálna skupina bola, na rozdiel od kontrolnej skupiny, P-selektín deficientná. Všetky myši zahrnuté v štúdií boli kŕmené štandardnou výživou pre hlodavce. Výsledok štúdie ukázal, že u P-selektín deficientných myší došlo k redukcii výskytu aterosklerotických lézií o 45 % v porovnaní s kontrolnou skupinou ApoE deficientných myší (Collins *et al.*, 2000).

P-selektínový glykoproteínový ligand-1 je najlepšie charakterizovaný ligand spomedzi ligandov troch uvedených selektínov. Táto transmembránová molekula, exprimovaná neutrofilmi, monocytmi a lymfocytmi, má dôležitú úlohu v sprostredkovaní interakcií medzi leukocytmí a aktivovanými krvnými doštičkami či

medzi leukocytmi a endotelom exprimujúcim P-selektín. Tým indukuje rolovanie leukocytov po povrchu endotelu (vid'. Obrázok č. 4). Práve k P-selektínu má tento ligand najväčšiu afinitu (Frenette *et al.*, 2000; Galkina and Ley, 2007; McEver, 2015; Ramos *et al.*, 1999).

2.5 Endoglín

Endoglín (Eng, označovaný aj CD105) je transmembránový glykoproteín o veľkosti 180 kDa. Je súčasťou TGF- β signalizácie ako prídavný receptor typu III (TGF- β receptor III). Predstavuje regulačnú zložku tohto TGF- β receptorového komplexu. V rámci neho sa podieľa na modulácií bunkových odpovedí na rastový faktor TGF- β (Bot *et al.*, 2009; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Miller *et al.*, 1999). Tento rastový faktor je faktorom multifunkčným, nakoľko reguluje proliferáciu, migráciu, diferenciáciu, produkciu extracelulárnej matrix a prežívanie rôznych typov buniek (Strasky *et al.*, 2011).

TGF- β má tri izoformy - TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3 (Miller *et al.*, 1999). Signalizácia týchto ligandov je umožnená ich väzbou na špecifické receptory. TGF- β interaguje s TGF- β receptorom II a následne dochádza k tvorbe komplexu s TGF- β receptorom I. Po jeho fosforylácií dochádza k prenosu signálu z membrány až do jadra bunky prostredníctvom fosforylovaných Smad proteínov. V jadre dochádza k transkripcii cieľových génov. Endoglín interaguje s vysokou afinitou s izoformami TGF- β 1 a TGF- β 3, ale len keď je asociovaný s TGF- β receptorom II (Bot *et al.*, 2009; Fonsatti *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 1999).

V endotelových bunkách boli identifikované dva typy TGF- β receptoru I, ktorých aktivácia má opačný efekt. Ide o tzv. aktívín receptoru podobné kinázy (skratka ALK – z anglického „activin receptor-like kinase“):

- ALK-1 – indukuje fosforyláciu Smad 1/5, čím prispieva k proliferácií endotelových buniek a k ich migrácií
- ALK-5 – indukuje fosforyláciu Smad 2/3, čo vedie k útlmu týchto procesov

Endoglin nepriamo inhibuje signalizáciu TGF- β /ALK-5 a naopak zvyšuje signalizáciu dráhy TGF- β /ALK-1. Je dôležitý pre udržanie rovnováhy medzi týmito signalizačnými dráhami (Fonsatti *et al.*, 2010).

Zistilo sa, že Eng je exprimovaný hlavne v endotelových bunkách malých a veľkých ciev u ľudí i u myší. Jeho zvýšená expresia je typická pre endotelové bunky nachádzajúce sa v tkanivách kde prebieha angiogenéza. Ďalej bola preukázaná jeho expresia aj v aktivovaných monocytoch, tkanivových makrofágoch, erytroidných prekurzoroch ale aj u vaskulárnych hladkosvalových buniek, a to predovšetkým tých, ktoré sa nachádzajú v cievach s aterosklerotickými plátnami (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Miller *et al.*, 1999).

Rada štúdií preukázala, že tento glykoproteín zohráva kľúčovú úlohu vo fyziologických a patologických procesoch, ako napríklad angiogenéza, hematopoéza, kardiovaskulárny vývoj, ateroskleróza, ischemická choroba srdca, preeklampsia, hypertenzia či diabetes mellitus (De Vivo *et al.*, 2008; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Miller *et al.*, 1999; Nachtigal *et al.*, 2012).

2.5.1 Štruktúra endoglinu

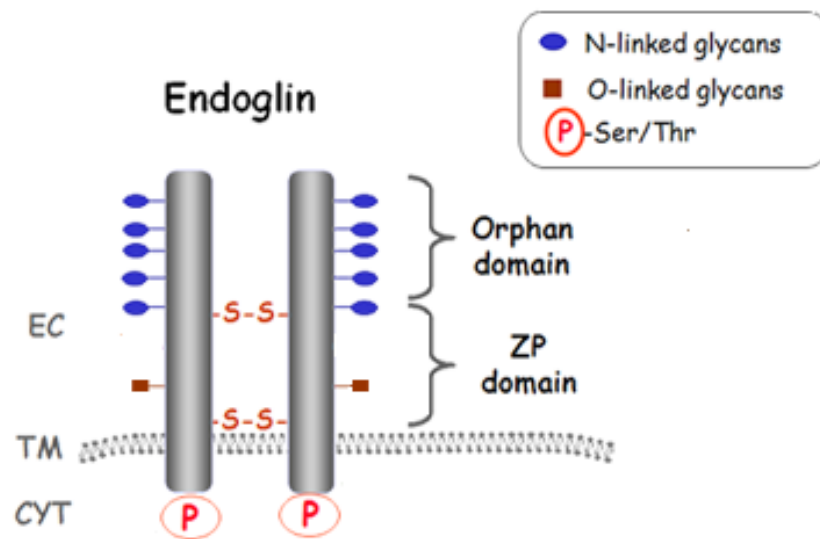
Ľudský endoglin je homodimér zložený z dvoch reťazcov. Každý z nich má veľkosť 95 kDa a sú spojené dvomi disulfidovými väzbami (Cheifetz *et al.*, 1992; Gougos and Letarte, 1990). Pre tento integrálny proteín je charakteristická veľká extracelulárna doména tvorená 561 aminokyselinami, ďalej hydrofóbná transmembránová doména a krátka cytoplazmatická doména (Gougos and Letarte, 1990). Zo štruktúry endoglinu je zrejmé, že patrí medzi proteíny rodiny *zona pellucida*, pre ktoré je charakteristická doména pozostávajúca z 260 aminokyselín nachádzajúca sa v extracelulárnej časti proteínu. Nakoľko NH₂-terminálna doména nevykazuje homológiu so žiadnou rodinou proteínov, bola nazvaná „orphan“ doména (v preklade sirotská doména) (viď. Obrázok č. 8) (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Ľudský endoglin vykazuje vo svojej štruktúre vysokú mieru homológie s myšacím endoglinom. Najväčšie rozdiely medzi nimi sú v proteínovej sekvencii extracelulárnej domény (Nachtigal *et al.*, 2012).

Cytoplazmatická doména endoglinu je fosforylovaná v miestach serínových a treonínových zvyškov. Tieto časti proteínu môžu byť zacielené serínovými

a treonínovými kinázami, v odpovedi na naviazanie ligandu TGF- β 1. Endoglin samotný nemá vnútornú kinázovú aktivitu (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Nachtigal *et al.*, 2012).

V ľudských i myšiacích tkanivách bola popísaná expresia dvoch izoform endoglinu, a to L-izoforma (pomenovanie podľa anglického slova long - dlhý) a S-izoforma (podľa anglického slova short - krátky). Expresia L-izoformy endoglinu prevažuje. Líšia sa v dĺžke ich cytoplazmatickej domény - u L-izoformy je táto časť molekuly dlhá 47 aminokyselín, u S-izoformy 14 aminokyselín (Aristorena *et al.*, 2014). Okrem toho sa odlišujú aj úrovňou fosforylácie, schopnosťou regulovať TGF- β signalizáciu a afinitou k ALK-1 a ALK-5 receptorom (Nachtigal *et al.*, 2012). Na rozdiel od S-izoformy endoglinu, ktorému sa pripisuje antiangiogénny účinok, L-izoforme endoglinu sa pripisuje úloha proangiogénna (Blanco *et al.*, 2008).

Obrázok č. 8 - Štruktúra endoglinu



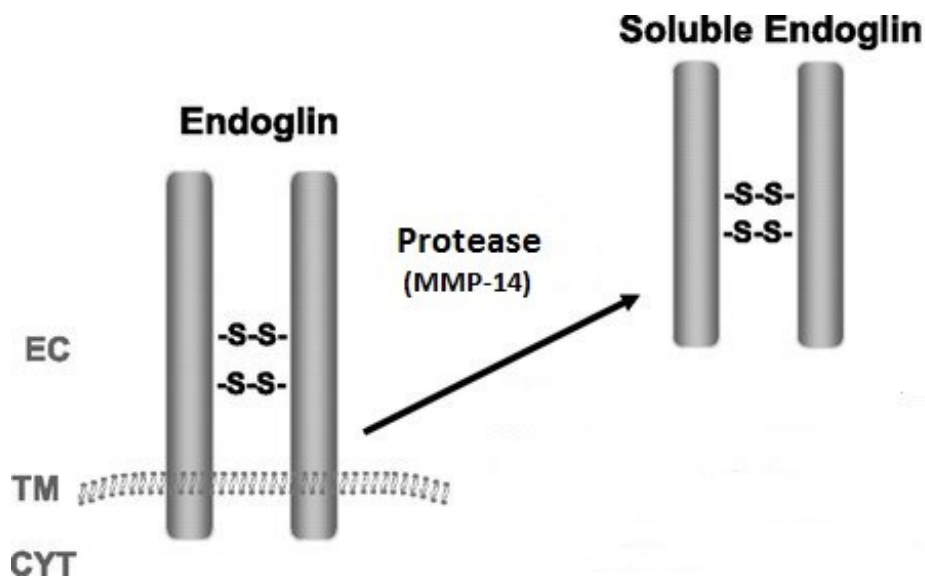
Na obrázku je schematicky znázornená štruktúra endoglinu. Extracelulárna časť proteínu (EC) pozostáva z domény zona pellucida (ZP domain) a N-terminálnej domény (orphan domain). Endoglinové podjednotky sú spojené dvomi disulfidovými väzbami (-S-S-). Nasleduje transmembránová doména (TM) a doména cytoplazmatická (CYT), ktorá je fosforylovaná v miestach serínových a treonínových zvyškov (fosforylácia je na obrázku znázornená písmenom P). Na obrázku sú taktiež znázornené miesta glykozylácie (N-glykozylácia a O-glykozylácia, viď. legenda v pravej hornej časti obrázku).

Prevzaté a upravené z: *Physiological role of endoglin in the cardiovascular system* (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

2.5.2 Solubilný endoglin

Okrem vyššie uvedenej membránovej formy endoglínu, existuje aj jeho solubilná forma. Solubilný endoglin (sEng) vzniká z membránovo viazaného endoglínu proteolytickým štiepením jeho extracelulárnej domény. Hlavnou endoglinovou proteázou je matrix metaloproteináza-14. Extracelulárnu časť molekuly odštiepuje v blízkosti transmembránovej domény, čo vedie k uvoľneniu extracelulárnej domény endoglínu v jej plnej dĺžke (vid'. Obrázok č. 9) (Hawinkels *et al.*, 2010; Ruiz-Remolina *et al.*, 2017). K tomuto štiepeniu dochádza počas poškodenia endotelu či zápalového procesu. Následne sEng vstupuje do cirkulácie (Vitverova *et al.*, 2018).

Obrázok č. 9 - Membránový a solubilný endoglin



Na ľavej strane obrázku je zobrazený membránový endoglin (EC - extracelulárna doména, TM - transmembránová doména, CYT - cytoplazmatická doména). Šípka znázorňuje odštiepenie extracelulárnej domény endoglínu pomocou proteázy MMP-14 (matrix metaloproteináza-14), čo vedie k vzniku solubilného endoglínu. Na obrázku sú znázornené i disulfidové väzby (-S-S-), ktoré spájajú dve 95kDa podjednotky endoglínu.

Prevzaté a upravené z: *The physiological role of endoglin in the cardiovascular system* (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Solubilný endoglin môže interagovať s niekoľkými ligandmi, napríklad s ligandom TGF- β 1. V situácií, keď spolu interagujú sa znižuje dostupnosť tohto ligandu pre interakciu s jeho membránovými receptormi. Dôvodom je fakt, že solubilný endoglin nie je schopný priamo interagovať s extracelulárnou časťou receptorov TGF- β signalizácie (Ruiz-Remolina *et al.*, 2017). Platí však, že väzba TGF- β receptoru II s ligandom TGF- β je omnoho silnejšia ako väzba medzi sEng a TGF- β (Rathouska *et al.*, 2015). Preukázalo sa, že sEng sa priamo viaže s inou biologicky aktívnou molekulou, a to s tzv. „bone morphogenetic protein 9“. Táto väzba vedie k stimulácii sekrécie ET-1 (viď. podkapitola 2.2.1.2). Hladina tohto vazokonstriktora je zvýšená napríklad u pacientiek s preeklampiou. Zároveň sa zistilo, že zvýšená hladina sEng u týchto žien koreluje s vážnosťou daného ochorenia (Gregory *et al.*, 2014; Valbuena-Diez *et al.*, 2012). Navyše, u pacientiek s týmto ochorením bolo zaznamenané významné zvýšenie expresie adhéznej molekuly VCAM-1, čo značí prítomnosť endotelovej dysfunkcie (Endresen *et al.*, 1998).

Na základe zistenia, že ochorenia, u ktorých boli zaznamenané zvýšené hladiny sEng v plazme sú spojené s endotelovou dysfunkciou, vznikol predpoklad, že zvýšenie hladiny sEng možno považovať za marker endotelovej dysfunkcie. Medzi tieto ochorenia patrí už spomínaná preeklampsia, ďalej ateroskleróza, familiárna hypercholesterolémia, hypertenzia či diabetes mellitus 2. typu. Zvýšenie hladín solubilnej formy endoglinu koreluje s morfológiou aterosklerotického plátu a spája sa taktiež s nestabilnou angínou pectoris, akútnym infarktomyokardu i srdcovou remodeláciou po jeho prekonaní (Rathouska *et al.*, 2015).

Za zmienku nepochybne stojí zistenie, že účinky Eng a sEng na cievny endotel sú opačné (Ruiz-Remolina *et al.*, 2017; Vitverova *et al.*, 2018). Kým expresia Eng v cievach sa spája s neoangiogenezou, stabilizáciou aterosklerotických plátov, protizápalovými účinkami, expresiou eNOS v endoteli a so zlepšovaním stavu endotelovej dysfunkcie, tak expresia sEng vyúsťuje v inhibíciu TGF- β signalizácie. Inhibícia tejto signalizačnej dráhy má veľký význam pri ateroskleróze, kedy vyúsťuje v prozápalový stav a v tvorbu aterosklerotických plátov (Nachtigal *et al.*, 2012).

Preukázalo sa, že solubilný endoglin sa spája s inhibíciou eNOS dependentnej vazodilatácie, vyššou expresiou bunkových adhézných molekúl, zvýšenou adhéziou leukocytov k cievnemu endotelu i antiangiogénnymi vlastnosťami (Valbuena-Diez *et*

al., 2012; Vitverova *et al.*, 2018). Navyše, jeho zvýšené hladiny sú spojené so zlou prognózou pacientov s metastázujúcimi solidnými nádormi i s rozsiahlejším orgánovým poškodením u pacientov s hypertenziou a diabetom (Valbuena-Diez *et al.*, 2012).

Spomínaná inhibícia eNOS dependentnej vazodilatácie je pravdepodobne dôvodom zvýšenia arteriálneho tlaku krvi u myší s vysokou hladinou sEng, nakoľko zvýšenie tlaku krvi je následkom zvýšenia vaskulárnej rezistencie. Zistilo sa, že práve zvýšené hladiny sEng môžu prispievať aj k rozvoju hypertenzie u žien s preeklampiou (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Ako je uvedené v podkapitole 2.3, hypercholesterolémia je jedným z rizikových faktorov endotelovej dysfunkcie. Štúdia Strasky *et al.* preukázala, že zvýšená hladina cholesterolu v krvi zvyšuje hladiny sEng a súčasne znižuje expresiu Eng v aorte. U experimentálnej skupiny myší kŕmených diétou s vysokým obsahom cholesterolu došlo k zväčšeniu aterosklerotických plátov v aorte. Táto štúdia je dôkazom, že inhibícia endogénnej signalizácie je jedným z mechanizmov zodpovedných za vznik endotelovej dysfunkcie (Strasky *et al.*, 2011).

Užitočný model pre štúdium endotelovej dysfunkcie predstavuje transgénny myšiaci model exprimujúci ľudský sEng (Sol-Eng⁺) (Valbuena-Diez *et al.*, 2012). Tento model bol použitý aj v štúdií publikovanej v roku 2015, ktorá sa zaoberala vplyvom vysokých hladín sEng na indukciu endotelovej dysfunkcie. Štúdia však preukázala, že vysoká koncentrácia samotného sEng (bez kombinácie s hypercholesterolémiou) nie je schopná indukovať endotelovú dysfunkciu. Použité boli aorty myší starých štyri až šesť mesiacov (Nemeckova *et al.*, 2015). V tejto diplomovej práci bol použitý rovnaký transgénny myšiaci model pre zistenie vplyvu pôsobenia vysokých hladín sEng na markery dysfunkcie endotelu, avšak v aorte myší starých 12 mesiacov (vid'. podkapitola 2.6.2)

2.6 Myšacie modely aterosklerózy

Najčastejšie používaným zvieracím modelom pre štúdium aterosklerózy je v súčasnej dobe myš. Zároveň, väčšina súčasných chápaní mechanizmov týkajúcich sa aterosklerózy vyplýva práve zo štúdií, v ktorých boli použité myšacie modely (Daugherty, 2002; von Scheidt *et al.*, 2017). Myšacie modely aterosklerózy sa

používajú pre identifikáciu dôležitých buniek a molekúl podieľajúcich sa na jednotlivých štádiách aterosklerózy, ako aj za účelom identifikácie enviromentálnych a genetických faktorov, ktoré podporujú tvorbu aterosklerotických lézií. Taktiež môžu poskytnúť pohľad na vplyv hormónov či liekov na dané ochorenie (Breslow, 1996). Používanie myšacích modelov je výhodné z dôvodu ich rýchlej reprodukcie, jednoduchej genetickej manipulácie a možnosti monitorovania aterogenézy v primeranom časovom rámci (Emini Veseli *et al.*, 2017).

Myši predstavujú živočíšne druhy, ktoré sú vysoko rezistentné k rozvoju aterosklerózy (Jawien *et al.*, 2004). Na nízkoenergetickej, nízkocholesterolovej strave, sa ich hladiny cholesterolu zvyčajne pohybujú v hodnotách nižších ako 5,55 mmol/l s tým, že väčšina je obsiahnutá v antiaterogénnej frakcii lipoproteínov s vysokou denzitou, takže nedochádza k vzniku aterosklerotických lézií. Napriek tomu sa podarilo vyvinúť línie myší, ktoré sú náchylné k vzniku tohto ochorenia (Breslow, 1996).

V situácií, keď boli geneticky nemodifikované myši kŕmené stravou, ktorá obsahovala vysoký obsah tuku, cholesterolu a kyselinu cholovú, ich hladiny cholesterolu významne stúpli a väčšina už nebola v antiaterogénnej frakcii lipoproteínov s vysokou hustotou. Po mesiacoch na tejto diéte sa u inbredného kmeňa myší C57BL/6 objavilo niekoľko vrstiev penových buniek v subendotelovom priestore, a to konkrétne v blízkosti cípov aortálnej chlopne. Na druhej strane, u myší z kmeňa C3H/HeJ, tento fenomén pozorovaný nebol (Breslow, 1996). Po týchto zisteniach sa inbredný kmeň C57BL/6 začal široko používať vo výskume zaoberajúcom sa rozvojom aterosklerózy (Daugherty, 2002). Zistilo sa však, že rozvoj lézií u tohto kmeňa myší nie je podobný rozvoju aterosklerózy u ľudí. Odlišnosť sa prejavuje vo veľkosti lézií, v ich histologickej povahe či lokalizácii (Breslow, 1996; Jawien *et al.*, 2004). Používanie tohto myšacieho kmeňa sa obmedzilo s vývojom iných myšacích modelov aterosklerózy (Daugherty, 2002).

Vzhľadom k téme tejto diplomovej práce si uvedieme prehľad vybraných transgénnych myšacích modelov aterosklerózy (vid'. Tabuľka č. 2) a následne sa zameriame na transgénny myšací model s vysokými hladinami ľudského solubilného endoglínu použitý v tejto práci.

2.6.1 Prehľad myšacích modelov aterosklerózy

- ApoE deficientný myšací model (ApoE^{-/-}) patrí medzi najpoužívanejšie myšacie modely aterosklerózy (von Scheidt *et al.*, 2017; Zadelaar *et al.*, 2007). ApoE, tvorený primárne v pečeni, je povrchovou zložkou lipoproteínových častíc a zároveň ligandom pre lipoproteínové receptory. Tieto receptory sú po naviazaní ligandu schopné odstrániť lipoproteíny z cirkulácie (Breslow, 1996). V dôsledku delécie génu pre tento apolipoproteín je pre ApoE^{-/-} myši typické oneskorené odplavenie aterogénnych častíc z obehu. Dochádza u nich k akumulácii chylomikrónov a lipoproteínov s veľmi nízkou hustotou (VLDL), čo je nasledované spontánnym vývojom aterosklerotických lézií a to aj na štandardnej strave, ktorá obsahuje nízky obsah tuku (Breslow, 1996; Zadelaar *et al.*, 2007). Ešte výraznejšia hyperlipidémia a taktiež výraznejší rozvoj aterosklerózy je typický pre myši, u ktorých je okrem *ApoE* génu, vypnutý aj gén pre LDL-receptor (ApoE/LDL-receptor deficientný myšací model) (Emini Veseli *et al.*, 2017).
- ApoE*3-Leiden myšací model je taktiež využívaný v mnohých štúdiách (Emini Veseli *et al.*, 2017). ApoE*3-Leiden mutácia je mutácia v ľudskom *ApoE3* géne, spojená s familiárnou dysbetalipoproteinémiou. Tento transgénny myšací model vznikol vložení ľudského *ApoE*3-Leiden* génu do genómu myši z kmeňa C57BL/6 (Zadelaar *et al.*, 2007). U tých z nich, ktoré boli kŕmené stravou obsahujúcou vysoký obsah cholesterolu a kyseliny cholové, sa ako následok zvýšenia VLDL a LDL frakcií vyvinuli tukové pruhy a fibrózne plaky. U myši boli pozorované zvýšené hladiny cholesterolu a triacylglycerolov. U jedincoch na štandardnej diéte komplexné a pokročilé lézie pozorované neboli (Breslow, 1996; Zadelaar *et al.*, 2007).
- LDL-receptor deficientný model (LDLr^{-/-}) patrí spolu s modelom ApoE^{-/-} medzi najčastejšie používané myšacie modely k štúdiu aterosklerózy (von Scheidt *et al.*, 2017; Zadelaar *et al.*, 2007). LDL receptory sú membránové receptory, ktoré rozpoznávajú apolipoproteín B (ApoB) a ApoE na povrchu lipoproteínov. Viazu ich s vysokou afinitou a procesom internalizácie dochádza k odstráneniu týchto lipoproteínov z cirkulácie. LDLr^{-/-} myšací model bol vytvorený za účelom indukovania vysokých plazmatických hladín aterogénnych lipoproteínov

(Breslow, 1996). Myši, ktorým gén pre LDL receptor chýba vykazujú na štandardnej diéte len mierne zvýšenú hladinu cholesterolu v plazme (Zadelaar *et al.*, 2007). K významnej zmene lipoproteínového profilu dochádza, keď sú LDLr^{-/-} jedinci kŕmení stravou s vysokým obsahom tuku, cholesterolu. Dochádza tak k výraznému zvýšeniu hladín cholesterolu a rýchlemu rozvoju aterosklerózy (Breslow, 1996; Daugherty, 2002; Jawien *et al.*, 2004; Zadelaar *et al.*, 2007).

- Medzi myšacie modely aterosklerózy patrí aj transgénny model, ktorý vo svojom genóme obsahuje ľudský *ApoB* gén. ApoB je apolipoproteín, ktorý riadi metabolický osud LDL a VLDL. Jeho zvýšené hladiny sú spojené s rozvojom kardiovaskulárnych ochorení. U myši na štandardnej diéte sa nevyvíjajú aterosklerotické lézie, na rozdiel od myši kŕmených stravou obsahujúcou vysoký obsah cholesterolu a kyseliny cholová (Breslow, 1996; Daugherty, 2002).

Tabuľka č. 2 - Zhrnutie vybraných myšacích modelov aterosklerózy

| Model | Aterogénny stimul | Hladina cholesterolu [mmol/l] (diéta) | Typ lézie |
|------------------------|--------------------------------|---|---|
| C57BL/6 model | VLDL, LDL | 11,10 - 16,65 (vysoká hladina cholesterolu, kyselina cholová) | tukové pruhy (cípy aortálnej chlopne) |
| ApoE deficientný model | Chylomikrónové a VLDL remnanty | 22,20 - 33,30 (nízka hladina tuku, cholesterolu) | tukové pruhy progredujúce do fibróznych plakov, v miestach rozvetvení hlavných ciev |
| | | 83,25 - 110,10 („Western type“ diéta) | typ lézii ako pri predošlej diéte, ale rozsiahlejšie lézie a rýchlejšia progresia |
| ApoE*3-Leiden model | Chylomikrónové a VLDL remnanty | 88,80 - 133,20 (vysoký cholesterol, kyselina cholová) | tukové pruhy, fibrózne plaky |
| LDLr deficientný model | IDL, LDL | 83,25 (vysoký cholesterol, kyselina cholová) | tukové pruhy progredujúce do nekrotického jadra, bez fibróznej čiapočky |
| | | 66,60 („Western type“ diéta) | tukové pruhy |
| ApoB transgénny model | LDL | 16,65 - 27,75 (vysoká hladina cholesterolu, kyselina cholová) | tukové pruhy progredujúce do nekrotického jadra, bez fibróznej čiapočky |

VLDL - lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou, LDL - lipoproteíny s nízkou hustotou, ApoE - apolipoproteín E, LDLr - LDL receptor, IDL - lipoproteíny so strednou hustotou, ApoB - apolipoproteín B, „Western type“ diéta - strava obsahujúca 0,15 % cholesterolu a 21 % tuku.

Prevzaté a upravené z: *Mouse Models of Atherosclerosis* (Breslow, 1996).

2.6.2 Myšací model s vysokými hladinami solubilného endoglínu

Ako už bolo uvedené podkapitole 2.5.2, v tejto práci bol použitý transgénny myšací model exprimujúci ľudský sEng. Bol vytvorený vložением endoglinového konštrukt (obsahujúceho aminokyseliny 26-437) do oplodnených vajíčok myši z kmeňa CBAxC57BL/6J. Daný Eng konštrukt bol riadený aktívnym promótorom (Valbuena-Diez *et al.*, 2012). Tieto myši pochádzajú z Oddelenia pre vývoj geneticky modifikovaných organizmov (University of Salamanca, Španielsko) (Jezkova *et al.*, 2016).

Jedinci, ktorým bola pre vedecké účely do organizmu inkorporovaná genetická informácia pre expresiu ľudského sEng majú vysoké hladiny sEng v krvi. Vyznačujú sa fenotypom podobným preeklampií (hypertenzia, poškodenie obličiek, proteinúria, malá veľkosť mláďat). Tento transgénny myšací model bol vytvorený pre štúdium účinkov sEng na endotel (Valbuena-Diez *et al.*, 2012).

Vďaka tomu, že ľudský a myšací solubilný endoglin vykazujú vysokú mieru homológie vo svojej štruktúre, je možné Sol-Eng⁺ model s výhodou použiť pre štúdium účinku sEng u myši. Z hľadiska funkcie je ľudský a myšací sEng ekvivalentný a teda ľudský sEng môže interagovať so signalizáciou myšacieho sEng (Gougos and Letarte, 1990; St-Jacques *et al.*, 1994).

2.7 Western blot

Western blot, nazývaný aj imunoblot, predstavuje dôležitú techniku využívanú v bunkovej i molekulárnej biológii. Je jednou z najčastejšie používaných laboratórnych techník k identifikácii proteínov (Bell, 2016; Ghosh *et al.*, 2014; Mahmood and Yang, 2012; Jensen, 2012). Táto metóda môže byť použitá napríklad k zisteniu úrovne expresie sledovaného proteínu, k skúmaniu kinázovej aktivity, bunkovej lokalizácie či k monitorovaniu posttranslačných modifikácií (Bass *et al.*, 2017). Western blot je

založený predovšetkým na identifikácii proteínov v komplexných vzorkách, akými sú tkanivá či bunkové extrakty. Ďalej môže byť použitý k identifikácii proteínov v menej komplexných vzorkách, ako napríklad purifikované proteázomové komplexy (Gomes *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2006).

Táto technika je používaná v praxi už viac ako tri dekády, počas ktorých došlo k významnému pokroku v metodológii i v interpretácii zistených údajov (Taylor and Posch, 2014).

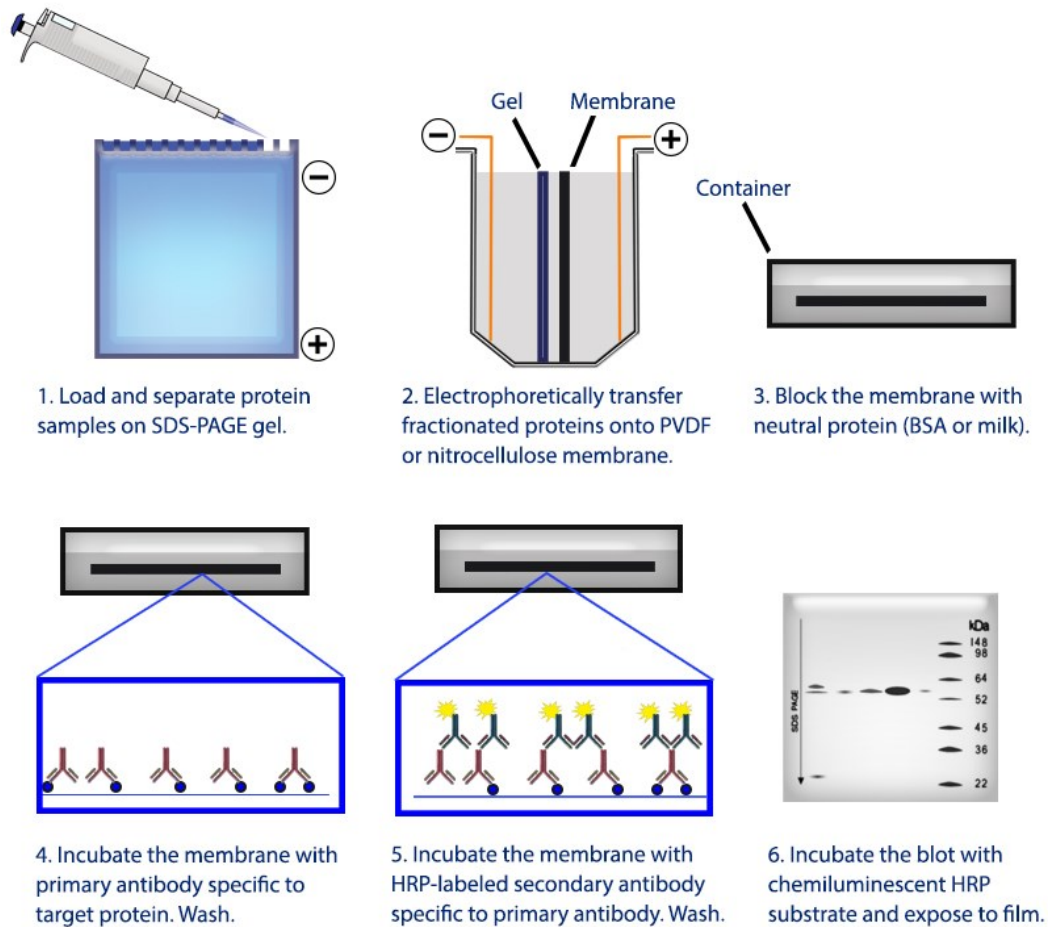
Western blot pozostáva z troch základných krokov (vid'. Obrázok č. 10):

- separácia proteínov na základe ich veľkosti gélovou elektroforézou
- prenos proteínov na pevný nosič - proteín viažucu membránu
- detekcia cieľového proteínu pomocou primárnej a sekundárnej protilátky (Mahmood and Yang, 2012; Ghosh *et al.*, 2014; Kurien and Scofield, 2006)

Nakoľko sú jednotlivé kroky metódy podrobne popísané v experimentálnej časti práce, v tejto podkapitole sa zameriame na základné princípy metodiky.

Uvedeným trom hlavným krokom predchádza samotná príprava vzoriek a stanovenie koncentrácie proteínu. Extrakcia proteínov z tkanív vyžaduje lýzu a rozrušenie bunkových membrán pomocou homogenizačných techník. Toto narušenie bunkových membrán však spôsobuje uvoľnenie proteáz a fosfatáz a napriek zníženej skladovacej teplote môže dochádzať k degradácii proteínov. Preto sa k vzorkám musia pridať proteázové a fosfatázové inhibítory (Bass *et al.*, 2017). Stanovenie koncentrácie proteínu napomáha odhadnúť objem vzoriek nevyhnutný pre nanosenie na gél (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013). Meria sa za pomoci spektrofotometra alebo kolorimetricky (Mahmood and Yang, 2012).

Obrázok č. 10 - Schéma metódy Western blot



Na obrázku sú znázornené jednotlivé kroky metódy Western blot. 1. Load and separate protein samples on SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) gel - Nanosenie proteínov na gél a ich následná elektroforetická separácia v polyakrylamidovom géli v prítomnosti dodecylsírany sodného, 2. Electrophoretically transfer fractionated proteins onto PVDF (polyvinylidene difluoride) or nitrocellulose membrane - Elektroforetický prenos frakcionovaných proteínov na polyvinyliden difluoridovú alebo nitrocelulóзовú membránu, 3. Block the membrane with neutral protein (BSA - bovine serum albumin or milk) - Blokovanie membrány neutrálnym proteínom (bovinný sérový albumín alebo mlieko), 4. Incubate the membrane with primary antibody specific to target protein. Wash. - Inkubácia membrány s primárnou protilátkou špecifickou k cieľovému proteínu. Premytie., 5. Incubate the membrane with HRP-labeled (horseradish peroxidase-labelled) secondary antibody specific to primary antibody. Wash. - Inkubácia membrány so sekundárnou protilátkou, konjugovanou s chrenovou peroxidázou, špecifickou k primárnej protilátke. Premytie., 6. Incubate the blot with chemiluminescent HRP substrate and expose to film - Inkubácia membrány s chemiluminiscenčným HRP substrátom a exponovanie filmu.

Prevzaté a upravené z: *How Western Blotting Works [online]. Dostupné z:*
<<https://www.biologend.com/en-us/western-blot>> [2019-03-19]

Separácia proteínov prebieha polyakrylamidovou gélovou elektroforézou (PAGE). Využívajú sa dva typy gélov - separačný („separating gel“) s pH 6,8 a zaostrovací („stacking gel“) s pH 8,8. Spodný separačný gél má nižšiu koncentráciu akrylamidu a väčšie póry, naopak vrchný zaostrovací má vyššiu koncentráciu akrylamidu a užšie póry (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013). Po nanosení proteínov na gél, nasleduje ich separácia podľa molekulovej hmotnosti (Mahmood and Yang, 2012). Pohybujú sa prostredníctvom migrácie cez póry vytvorené polymérnymi reťazcami gélu. Proteíny nanosené na gél majú negatívny náboj a preto sa po aplikovaní napätia budú pohybovať smerom k pozitívnej elektróde. Veľkosť napätia je veľmi dôležitá, nakoľko príliš vysoké napätie môže spôsobiť zdeformovanie bandov (Bass *et al.*, 2017; Mahmood and Yang, 2012).

Po separácii proteínov nasleduje elektroforetický prenos proteínov z gélu na membránu. Pre tento prenos sa najčastejšie používajú dva typy membrán - polyvinyliden difluoridová (PVDF) alebo nitrocelulózo, na ktoré sa prikladá gél. Dôležité je zabezpečiť úzky kontakt gélu s membránou a vložiť membránu medzi pozitívnu elektródu a gél (vid'. Obrázok č. 10) (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013). Výhodou PVDF membrány je jej väčšia inertnosť a robustnosť (Kurien and Scofield, 2006). PVDF membrány viažu proteíny pomocou hydrofóbných interakcií (MacPhee, 2010) a sú schopné viazať väčšie množstvo proteínov ako iné substráty (Matsudaira, 1987). Jej nevýhodou však býva zvýšenie nechceného pozadia, preto je veľmi dôležité starostlivé premývanie tejto membrány (Mahmood and Yang, 2012). Výhodou nitrocelulózovej membrány je jej vysoká afinita k proteínom, naopak nevýhodou je jej krehkosť (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013).

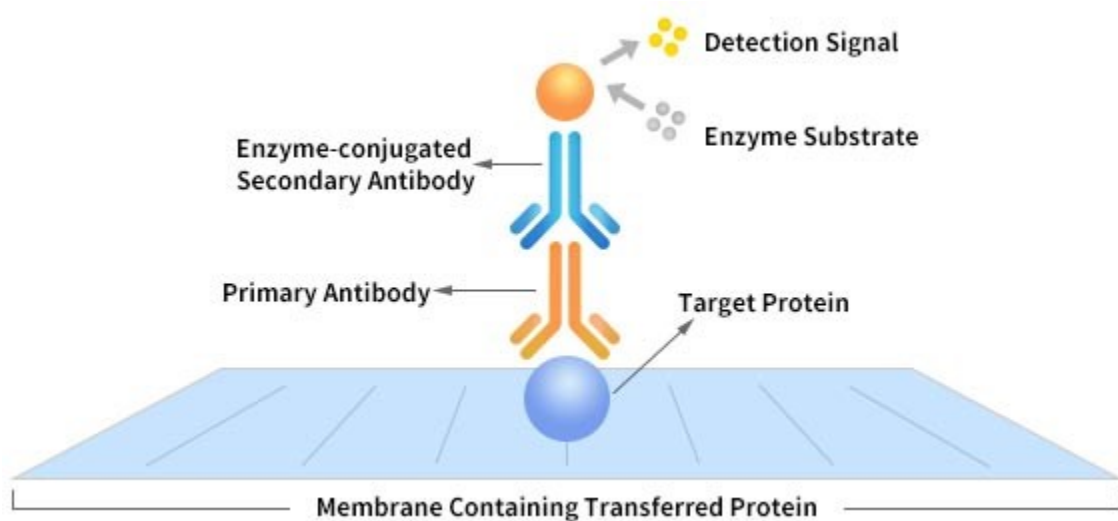
Pri elektroelúcii je možné použiť buď tzv. polosuchú „semi-dry“ metódu alebo „wet transport“ (mokrú cestu). Mokrú cestu je obvykle spoľahlivejšia, pretože pri jej použití je menej pravdepodobné, že dôjde k vyschnutiu gélu. Zároveň je vhodná pre väčšie proteíny (Mahmood and Yang, 2012). Pri mokrej ceste dochádza ku kompletnému ponoreniu gél-membránového „sendviča“ do pufra, kdežto pri „semi-dry“ spôsobe transportu sa gél-membránový „sendvič“ uloží medzi absorbujúce papiere nasiaknuté transferovým pufrom. Mokrú cestu prebieha vo vertikálnom umiestnení,

„semi-dry transport“ v horizontálnej polohe (Kurien and Scofield, 2006). S použitím rovnakého princípu ako u PAGE sa negatívne nabité proteíny z gélu prenášajú na membránu (Bass *et al.*, 2017).

Veľmi dôležitú časť Western blot metódy predstavuje blokovanie membrány. Zabraňuje nešpecifickej väzbe protilátok na membránu (Jensen, 2012). Dôležitosť tohto kroku spočíva v zabránení falošne pozitívnym výsledkom (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013).

Tretím krokom metódy je detekcia cieľového proteínu, prostredníctvom naviazania primárnych a sekundárnych protilátok na stanovovaný proteín. Po inkubácii membrány s primárnou protilátkou nasleduje premývanie membrány. Počas tohto kroku sa odstráni nenašovaná protilátka (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013). Sekundárna protilátka sa viaže na primárnu protilátku a je značená enzýmom (viď. Obrázok č. 11) (Mahmood and Yang, 2012). Medzi najčastejšie používané enzýmy patrí alkalická fosfatáza a chrenová peroxidáza (HRP) (Kricka, 1991). Enzým následne reaguje so špecifickým substrátom. Používa sa buď kolorimetrický alebo chemiluminiscenčný spôsob detekcie (Mahmood and Yang, 2012). V súčasnosti existuje aj jednokrokový spôsob detekcie, kedy už samotná primárna protilátka obsahuje detekčnú molekulu (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013).

Obrázok č. 11 - Detekcia proteínu pomocou primárnej a sekundárnej protilátky



Na obrázku vidíme membránu obsahujúcu prenesený proteín (*Membrane Containing Transferred Protein*). Na cieľovom proteíne (*Target Protein*) je naviazaná primárna protilátka (*Primary Antibody*), na ktorú sa viaže sekundárna protilátka konjugovaná s enzýmom (*Enzyme-conjugated Secondary Antibody*). Tento enzým pri dostupnosti substrátu (*Enzyme Substrate*) zaistí detekčný signál (*Detection Signal*).

Prevzaté z: *How to Choose an Antibody for Scientific Research?* [online]. Dostupné z: <<https://www.cusabio.com/c-20675.html>> [2019-03-18]

Ako pozitívna kontrola sa používa známy cieľový proteín, a to napríklad glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) alebo β -aktín (Quitero-Ronderos *et al.*, 2013).

Vo väčšine laboratórií zaoberajúcich sa Western blot metódou je pre stanovenie a porovnanie expresie špecifických proteínov v rôznych bunkách a tkanivách využívané semikvantitatívne hodnotenie dát (Ghosh *et al.*, 2014).

3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo identifikovať a následne vyhodnotiť expresiu markerov endotelovej dysfunkcie (ICAM-1, VCAM-1, P-selektín) v aorte samcov transgénnych myší s vysokými hladinami ľudského solubilného endoglínu. Expresia uvedených adhézných molekúl bola zároveň sledovaná u kontrolnej skupiny transgénnych myší s nízkou hladinou ľudského solubilného endoglínu. Použité myši boli staré 12 mesiacov a boli kŕmené štandardnou laboratórnou diétou pre hlodavce.

Pre vyhodnotenie a porovnanie expresie vymenovaných markerov v myšacích aortách bola použitá metóda Western blot. Pre stanovenie plazmatickej hladiny ľudského solubilného endoglínu a solubilnej formy molekuly VCAM-1 bola zvolená ELISA analýza. Biochemická analýza bola použitá pre stanovenie hladín celkového cholesterolu a triacylglycerolov.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité zvieratá

Ako už bolo uvedené, pre experiment boli použité 12 mesiacov starí samci myšacieho kmeňa CBAxC57BL/6J. Tieto myši boli geneticky modifikované. Metódami genetického inžinierstva bol do ich organizmu zavedený gén pre expresiu ľudského solubilného endoglínu. Tento transgénny kmeň bol vytvorený Oddelením pre vývoj geneticky modifikovaných organizmov (University of Salamanca, Španielsko).

V tejto diplomovej práci sme použili dve skupiny daných transgénnych myší - experimentálna a kontrolná skupina. Tieto dve skupiny mali identický genotyp, líšili sa len hladinou ľudského sEng. Experimentálna skupina vykazovala vysoké hladiny sEng (Sol-Eng⁺), na rozdiel od kontrolnej skupiny, u ktorej boli hladiny sEng nízke. Myši boli kŕmené štandardnou laboratórnou diétou pre hlodavce a mali voľný prístup k vode. Chované boli pri konštantnej teplote a vlhkosti a zároveň bol u nich dodržiavaný 12 hodinový denný cyklus. Medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou myší neboli zaznamenané významné váhové rozdiely (viď. kapitola 5). Bolo použitých desať jedincov - päť z nich ako súčasť experimentálnej skupiny (M22, M25, M31, M35, M37), päť ako súčasť kontrolnej skupiny (M50, M52, M54, M58, M59).

S použitými zvieratami sa manipulovalo v súlade so Smernicou 2010/63/EU o ochrane zvierat používaných pre vedecké účely. Všetky zákroky boli vykonávané v anestézii a dbalo sa na to, aby utrpenie zvierat bolo minimalizované.

4.2 ELISA analýza

Pre stanovenie hladiny ľudského solubilného endoglínu a pre stanovenie hladiny sVCAM-1 u použitých myší bola použitá enzýmová imunoanalytická metóda (ELISA analýza). Myšiam bola odobratá krv a následne sa pracovalo so vzorkami plazmy. Koncentrácia daných proteínov bola stanovená spektrofotometricky a výsledky boli vyjadrené v nanogramoch na mililiter [ng/ml].

K stanoveniu hladín solubilného endoglínu bol použitý Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (Bio-Techne R&D Systems Inc., MN, USA). Detekčný limit

tohto kitu je 0,007 ng/ml. Postupovalo sa podľa inštrukcií výrobcu. Na základe výsledkov ELISA analýzy boli transgénné myši rozdelené do dvoch skupín - experimentálna (vysoké hladiny sEng) a kontrolná skupina (nízke hladiny sEng).

K stanoveniu plazmatických hladín molekuly sVCAM-1 bol použitý Mouse sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kit (Bio-Techne R&D Systems Inc., MN, USA). Detekčný limit tohto kitu je 0,03 ng/ml. Podobne ako v predchádzajúcom prípade sa postupovalo podľa inštrukcií výrobcu. Následne boli porovnané hladiny tohto markeru medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou použitých transgénnych myší.

4.3 Biochemická analýza

U experimentálnej i kontrolnej skupiny použitých transgénnych myší bola pre stanovenie hladín celkového cholesterolu a triacylglycerolov (TAG) použitá biochemická analýza. Koncentrácia cholesterolu a TAG v plazme jedincov bola stanovená enzymaticky s využitím diagnostickej súpravy (Lachema a.s., CZE) a bola vykonaná spektrofotometrická analýza (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, SWE). Hodnoty boli namerané pri vlnovej dĺžke 510 nm a koncentrácie boli následne vyjadrené ako milimolárne [mmol/l].

4.4 Western blot analýza

4.4.1 Homogenizácia a stanovenie koncentrácie proteínu

Ešte pred samotnou analýzou bolo nutné pripraviť si vzorky. Konkrétne išlo o vzorky myšacích aort, ktoré sme po zvážení vložili do mikroskúmaviek typu Eppendorf o objeme 2 ml. Následne sme k vzorkám pridali RIPA pufor (Radio Immuno Precipitation Assay Buffer; Sigma-Aldrich Inc., MO, USA). Tento lyzačný tlmivý roztok spôsobil potrebnú lýzu buniek. Jeho množstvo je dané nasledujúcim spôsobom: na 1 gram tkaniva pripadá 20 ml RIPA puforu. Aby nedošlo k rozkladu proteínov prostredníctvom proteáz a fosfatáz, boli do skúmaviek pridané inhibítory týchto enzýmov nasledovne: na 1 ml RIPA puforu pripadá 10 µl inhibítorov proteáz (SERVA Electrophoresis GmbH, DEU) a 10 µl inhibítorov fosfatáz (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA).

V ďalšom kroku boli vzorky tkaniva nastrihané nožnicami na čo najmenšie časti a následne zhomogenizované pomocou rotor-stator homogenizátoru. Výsledkom bola homogénna tekutina. Nasledovala centrifugácia, ktorá prebiehala pri otáčkach 10 000 RPM (revolutions per minute), teplote 4°C po dobu 10 minút. Odsal sa supernatant, s ktorým sme ďalej pracovali. Vzorky boli rozpipetované do vopred vychladených mikroskúmaviiek typu Eppendorf o objeme 1,5 ml.

Po celú dobu spracovania tkaniva sa pracovalo pri nízkych teplotách (vzorky boli uchovávané na ľade), aby sa zabránilo degradácií proteínov.

Koncentrácia proteínov vo vzorkách bola stanovená spektrofotometricky. Na základe hodnôt absorbanie bola pomocou počítača vypočítaná koncentrácia proteínu a riedenie potrebné pre prípravu vzoriek pred gélovou elektroforézou. Stanovenie koncentrácie zároveň napomáha odhadnúť objem vzoriek, ktorý sa nanáša do jednotlivých jamiek gélu (vid'. Tabuľka č. 3). Potrebné riedenie vzoriek aorty na mikrotitračnú doštičku 10x (10 µl vzorky + 90 µl Milli-Q H₂O) bolo stanovené pomocou kalibračnej krivky štandardu - roztoku o známej koncentrácii, v našom prípade išlo o roztok albumínu. Predtým ako sme pristúpili k meraniu absorbanie sa za účelom zahájenia farebnej enzymatickej reakcie napipetovalo do jednotlivých jamiek mikrotitračnej doštičky 200 µl zmesi reakčných činidiel (reagent A+B, A:B = 50:1). Tá sa následne zabalila do alobalu a nechala sa po dobu 30 minút inkubovať v termostate pri 37°C.

Tabuľka č. 3 - Tabuľka riedenia vzoriek

| | Koncentrácia proteínu | Aplikovaný proteín | Aplikovaný objem | Pripravený objem | Riedenie vzoriek | |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------|
| | | | | | vzorka | voda |
| | [mg/ml] | [µg] | [µl] | [µl] | [µl] | [µl] |
| Experimentálna skupina | | | | | | |
| M22 | 4,44 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 7,73 | 8,27 |
| M25 | 2,84 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 12,05 | 3,95 |
| M31 | 2,89 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 11,87 | 4,13 |
| M35 | 3,20 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 10,71 | 5,29 |
| M37 | 2,79 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 12,29 | 3,71 |
| Kontrolná skupina | | | | | | |
| M50 | 3,14 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 10,90 | 5,10 |
| M52 | 2,53 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 13,53 | 2,47 |
| M54 | 2,15 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 15,92 | 0,08 |
| M58 | 2,41 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 14,21 | 1,79 |
| M59 | 3,27 | 15,00 | 14,00 | 16,00 | 10,50 | 5,50 |

4.4.2 Gélová elektroforéza

Pripravili sme elektroforetickú aparatúru (Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) (viď. Obrázok č. 12). Pre každý gél sme si nachystali dve suché a čisté sklá - jedno dlhšie a jedno kratšie, ktoré sme umiestnili do zeleného stojanu tak, aby kratšie sklo smerovalo dopredu.

Obrázok č. 12 - Elektroforetická aparatúra



Na obrázku je zobrazený elektroforetický systém - sada Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA).

Prevzaté z: Mini-PROTEAN® Tetra Cell [online]. Dostupné z:

<<http://www.bio-rad.com/de-at/product/mini-protean-tetra-cell?ID=d5d6580e-b8f6-4f1c-bbc4-f63d360ea788>> [2019-03-24]

Zásadným krokom gélovej elektroforézy je príprava separačného a zaostrovacieho gélu. Pre ich prípravu sme potrebovali Milli-Q vodu (redistilovaná, ultračistá voda), pufoer pre separačný a zaostrovací gél (Separating Gel Buffer, Stacking Gel Buffer; Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), akrylamid (Acrylamide-Bis Solution), 10 % dodecylsírán sodný (SDS), 10 % peroxidisírán amónny (APS) a N, N, N', N' - tetrametyletylendiamín (TEMED) (akrylamid, SDS, APS, TEMED - SERVA Electrophoresis GmbH, DEU). Presné objemy jednotlivých komponent, prepočítané na prípravu dvoch gélov, sú uvedené v Tabuľke č. 4.

Ako prvý sme pripravili separačný gél. Zmiešali sme jednotlivé komponenty, pričom ako posledné zložky sme pridali APS a TEMED. Po pridaní zložky TEMED začala polymerizácia gélu. Roztok sme premiešali, avšak len opatrne, aby nedošlo k narušeniu prebiehajúcej polymerizácie. Koncentráciu separačného gélu (10 %) sme stanovili na základe molekulových hmotností sledovaných proteínov. Pripravený roztok sme následne pomocou pipety naniesli medzi pripravené sklá, tesne pod okraj kratšieho z nich. Gél sme prevrstvili izobutanolom (sekundárny butanol saturovaný Milli-Q vodou) za účelom zamedzenia prístupu vzduchu ku gélu pri jeho polymerizácii, k vyrovnaniu hladiny po celej dĺžke gélu a k odstráneniu vzduchových bublín z jeho povrchu. Polymerizácia trvala 30 - 60 minút, pričom zvyšok gélu v kadičke nám slúžil ako kontrola, či už došlo k stuhnutiu gélu. Následne sme vyliali izobutanol, sústavu opláchli destilovanou vodou a osušili gázou.

Následovala príprava 5 % zaostrovacieho gélu. Postupovali sme rovnako ako pri príprave separačného gélu. Pomocou pipety sme ho naniesli medzi sklá a nasadili sme teflónový hrebienok, ktorého úlohou bolo vytvoriť v géli jamky pre nanesenie vzoriek. Polymerizácia prebiehala opäť 30 - 60 minút, pričom približne každé tri minúty sme dopĺňovali zaostrovací gél po okrajoch hrebienka, aby sme zamedzili prístupu vzduchu.

Tabuľka č. 4 - Zloženie separačného a zaostrovacieho gélu

| Rozpis na 2 gély: | Separáčny gél (10 %) | Zaostrovací gél (5 %) |
|---------------------------|----------------------|-----------------------|
| | [ml] | [ml] |
| Milli-Q voda | 9,800 | 6,150 |
| Pufor pre separáčny gél | 5,000 | - |
| Pufor pre zaostrovací gél | - | 2,500 |
| Akrylamid | 5,000 | 1,250 |
| 10 % SDS | 0,200 | 0,100 |
| 10 % APS | 0,060 | 0,030 |
| TEMED | 0,030 | 0,015 |

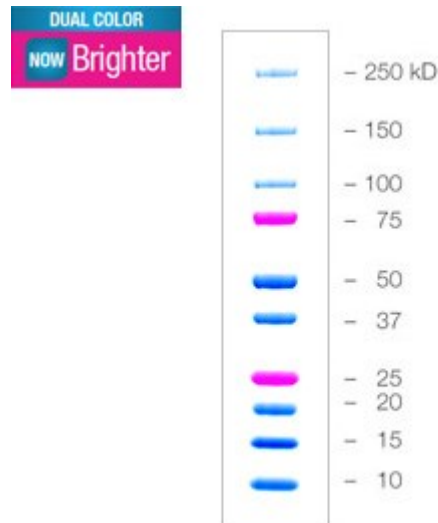
Milli-Q voda - redestilovaná, ultračistá voda; SDS - dodecylsírán sodný, APS - peroxidisírán amónny; TEMED - N, N, N', N' - tetrametyletylendiamín.

Počas polymerizácie zaostrovacieho gélu sme si pripravili vzorky. Po ich nariadení podľa Tabuľky č. 3, sme ku každej z nich pridali nanášací pufor (Sample Buffer) v pomere 1:1, tzn. do každej mikroskúmavky obsahujúcej 16 μ l vzorky sme pridali 16 μ l nanášacieho pufu. Použitý Laemmliho nanášací pufor (Laemmli Sample Buffer) obsahuje štyri základné zložky. Prvou z nich je 2-merkaptóetanol, ktorý redukuje disulfidové väzby v proteínoch, ďalej SDS, ktorý proteíny denaturuje a zaisťuje ich záporný náboj, brómfenolová modrá, ktorá zafarbuje vzorky a umožňuje sledovať postup elektroforézy a glycerol, ktorý zvyšuje hustotu vzoriek. Takto pripravené mikroskúmavky so vzorkami sme scentrifugovali a vložili na päť minút do termostatu pri teplote 95°C. Vychladnuté vzorky sa opäť scentrifugovali.

Po ukončení polymerizácie zaostrovacieho gélu sme opatrne vytiahli teflónový hrebeň a vzniknuté jamky sme prepláchli vopred pripraveným elektroforetickým pufrom. Bol to roztok 100 ml komerčného elektroforetického pufu (Tris/Glycine/SDS Buffer 10x Concentrated; Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) a 900 ml Milli-Q vody. Sklá sme vložili do držiaku elektroforetickej vane a to tak, aby kratšie sklo smerovalo do vnútra. Priestor vane medzi dvojicami skiel sme zaplnili elektroforetickým pufrom. Nasledovalo nanesenie vzoriek na gél. Do prvej jamky sme napipetovali hmotnostný marker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) (vid'. Obrázok č. 13) o objeme 5 μ l a do ďalších jamiek sme napipetovali vzorky o objeme 14 μ l. Pred nanesením každej vzorky sme mikroskúmavku zvortexovali. Potom sme do elektroforetickej vane doplnili elektroforetický pufor po rysku pre dva

gély. Vaňu sme uzatvorili, obložili chladiacimi jednotkami a pripojili k zdroju. Elektroforéza prebiehala za nasledujúcich podmienok: konštantné napätie - 200 V, maximálny prúd - 120 mA, čas - cca 60 minút.

Obrázok č. 13 - Hmotnostný marker



Na obrázku je zobrazený hmotnostný marker (štandard o známych molekulových hmotnostiach) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). Vidíme rozdelenie jednotlivých bandov podľa molekulových hmotností, ku ktorému dochádza v priebehu elektroforézy.

Prevzaté z: *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* [online]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/de-at/sku/1610374-precision-plus-protein-dual-color-standards-500-ul?ID=1610374> [2019-03-25]

Priebeh elektroforézy sme sledovali vďaka hmotnostnému markeru a brómfenolovej modrej nachádzajúcej sa v nanášacom pufri. K jej ukončení došlo, keď brómfenolové čelo dorazilo na koniec gélu. Sklá sme vybrali z aparatury, opatrne sme ich od seba oddelili a gél sme preniesli do pripravenej misky s transferovým pufrom. Bol to roztok 100 ml komerčného transferového pufru (Tris/Glycine Buffer 10x Concentrated, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), 200 ml metanolu a 700 ml Milli-Q vody.

4.4.3 Prenos proteínov na membránu

Po elektroforetickej separácii proteínov nasledoval elektroforetický prenos proteínov z gélu na membránu (blotting). Pre tento prenos sme zvolili tzv. mokrú cestu (wet transport) za použitia PVDF membrány (viď. podkapitola 2.7). Použili sme aparáturu Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) (viď. Obrázok č. 14).

Obrázok č. 14 - Aparatúra pre prenos proteínov na membránu



Na obrázku je znázornený Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA).

Prevzaté z: Mini Trans-Blot[®] Cell [online]. Dostupné z: <<http://www.bio-rad.com/de-at/product/mini-trans-blot-cell?ID=589ca8f7-5751-487a-a453-571ee8cc8b7e>> [2019-03-25]

V prvom rade bolo nutné pripraviť si membránu (Immobilon[®]-P PVDF Membrane; Sigma-Aldrich Inc., MO, USA). Nastrihali sme ju pomocou šablóny, ktorá vyjadrovala veľkosť gélu a následne sme ju zaktivovali ponorením do metanolu na 15 sekúnd a následne do Milli-Q vody na minimálne dve minúty. Potom sme pristúpili k vytvoreniu tzv. „sendviča“. Kazetu sme položili čiernou stranou nadol (viď. Obrázok č. 14), na ňu sme položili dve penové podložky vopred zvlhčené v transferovom puffi a na ne sa položil, rovnako zvlhčený, silný filtračný papier. Na filtračný papier sme opatrne preniesli gél, na ktorý sme čo najpresnejšie položili zaktivovanú membránu. Nasledovala vrstva filtračného papiera, opäť dve penové podložky a kazetu sme uzatvorili. Takto pripravený „sendvič“ sme vložili do elektroforetickej vane, ktorú sme

naplnili transferovým pufrom po rysku. Vaňu sme uzatvorili, obložili chladiacimi jednotkami a pripojili k zdroju. Prenos proteínov z gélu na membránu prebiehal za nasledujúcich podmienok: konštantné napätie - 140 V, maximálny prúd - 300 mA, čas - 90 minút. Po ukončení prenosu sme otvorili kazetu a membránu vložili do misky s Milli-Q vodou. Následne sme pomocou hmotnostného markeru (viď. Obrázok č. 13), ktorý bol napipetovaný do prvej jamky gélu, nastrihali membrány na prúžky podľa molekulovej hmotnosti sledovaných proteínov: GAPDH (30-40 kDa), ICAM-1 (80-114 kDa), VCAM-1 (100-110 kDa), P-selektín (cca 90 kDa). Štrukturálny proteín GAPDH predstavoval kontrolu naniesenia proteínov. Nastrihaním membrán sme zaistili nižšiu spotrebu primárnych a sekundárnych protilátok v ďalších krokoch.

4.4.4 Detekcia proteínov

Prvým krokom v procese detekcie proteínov je zablokovanie nešpecifických väzobných miest, čím sa zaistí špecifické naviazanie protilátok na svoje antigény (viď. podkapitola 2.7). K tomuto účelu sme použili blokovací pufo (Blocking Buffer). Išlo o 5 % roztok sušeného netučného mlieka (Blotting-Grade Blocker; Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) v TBS-T roztoku. TBS-T roztok sme pripravili nasledovne: 100 ml 10 % TBS (Tris-Buffered Saline) pufru + 900 ml Milli-Q vody + 1 ml TWEEN[®] 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate; SERVA Electrophoresis GmbH, DEU). Membrány sa následne blokovali na trepačke, v miske s blokovacím pufrom, po dobu jednej hodiny.

Počas blokácie sme si pripravili vaničky z parafilmu podľa veľkosti nastrihaných membrán. Ďalej sme v skúmavkách nariadili primárne protilátky 5 % roztokom sušeného netučného mlieka s obsahom 0,1 % TBS-T roztoku. Skúmavky sme dôkladne pretrepali. Výber primárnych protilátok závisel na konkrétnom antigéne (viď. Tabuľka č. 5). Po skončení blokácie sme membrány opatrne preniesli do vaničiek s primárnymi protilátkami a nechali za stáleho kývania inkubovať počas noci pri teplote 4°C.

Tabuľka č. 5 - Nastavenie primárnych protilátok

| Proteín | Typ PA | Firma | Katalógové číslo | Riedenie |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------|----------|
| GAPDH | Mouse Monoclonal Anti-GAPDH | Sigma-Aldrich Inc., MO, USA | G8795 | 1:10 000 |
| ICAM-1 | Goat Polyclonal IgG | Bio-Techne R&D Systems, MN, USA | AF796 | 1:500 |
| VCAM-1 | Goat Polyclonal IgG | Bio-Techne R&D Systems, MN, USA | AF643 | 1:500 |
| P-selektín | Rabbit Polyclonal IgG | Abcam Plc., UK | ab59738 | 1:200 |

PA (primary antibody) - primárna protilátka, IgG - imunoglobulín G, GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, ICAM-1 - intercelulárna adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1.

Na druhý deň sme membrány premiestnili do plastových misiek s TBS-T roztokom. Membrány sa hodinu premývali na trepačke, pričom každých desať minút sme vymieňali TBS-T roztok. Tento krok je dôležitý pre zaistenie čistoty signálu. Počas premývania sme si opäť pripravili vaničky z parafilmu a následne sme 5 % roztokom sušeného netučného mlieka s obsahom 0,1 % TBS-T roztoku nariadili sekundárne protilátky (viď. Tabuľka č. 6). Tie boli konjugované s HRP, vďaka čomu bola neskôr umožnená vizualizácia proteínov. Pripravené skúmavky sme dôkladne pretrepali. Po skončení blokácie sme membrány preniesli do vaničiek so sekundárnymi protilátkami. Inkubácia prebiehala za laboratórnej teploty, za stáleho kývania a trvala jednu hodinu. Po inkubácii nasledovalo premývanie, ktoré bolo vykonané rovnakým spôsobom ako po inkubácii membrán s primárnymi protilátkami.

Tabuľka č. 6 - Nastavenie sekundárnych protilátok

| Proteín | Typ SA | Firma | Katalógové číslo | Riedenie |
|-------------------|---|-----------------------------|------------------|----------|
| GAPDH | HRP-conj. Goat Anti-Mouse Polyclonal IgG | Sigma-Aldrich Inc., MO, USA | A9917 | 1:20 000 |
| ICAM-1 | HRP-conj. Rabbit Anti-Goat Polyclonal IgG | Sigma-Aldrich Inc., MO, USA | A5420 | 1:5 000 |
| VCAM-1 | HRP-conj. Rabbit Anti-Goat Polyclonal IgG | Sigma-Aldrich Inc., MO, USA | A5420 | 1:5 000 |
| P-selektín | HRP-conj. Goat Anti-Rabbit Polyclonal IgG | Abcam Plc., UK | ab6112 | 1:2 000 |

SA (secondary antibody) - sekundárna protilátka, IgG - imunoglobulín G, GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, ICAM-1 - intercelulárna adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, HRP-conj. (horseradish peroxidase - conjugated) - sekundárna protilátka konjugovaná s chrenovou peroxidázou.

Po inkubácií membrán s primárnymi i sekundárnymi protilátkami nasledovala samotná detekcia. Zložky detekčného kitu (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA) sme zmiešali v pomere 1:1 a to v dostatočnom množstve pre pokrytie celej membrány. Takto pripravený detekčný roztok sme pipetou naniesli na membránu umiestnenú na tvrdej podložke. Membrána bola umiestnená tak, aby proteíny boli orientované smerom nahor. Použitý chemiluminiscenčný substrát (detekčné činidlo) a doba jeho pôsobenia sú pre jednotlivé proteíny uvedené v Tabuľke č. 7. Prebytočné detekčné činidlo sme potom opatrne odsali pomocou gázy a takto pripravenú membránu sme vložili do priehľadnej fólie a následne do uzatvárateľnej kazety. Ďalšie kroky prebiehali v temnej komore. Na základe reakcie HRP s detekčným činidlom sme priložením fotografického filmu (AGFA CP-BU; Foma Bohemia s.r.o., CZE) na membránu detekovali chemiluminiscenčnú reakciu. Dobu expozície sme upravili podľa intenzity bandov, u jednotlivých proteínov sa líšila. Vyvolávanie filmov prebiehalo pomocou prístroja OPTIMAX 2010 X-Ray Film Processor (PROTEC GmbH & Co. KG, DEU).

Tabuľka č. 7 - Výber a doba pôsobenia detekčného činidla

| Proteín | Detekčné činidlo | Doba pôsobenia |
|-------------------|--|----------------|
| GAPDH | SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | 30 sekúnd |
| ICAM-1 | SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | 5 minút |
| VCAM-1 | SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | 7 minút |
| | SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate | 10 sekúnd |
| P-selektín | SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | 5 minút |

GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, ICAM-1 - intercelulárna adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1.

Vyvolané filmy (pruhy bandov) boli semikvantitatívne vyhodnotené denzitometrickou metódou (Imaging Software NIS-Elements Advanced Research, verzia 4.00.11; Laboratory Imaging s.r.o., CZE). Následne sme ich štatisticky spracovali v programe GraphPad Prism 8 (verzia 8.1.0; GraphPad Software Inc., CA, USA).

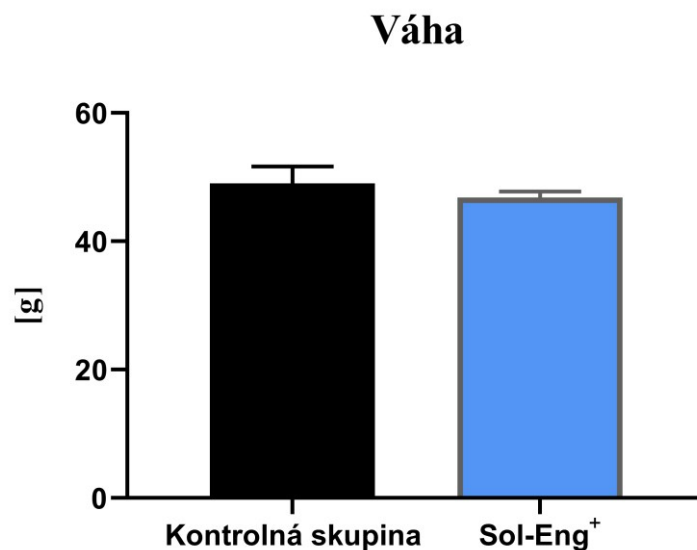
5. VÝSLEDKY

Výsledky sú uvedené ako priemer \pm štandardná chyba priemeru. Hladina štatistickej významnosti (p) bola stanovená neparametrickým t-testom (Mann-Whitney). Rozdiely medzi skupinami sú štatisticky významné ak $p \leq 0,05$. V grafoch sú štatisticky významné hodnoty označené symbolom „*“, pričom platí: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.1 Váha

Medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou transgénnych myší nebol zaznamenaný signifikantný váhový rozdiel ($49,00 \pm 2,67$ g vs. $46,85 \pm 0,93$ g; $p = 0,4848$). Porovnanie hmotností myší kontrolnej a Sol-Eng⁺ skupiny je znázornené v Grafe č. 1. Hodnoty sú uvedené v gramoch [g].

Graf č. 1 - Hmotnosť myší [g]



V ľavom stĺpci je znázornená hmotnosť myší kontrolnej skupiny, v pravom stĺpci hmotnosť jedincov experimentálnej (Sol-Eng⁺) skupiny. Vyjadrená je v gramoch [g].

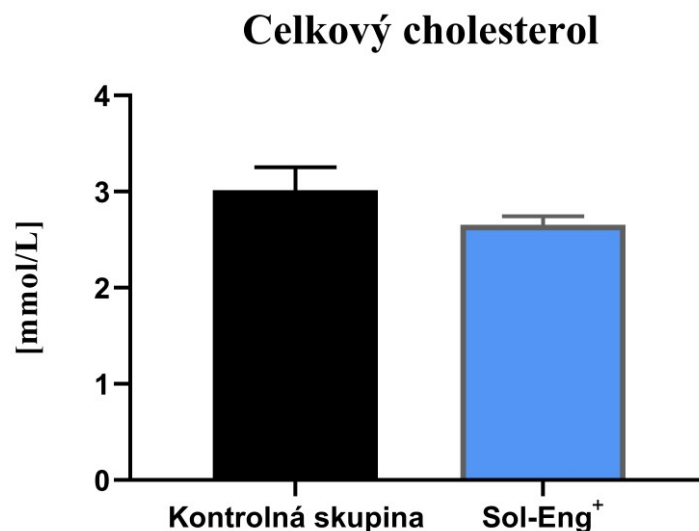
5.2 Biochemická analýza

U experimentálnej i kontrolnej skupiny použitých transgénnych myší boli pomocou biochemickej analýzy stanovené plazmatické hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolov. Následne boli tieto hodnoty porovnané medzi sledovanými skupinami myší. Obidve skupiny jedincov boli kŕmené štandardnou laboratórnou diétou pre hlodavce. Výsledky sú vyjadrené graficky. Koncentrácie cholesterolu a TAG sú vyjadrené ako milimolárne [mmol/l].

5.2.1 Biochemická analýza hladín celkového cholesterolu

Biochemická analýza plazmatických hladín celkového cholesterolu nepreukázala signifikantný rozdiel medzi kontrolnou a experimentálnou (Sol-Eng⁺) skupinou použitých myší ($3,02 \pm 0,24$ mmol/l vs. $2,66 \pm 0,09$ mmol/l; $p = 0,6263$). Výsledky analýzy sú vyjadrené v Grafe č. 2.

Graf č. 2 - Hladiny celkového cholesterolu [mmol/l]

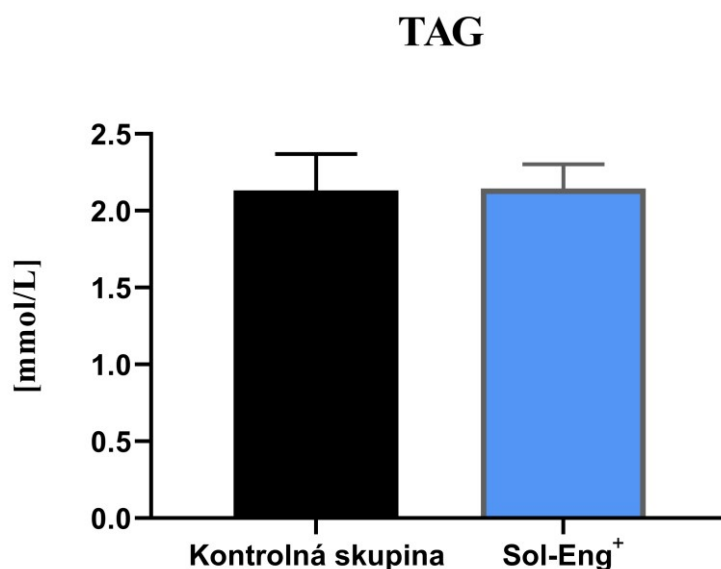


Ľavý stĺpec grafu znázorňuje hladinu celkového cholesterolu u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec vyjadruje jeho hladinu u skupiny experimentálnej (Sol-Eng⁺). Koncentrácia je vyjadrená v [mmol/l].

5.2.2 Biochemická analýza hladín triacylglycerolov

Prostredníctvom biochemickej analýzy plazmatických hladín triacylglycerolov nebol preukázaný signifikantný rozdiel medzi kontrolnou a experimentálnou (Sol-Eng⁺) skupinou použitých transgénnych myší ($2,13 \pm 0,24$ mmol/l vs. $2,15 \pm 0,16$ mmol/l; $p = 0,6454$). Výsledky analýzy sú vyjadrené v Grafe č. 3.

Graf č. 3 - Hladiny TAG [mmol/l]



Ľavý stĺpec grafu znázorňuje hladinu triacylglycerolov (TAG) u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec znázorňuje hladinu TAG u skupiny experimentálnej (Sol-Eng⁺). Koncentrácia je vyjadrená v [mmol/l].

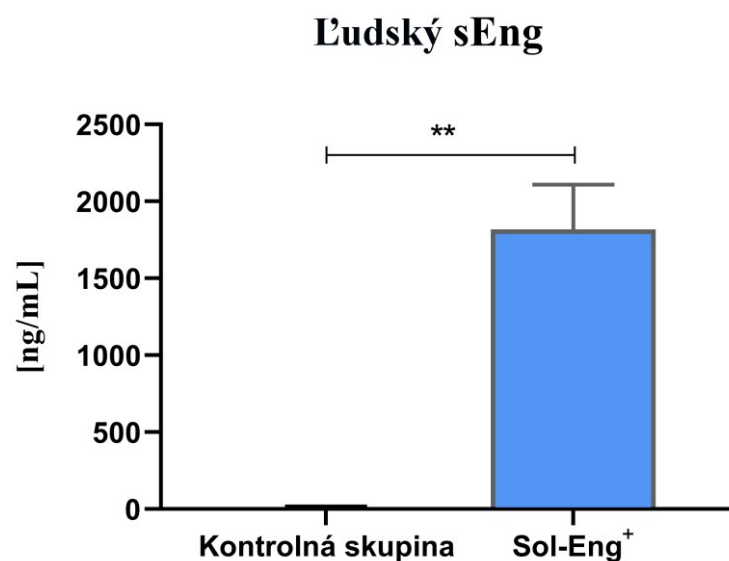
5.3 ELISA analýza

Prostredníctvom ELISA analýzy boli vyhodnotené koncentrácie molekúl sEng a sVCAM-1 v plazme transgénnych myší. Následne boli hladiny týchto markerov porovnané medzi experimentálnou (Sol-Eng⁺) a kontrolnou skupinou. Výsledky sú vyjadrené graficky v nanogramoch na mililiter [ng/ml].

5.3.1 ELISA analýza hladín sEng

ELISA analýza hladín sEng preukázala signifikantný rozdiel v hladinách tohto markeru medzi porovnávanými skupinami transgénnych myší (** $p \leq 0,01$). Hodnoty ľudského sEng boli u Sol-Eng⁺ skupiny signifikantne vyššie ako u kontrolnej skupiny ($1818,00 \pm 291,60$ ng/ml vs. $5,74 \pm 11,76$ ng/ml; $p = 0,0079$). Výsledok je zobrazený v Grafe č. 4.

Graf č. 4 - Plazmatické hladiny ľudského solubilného endoglínu [ng/ml]

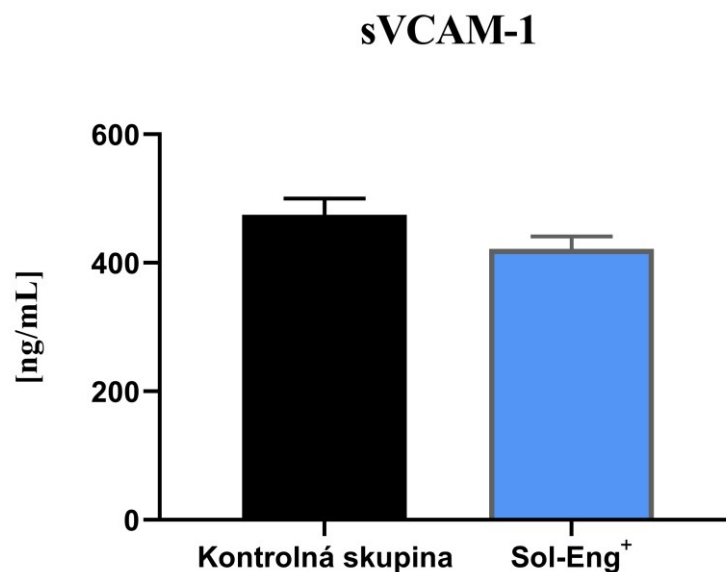


Ľavá strana grafu znázorňuje plazmatickú hladinu ľudského sEng u kontrolnej skupiny. Pravý stĺpec vyjadruje hladinu tohto markeru u experimentálnej (Sol-Eng⁺) skupiny transgénnych myší. Hodnoty sEng sú u Sol-Eng⁺ skupiny signifikantne vyššie ako u kontrolnej skupiny (** $p \leq 0,01$). Koncentrácia je vyjadrená v [ng/ml].

5.3.2 ELISA analýza hladín sVCAM-1

ELISA analýza hladín molekuly sVCAM-1 nepreukázala signifikantný rozdiel v plazmatických hladinách tohto markeru medzi experimentálnou (Sol-Eng⁺) a kontrolnou skupinou transgénnych myší ($421,90 \pm 19,28$ ng/ml vs. $474,80 \pm 25,26$ ng/ml; $p = 0,1282$). Výsledok analýzy je zobrazený v Grafe č. 5.

Graf č. 5 - Plazmatické hladiny molekuly sVCAM-1 [ng/ml]



Ľavý stĺpec grafu vyjadruje plazmatickú hladinu sVCAM-1 u kontrolnej skupiny. Pravý stĺpec vyjadruje hladinu tohto markeru u experimentálnej (Sol-Eng⁺) skupiny myší. Hodnoty sú vyjadrené v [ng/ml].

5.4 Western blot analýza

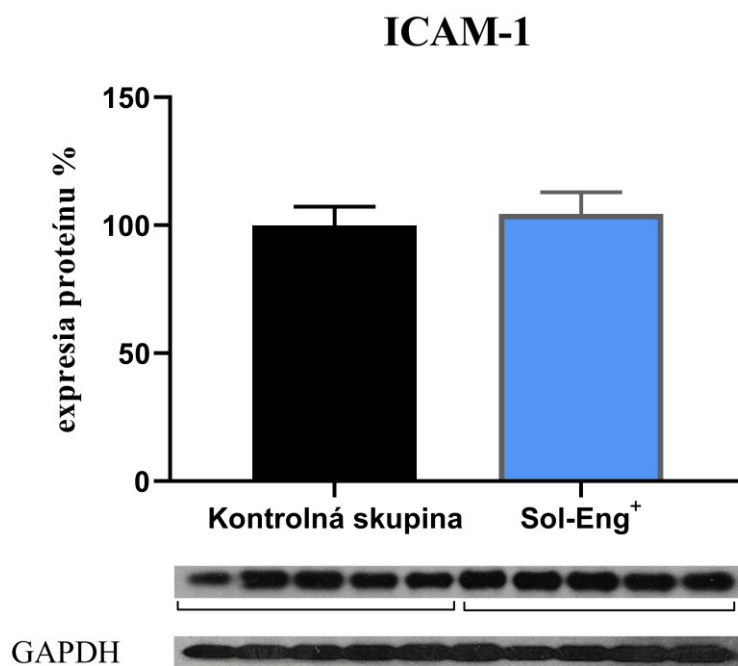
Výsledky Western blot analýzy homogenátu aorty transgénnych myší nám poskytli informácie o expresii sledovaných markerov endotelovej dysfunkcie, a to konkrétne adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín. Vyhodnotili sme zmeny v expresii týchto molekúl medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou myší.

Okrem vymenovaných molekúl sme na každej membráne identifikovali aj štrukturálny proteín GAPDH, ako kontrolu nanosenia proteínov. Špecifické signály proteínov (pruhy bandov) boli normalizované, tzn. prepočítané k signálu GAPDH. Normalizácia bola vykonaná za účelom spresnenia výsledkov.

5.4.1 Western blot analýza molekuly ICAM-1

Western blot analýza ICAM-1 nepreukázala signifikantný rozdiel v expresii tohto markeru medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou myší ($100,00 \pm 7,29$ vs. $104,50 \pm 8,40$; $p = 0,8413$). Expresia danej molekuly je vyjadrená v percentách a znázornená v Grafe č. 6. Pod grafom sú zobrazené špecifické signály proteínov (ICAM-1, GAPDH) na fotografickom filme.

Graf č. 6 - Expresia adhéznej molekuly ICAM-1 [%]



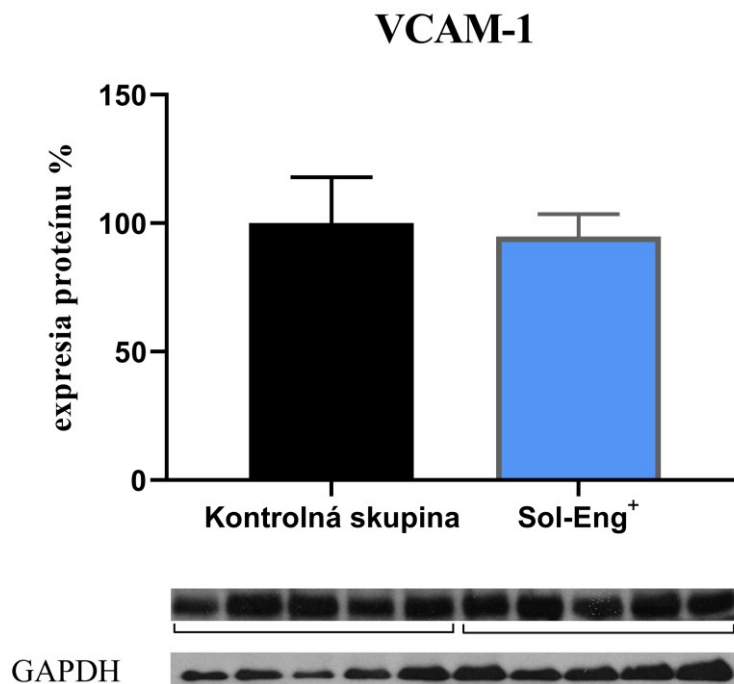
Ľavý stĺpec grafu vyjadruje expresiu ICAM-1 u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec vyjadruje expresiu tejto adhéznej molekuly u skupiny experimentálnej (Sol-Eng⁺). Expresia je vyjadrená v percentách [%].

Pod grafom je zobrazený fotografický film - špecifické signály proteínu ICAM-1 (80-114 kDa, bandy pozorované medzi 100-110 kDa). Pod ním je zobrazený pruh bandov proteínu GAPDH (30-40 kDa). Prvých päť bandov patrí kontrolnej skupine, druhých päť patrí Sol-Eng⁺ skupine myší.

5.4.2 Western blot analýza molekuly VCAM-1

Analýza expresie molekuly VCAM-1 nepreukázala štatisticky významný rozdiel medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou ($100,00 \pm 18,00$ vs. $94,75 \pm 8,76$; $p = 0,6905$). Expresia tejto adhéznej molekuly je vyjadrená v percentách a znázornená v Grafe č. 7. Pod grafom sú zobrazené špecifické signály proteínov (VCAM-1, GAPDH) na fotografickom filme.

Graf č. 7 - Expresia adhéznej molekuly VCAM-1 [%]



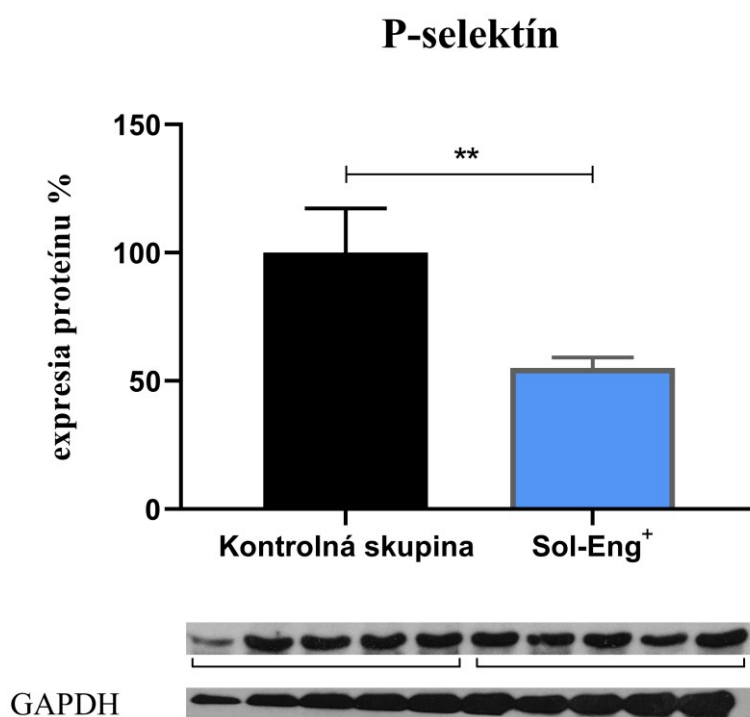
Ľavý stĺpec grafu vyjadruje expresiu VCAM-1 u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec znázorňuje expresiu tejto adhéznej molekuly u skupiny experimentálnej (Sol-Eng⁺). Expresia je vyjadrená v percentách [%].

Pod grafom je zobrazený fotografický film - špecifické signály proteínu VCAM-1 (100-110 kDa). Pod ním je zobrazený pruh bandov proteínu GAPDH (30-40 kDa). Prvých päť bandov patrí kontrolnej skupine, druhých päť patrí Sol-Eng⁺ skupine myší.

5.4.3 Western blot analýza molekuly P-selektín

Western blot analýza molekuly P-selektín preukázala signifikantný rozdiel v expresii tohto markeru medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou myší (** $p \leq 0,01$). Jeho expresia bola u kontrolnej skupiny myší signifikantne vyššia ako u experimentálnej skupiny ($100,00 \pm 17,26$ vs. $55,00 \pm 4,24$; $p = 0,0079$). Expresia molekuly P-selektín je vyjadrená v percentách a znázornená v Grafe č. 8. Pod grafom sú zobrazené špecifické signály proteínov (P-selektín, GAPDH) na fotografickom filme.

Graf č. 8 - Expresia adhéznej molekuly P-selektín [%]



Ľavý stĺpec grafu vyjadruje expresiu adhéznej molekuly P-selektín u kontrolnej skupiny myší. Pravý stĺpec znázorňuje expresiu tejto molekuly u experimentálnej (Sol-Eng⁺) skupiny. Expresia je vyjadrená v percentách [%]. U Sol-Eng⁺ skupiny došlo k signifikantnému zníženiu expresie (o 45%) sledovaného markeru (** $p \leq 0,01$).

Pod grafom je zobrazený fotografický film - špecifické signály proteínu P-selektín (cca 90 kDa, bandy pozorované medzi 90-100 kDa). Pod ním je zobrazený pruh bandov proteínu GAPDH (30-40 kDa). Prvých päť bandov patrí kontrolnej skupine, druhých päť patrí Sol-Eng⁺ skupine myší.

6. DISKUSIA

Cievny endotel hrá významnú úlohu pri zachovávaní správnej funkcie krvných ciev a kardiovaskulárneho systému ako takého. Nie je teda prekvapením, že endotelová dysfunkcia, komplexné poškodenie funkcie endotelu, výrazne prispieva k rozvoju mnohých kardiovaskulárnych ochorení ako napríklad ischemická choroba srdca, arteriálna hypertenzia či diabetes mellitus 2. typu (Bernatova *et al.*, 2014; Davignon and Ganz, 2004; Hadi *et al.*, 2005).

Endoglin (CD105, TGF- β receptor III, Eng) je transmembránový glykoproteín predstavujúci regulačnú zložku TGF- β receptorového komplexu, v rámci ktorého sa podieľa na regulácii niekoľkých signalizačných dráh (Albert *et al.*, 2001). Okrem membránovej formy tohto proteínu viaceré publikácie demonštrovali v krvi či kultivačnom médiu aj prítomnosť jeho solubilnej formy (sEng) (Levine *et al.*, 2006; Venkatesha *et al.*, 2006). Tá vzniká proteolytickým odštiepením extracelulárnej domény membránovo viazaného endoglinu pomocou enzýmu matrix metaloproteináza-14 (Hawinkels *et al.*, 2010; Venkatesha *et al.*, 2006).

Prvá zmienka o zvýšených hladinách endoglinu u pacientov s hypercholesterolémiou pochádza zo štúdie Blann *et al.* (Blann *et al.*, 1996). Taktiež bolo publikovaných niekoľko štúdií zaoberajúcich sa monitorovaním hladín solubilného endoglinu v krvi pacientov s hypercholesterolémiou a aterosklerózou. Tie preukázali jasný súvis medzi danými patologickými stavmi a zvýšenými hladinami sEng (Blaha, 2008; Perucci *et al.*, 2014; Valbuena-Diez *et al.*, 2012). Okrem toho sa zistilo, že zvýšenie hladín sEng koreluje s hladinou glykémie, s hodnotami systolického tlaku krvi, pulzného tlaku, rýchlosťou šírenia pulznej vlny a s elektrokardiograficky stanovenou hypertrofiou ľavej komory u pacientov s arteriálnou hypertenziou a s diabetom, čo u nich vedie k vyššiemu kardiovaskulárnemu riziku. Na základe tohto zistenia autori danej štúdie naznačili, že solubilná forma endoglinu je indikátorom hypertenzie a cievnych patológií spojených s diabetom, ako je endotelová dysfunkcia a kardiovaskulárne poškodenie (Blazquez-Medela *et al.*, 2010).

Na druhej strane, výsledky novej štúdie Nemeckova *et al.* preukázali, že krátkodobé pôsobenie vysokých hladín sEng neovplyvňuje aortálny endotel, a to ani z funkčného a ani z morfológického hľadiska. V danej štúdií boli použité aorty myši

starých štyri až šesť mesiacov (Nemeckova *et al.*, 2015). K odlišným výsledkom sa však dospelo v prípade, keď bola experimentálnym zvieratám podávaná diéta s vysokým obsahom tuku. Po troch mesiacoch podávania takejto stravy vyústila kombinácia vysokých hladín sEng a hypercholesterolémie v rozvoj prozápalového fenotypu v krvných cievach experimentálnych myší (Jezkova *et al.*, 2016). Podobne ďalšia štúdia, ktorá skúmala kombináciu vysokých hladín sEng a podávania vysokotukovej diéty po dobu šesť mesiacov priniesla výsledok, že daná kombinácia vedie k endotelovej dysfunkcii s narušením endoglnovej signalizácie. Tento výsledok zároveň naznačuje, že dlhodobé pôsobenie vysokých hladín solubilného endoglinu v spojení s hypercholesterolémiou indukuje a navyiac prehĺbuje endotelovú dysfunkciu v krvných cievach náchylných k ateroskleróze (Vítverova *et al.*, 2018).

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vyhodnotiť, či dlhodobé pôsobenie vysokých hladín solubilného endoglinu ovplyvní expresiu vybraných adhézných molekúl (ICAM-1, VCAM-1, P-selektín). Tieto molekuly umožňujú prichytenie leukocytov k endotelu a ich následný prienik k miestu zápalu (Karetová, 2002). Ich expresiu sme hodnotili v aorte experimentálnych zvierat, pričom boli použité 12 mesiacov starí samci transgénnych myší křímení štandardnou laboratórnou diétou pre hlodavce.

Zistilo sa, že expresia bunkových adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín sa počas rozvoja endotelovej dysfunkcie a zápalového procesu pri mnohých patologických stavoch, vrátane aterosklerózy, zvyšuje (Koning *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2012). Taktiež je dokázané, že k expresii molekúl ICAM-1 a VCAM-1 dochádza v oblastiach predisponovaných k rozvoju aterosklerózy a na periférii daných lézií (Cybulsky *et al.*, 2001; Nakashima *et al.*, 1998). Štúdia Cybulsky *et al.* navyiac poukázala na fakt, že molekula VCAM-1 zohráva hlavnú úlohu v iniciácii aterosklerotického procesu (Cybulsky *et al.*, 2001). Prozápalové pôsobenie molekuly P-selektín bolo demonštrované aj v štúdií s P-selektín deficientnými myšami, v ktorej bola u tejto skupiny experimentálnych myší pozorovaná redukcia výskytu aterosklerotických lézií (Collins *et al.*, 2000).

Z uvedených poznatkov je zrejmé, že zvýšená expresia adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín je charakteristickým znakom endotelovej dysfunkcie. Predstavujú teda markery tohto patologického stavu. Preto sme pre zhodnotenie potencionálneho vplyvu dlhodobého pôsobenia vysokých hladín solubilného endoglinu

na rozvoj endotelovej dysfunkcie v myšacej aorte použili vymenované bunkové adhézne molekuly.

Výsledky Western blot analýzy vykonanej v rámci tejto diplomovej práce preukázali, že expresia molekúl ICAM-1 a VCAM-1 sa medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou použitých myší, tzn. medzi 12 mesiacov starými jedincami s vysokými hladinami a naopak s nízkymi hladinami ľudského sEng, nelíši. Toto zistenie je v súlade s uvedenou publikáciou Nemeckova *et al.*, v ktorej bol zhodnotený vplyv krátkodobého pôsobenia vysokej hladiny sEng na funkciu endotelu, vrátane expresie bunkových adhézných molekúl ICAM-1 a VCAM-1. S použitím rovnakého transgénneho myšacieho modelu ako v tejto diplomovej práci uvedená štúdia demonštrovala, že vysoké hladiny sEng nemajú za daných podmienok vplyv na rozvoj endotelovej dysfunkcie (Nemeckova *et al.*, 2015). Tieto výsledky poukazujú na to, že solubilná forma endoglínu neindukuje prozápalový fenotyp v endoteli myšacej aorte.

Western blot analýza molekuly P-selektín priniesla neočakávaný výsledok. Síce došlo k štatisticky významnému rozdielu v jeho expresii medzi sledovanými skupinami transgénnych myší, avšak expresia tohto markeru endotelovej dysfunkcie bola signifikantne nižšia (o 45%) u experimentálnej skupiny, tzn. u jedincov s vysokými hladinami ľudského solubilného endoglínu. Doposiaľ nebola publikovaná štúdia, ktorá by poskytla vysvetlenie tohto neočakávaného výsledku.

V každom prípade, výsledky tejto diplomovej práce naznačujú, že ani dlhodobé pôsobenie vysokých hladín solubilného endoglínu nevedie k rozvoju endotelovej dysfunkcie a zápalového procesu v myšacej aorte. Pre objasnenie daných zistení a pre formuláciu finálneho záveru bude potrebné potvrdiť tieto výsledky pomocou ďalších metód.

7. ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na stanovenie expresie adhézných molekúl ICAM-1, VCAM-1 a P-selektín v myšacej aorte. Pre experiment boli použité 12 mesiacov starí samci. Tieto transgénne myši kmeňa CBAxC57BL/6J, ktorým bola do organizmu vložená genetická informácia pre expresiu ľudského sEng, boli rozdelené do dvoch skupín. Experimentálna skupina myší vykazovala vysoké hladiny sEng, zatiaľ čo kontrolná skupina myší mala nízke hladiny sEng. Hladiny sEng v plazme boli stanovené pomocou ELISA analýzy. Obidve skupiny myší boli kŕmené štandardnou laboratórnou diétou pre hlodavce. Biochemická analýza preukázala, že podávanie danej diéty nevedlo k štatisticky významnému rozdielu v hladinách celkového cholesterolu a TAG medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou použitých transgénnych myší.

Western blot analýza homogenátu aorty nepreukázala signifikantné rozdiely v expresii adhézných molekúl ICAM-1 a VCAM-1 medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou myší. Navyše, u molekuly P-selektín neočakávane došlo k signifikantne nižšej expresii u experimentálnej skupiny myší (Sol-Eng⁺) oproti kontrolnej skupine.

ELISA analýza plazmatických hladín solubilnej formy molekuly VCAM-1 nepreukázala štatisticky významný rozdiel medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou myší.

Výsledky tejto diplomovej práce ukázali, že vysoká hladina sEng nespôsobuje signifikantné zvýšenie expresie markerov endotelovej dysfunkcie (ICAM-1, VCAM-1) v aorte použitých myší. Navyše sa preukázalo, že spôsobuje signifikantné zníženie expresie markeru P-selektín. Tieto neočakávané výsledky, ktoré nenaznačujú koreláciu medzi dlhodobým pôsobením vysokých hladín sEng a rozvojom endotelovej dysfunkcie, bude potrebné overiť aj ďalšími metódami.

8. POUŽITÉ SKRATKY

| skratka | význam skratky | slovenský význam |
|-------------------------------|---|---|
| ALK | activin receptor-like kinase | aktivín receptoru podobné kinázy |
| ApoB | apolipoprotein B | apolipoproteín B |
| ApoE | apolipoprotein E | apolipoproteín E |
| ApoE^{-/-} | apolipoprotein E-deficient mouse model | apolipoproteín E deficientný myšací model |
| APS | ammonium persulfate | peroxodisíran amónny |
| CAMs | cell adhesion molecules | bunkové adhézne molekuly |
| CD | cluster of differentiation | diferenciačná skupina |
| COX | cyclooxygenase | cyklooxygenáza |
| EDHF | endothelium-derived hyperpolarizing factor | endotelový hyperpolarizačný faktor |
| ELISA analýza | enzyme-linked immunosorbent assay | enzýmová imunoanalytická metóda |
| eNOS | endothelial nitric oxide synthase | endotelová syntáza oxidu dusnatého |
| ET-1 | endothelin-1 | endotelín-1 |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza |
| HRP | horseradish peroxidase | chrenová peroxidáza |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule-1 | intercelulárna adhézna molekula-1 |
| kDa | kilodalton | kilodalton |
| LDL | low-density lipoproteins | lipoproteíny s nízkou denzitou |
| LDLr^{-/-} | low-density lipoprotein receptor knockout mouse model | LDL-receptor deficientný model |
| Milli-Q H₂O | „ultrapure“ water | redestilovaná, ultračistá voda |
| NO | nitric oxide | oxid dusnatý |
| oxLDL | oxidized low-density lipoproteins | oxidované lipoproteíny s nízkou denzitou |
| PAGE | polyacrylamide gel electrophoresis | polyakrylamidová gélová elektroforéza |
| PECAM-1 | platelet endothelial cell adhesion molecule-1 | doštičková endotelová adhézna molekula-1 |
| PGI₂ | prostaglandin I ₂ / prostacyclin | prostaglandín I ₂ / prostacyklín |
| PVDF membrána | polyvinylidene difluoride membrane | polyvinylden difluoridová membrána |

| skratka | význam skratky | slovenský význam |
|-------------------------------|--|---|
| RIPA | radio immuno precipitation assay buffer | tlmivý roztok používaný k lýze buniek |
| SDS | sodium dodecyl sulphate | dodecylsírany sodný |
| sEng | soluble endoglin | solubilný endoglin |
| sICAM-1 | soluble intercellular adhesion molecule-1 | solubilná intercelulárna adhézna molekula-1 |
| sVCAM-1 | soluble vascular cell adhesion molecule-1 | solubilná vaskulárna bunková adhézna molekula-1 |
| Sol-Eng⁺ | transgenic mouse model expressing human sEng | transgénny myšací model exprimujúci ľudský sEng |
| TAG | triacylglycerols | triacylglyceroly |
| TEMED | N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine | N, N, N', N' - tetrametyletylendiamín |
| TGF-β | transforming growth factor- β | transformujúci rastový faktor-beta |
| TBS | tris-buffered saline | tris pufoer hydrochlorid |
| TXA₂ | thromboxane A ₂ | tromboxán A ₂ |
| VCAM-1 | vascular cell adhesion molecule-1 | vaskulárna bunková adhézna molekula-1 |
| VLDL | very low-density lipoproteins | lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou |
| vWF | von Willebrand factor | von Willebrandov faktor |

9. ZOZNAM TABULIEK

| | |
|--|----|
| Tabuľka č. 1 - Lokalizácia a funkcia vybraných adhézných molekúl | 24 |
| Tabuľka č. 2 - Zhrnutie vybraných myšacích modelov aterosklerózy | 40 |
| Tabuľka č. 3 - Tabuľka riedenia vzoriek | 51 |
| Tabuľka č. 4 - Zloženie separačného a zaoštrovacieho gélu | 53 |
| Tabuľka č. 5 - Nastavenie primárnych protilátok | 57 |
| Tabuľka č. 6 - Nastavenie sekundárnych protilátok | 58 |
| Tabuľka č. 7 - Výber a doba pôsobenia detekčného činidla | 59 |

10. ZOZNAM OBRÁZKOV

| | |
|--|----|
| Obrázok č. 1 - Morfológická stavba krvných ciev | 14 |
| Obrázok č. 2 - Schéma vzniku aterosklerózy | 21 |
| Obrázok č. 3 - Rozdiel medzi zdravou a aterosklerózou poškodenou cievou | 22 |
| Obrázok č. 4 - Prestup leukocytov cez endotel do subendotelového priestoru | 24 |
| Obrázok č. 5 - Štruktúra ICAM-1 a sICAM-1 | 26 |
| Obrázok č. 6 - Štruktúra VCAM-1 | 28 |
| Obrázok č. 7 - Štruktúra P-selektínu | 30 |
| Obrázok č. 8 - Štruktúra endoglínu | 34 |
| Obrázok č. 9 - Membránový a solubilný endoglin | 35 |
| Obrázok č. 10 - Schéma metódy Western blot | 43 |
| Obrázok č. 11 - Detekcia proteínu pomocou primárnej a sekundárnej protilátky | 45 |
| Obrázok č. 12 - Elektroforetická aparátúra | 51 |
| Obrázok č. 13 - Hmotnostný marker | 54 |
| Obrázok č. 14 - Aparátúra pre prenos proteínov na membránu | 55 |

11. ZOZNAM GRAFOV

| | |
|---|----|
| Graf č. 1 - Hmotnosť myši [g] | 60 |
| Graf č. 2 - Hladiny celkového cholesterolu [mmol/l] | 61 |
| Graf č. 3 - Hladiny TAG [mmol/l] | 62 |

| | |
|---|----|
| Graf č. 4 - Plazmatické hladiny ľudského solubilného endoglínu [ng/ml]..... | 63 |
| Graf č. 5 - Plazmatické hladiny molekuly sVCAM-1 [ng/ml] | 64 |
| Graf č. 6 - Expresia adhéznej molekuly ICAM-1 [%]..... | 65 |
| Graf č. 7 - Expresia adhéznej molekuly VCAM-1 [%] | 66 |
| Graf č. 8 - Expresia adhéznej molekuly P-selektín [%]..... | 67 |

12. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Anatomy & Physiology, a learning initiative. 2013. Body Systems. *The Cardiovascular System: Blood Vessels* [online]. Available from: <https://anatomyandphysiology.com/cardiovascular-system-blood-vessels/> [2019-03-02]
- ALBERT, M. A., DANIELSON, E., RIFAI, N. & RIDKER, P. M. 2001. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*, 286, 64-70.
- ANDERSON, T. J. 1999. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*, 34, 631-8.
- ARISTORENA, M., BLANCO, F. J., DE LAS CASAS-ENGEL, M., OJEDA-FERNANDEZ, L., GALLARDO-VARA, E., CORBI, A., BOTELLA, L. M. & BERNABEU, C. 2014. Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *J Cell Sci*, 127, 2723-2735.
- ARMULIK, A., GENOVE, G. & BETSHOLTZ, C. 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21, 193-215.
- ARORA, S., GUNTHER, A., WENNERBLOM, B., UELAND, T., ANDREASSEN, A. K., GUDE, E., ENDRESEN, K., GEIRAN, O., WILHELMSSEN, N., ANDERSEN, R., AUKRUST, P. & GULLESTAD, L. 2010. Systemic markers of inflammation are associated with cardiac allograft vasculopathy and an increased intimal inflammatory component. *Am J Transplant*, 10, 1428-36.
- ATTWELL, D., MISHRA, A., HALL, C. N., O'FARRELL, F. M. & DALKARA, T. 2016. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab*, 36, 451-5.
- BASS, J. J., WILKINSON, D. J., RANKIN, D., PHILLIPS, B. E., SZEWCZYK, N. J., SMITH, K. & ATHERTON, P. J. 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*, 27, 4-25.
- BELL, G. 2016. Quantifying western blots: none more black. *BMC Biol*, 14, 116.
- BERGERS, G. & SONG, S. 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*, 7, 452-64.

- BERNATOVA, I., ANDRIANTSITOHAINA, R., ARRIBAS, S. M. & MATCHKOV, V. V. 2014. Endothelium in diseased states. *Biomed Res Int*, 2014, 810436.
- BioLegend, Inc. 2019. Western Blotting. *How Western Blotting Works* [online]. Available from: <https://www.biolegend.com/en-us/western-blot> [2019-03-19]
- Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H. 2019. Life Science Education. *Mini-PROTEAN Tetra Cell* [online]. Available from: <http://www.bio-rad.com/de-at/product/mini-protean-tetra-cell?ID=d5d6580e-b8f6-4f1c-bbc4-f63d360ea788> [2019-03-24]
- Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H. 2019. Life Science Research. *Mini Trans-Blot[®] Cell* [online]. Available from: <http://www.bio-rad.com/de-at/product/mini-trans-blot-cell?ID=589ca8f7-5751-487a-a453-571ee8cc8b7e> [2019-03-25]
- Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H. 2019. Life Science Research. *Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards* [online]. Available from: <http://www.bio-rad.com/de-at/sku/1610374-precision-plus-protein-dual-color-standards-500-ul?ID=1610374> [2019-03-25]
- 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 familiar hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 197(1), 264-270.
- BLANCO, F. J., GRANDE, M. T., LANGA, C., OUJO, B., VELASCO, S., RODRIGUEZ-BARBERO, A., PEREZ-GOMEZ, E., QUINTANILLA, M., LOPEZ-NOVOA, J. M. & BERNABEU, C. 2008. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res*, 103, 1383-92.
- BLANN A. D., WANG, J. M., WILSON, P. B. & KUMAR, S. 1996. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 120, 221-226.
- BLANKENBERG, S., BARBAUX, S. & TIRET, L. 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170, 191-203.
- BLAZQUEZ-MEDELA, A. M., GARCIA-ORTIZ, L., GOMEZ-MARCOS, M. A., RECIO-RODRIGUEZ, J. I., SANCHEZ-RODRIGUEZ A., LOPEZ-NOVOA, J. M. & MARTINEZ-SALGADO, C. 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med*, 8, 86.
- BLOEMEN, P. G., HENRICKS, P. A., VAN BLOOIS, L., VAN DEN TWEEL, M. C., BLOEM, A. C., NIJKAMP, F. P., CROMMELIN, D. J. & STORM, G. 1995. Adhesion

molecules: a new target for immunoliposome-mediated drug delivery. *FEBS Lett*, 357, 140-4.

BONETTI, P. O., LERMAN, L. O. & LERMAN, A. 2003. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 168-75.

BOT, P. T., HOEFER, I. E., SLUIJTER, J. P., VAN VLIET, P., SMITS, A. M., LEBRIN, F., MOLL, F., DE VRIES, J. P., DOEVENDANS, P., PIEK, J. J., PASTERKAMP, G. & GOUMANS, M. J. 2009. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke*, 40, 439-47.

BRESLOW, J. L. 1996. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272, 685-8.

BROCK, T. G., MCNISH, R. W. & PETERS-GOLDEN, M. 1999. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem*, 274, 11660-6.

CINES, D. B., POLLAK, E. S., BUCK, C. A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G. A., MCEVER, R. P., POBER, J. S., WICK, T. M., KONKLE, B. A., SCHWARTZ, B. S., BARNATHAN, E. S., MCCRAE, K. R., HUG, B. A., SCHMIDT, A. M. & STERN, D. M. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91, 3527-61.

COCKERILL, G. & XU, Q. 2011. Atherosclerosis. In: Fitridge, R., Thompson, M., editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [online]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534258/?fbclid=IwAR0WDBNRZstcs5mnN03tCF3-9mvXRIk5UG6O9h-hbTaL5MpHNmlKO9l7nbM>

COLLINS, R. G., VELJI, R., GUEVARA, N. V., HICKS, M. J., CHAN, L. & BEAUDET, A. L. 2000. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*, 191, 189-94.

Consortium for Functional Glycomics. 2010. CFG Paradigm Pages. *P-selectin* [online]. Available from: <http://www.functionalglycomics.org/CFGparadigms/index.php/P-Selectin> [2019-03-13]

- COOK-MILLS, J. M., MARCHESE, M. E. & ABDALA-VALENCIA, H. 2011. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal*, 15, 1607-38.
- Cusabio Technology LLC. 2018. Technical Articles. *How to Choose an Antibody for Scientific Research?* [online]. Available from: <https://www.cusabio.com/c-20675.html> [2019-03-18]
- CYBULSKY, M. I. & GIMBRONE, M. A. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 251, 788-791.
- CYBULSKY, M. I., IYAMA, K., LI, H., ZHU, S., CHEN, M., IYAMA, M., DAVIS, V., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., CONNELLY, P. W. & MILSTONE, D. S. 2001. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*, 107, 1255-62.
- ČIHÁK, R., GRIM, M., HELEKAL, I., KACVINSKÝ J. & MACHÁČEK, S. 2016. *Anatomie 3, 3. uprav. a dopl. vydání, Svazek I - Nauka o cévách*. Praha: Grada Publishing, 79-86 p. ISBN 978-80-247-5636-3.
- DAFF, S. 2010. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide*, 23, 1-11.
- DAIBER, A., STEVEN, S., WEBER, A., SHUVAEV, V. V., MUZYKANTOV, V. R., LAHER, I., LI, H., LAMAS, S. & MUNZEL, T. 2017. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol*, 174, 1591-1619.
- DAUGHERTY, A. 2002. Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci*, 323, 3-10.
- DAVIGNON, J. & GANZ, P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109, III27-32.
- DE VIVO, A., BAVIERA, G., GIORDANO, D., TODARELLO, G., CORRADO, F. & D'ANNA, R. 2008. Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87, 837-42.
- DEANFIELD, J. E., HALCOX, J. P. & RABELINK, T. J. 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115, 1285-95.

- DONG, Z. M., CHAPMAN, S. M., BROWN, A. A., FRENETTE, P. S., HYNES, R. O. & WAGNER, D. D. 1998. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 102, 145-52.
- EMINI VESELI, B., PERROTTA, P., DE MEYER, G. R. A., ROTH, L., VAN DER DONCKT, C., MARTINET, W. & DE MEYER, G. R. Y. 2017. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*, 816, 3-13.
- Encyclopaedia Britannica, Inc. 2018. *Atherosclerosis* [online]. Available from: <https://www.britannica.com/science/atherosclerosis> [2019-03-09]
- ENDEMANN, D. H. & SCHIFFRIN, E. L. 2004. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 15, 1983-92.
- ENDRESEN, M. J., MORRIS, J. M., NOBREGA, A. C., BUCKLEY, D., LINTON, E. A. & REDMAN, C. W. 1998. Serum from preeclamptic women induces vascular cell adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells in vitro: a possible role of increased circulating levels of free fatty acids. *Am J Obstet Gynecol*, 179, 665-70.
- FÁBRYOVÁ, L. 2009. Etiopatogenéza aterosklerotického procesu. *Via practica*, 6(2), 69-75.
- FALATI, S., LIU, Q., GROSS, P., MERRILL-SKOLOFF, G., CHOU, J., VANDENDRIES, E., CELI, A., CROCE, K., FURIE, B. C. & FURIE, B. 2003. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*, 197, 1585-98.
- FÉLÉTOU, M. 2011. Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. In: *The Endothelium* [online]. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57148/>
- FONSATTI, E., NICOLAY, H. J., ALTOMONTE, M., COVRE, A. & MAIO, M. 2010. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res*, 86, 12-9.
- FRENETTE, P. S., DENIS, C. V., WEISS, L., JURK, K., SUBBARAO, S., KEHREL, B., HARTWIG, J. H., VESTWEBER, D. & WAGNER, D. D. 2000. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*, 191, 1413-22.

- GALKINA, E. & LEY, K. 2007. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2292-301.
- GHOSH, A., GAO, L., THAKUR, A., SIU, P. M. & LAI, C. W. K. 2017. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci*, 24, 50.
- GHOSH, R., GILDA, J. E. & GOMES, A. V. 2014. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*, 11, 549-60.
- GHOSHAL, P., RAJENDRAN, M., ODO, N. & IKUTA, T. 2014. Glycosylation inhibitors efficiently inhibit P-selectin-mediated cell adhesion to endothelial cells. *PLoS One*, 9, e99363.
- GOKCE, N., KEANEY, J. F., JR., HUNTER, L. M., WATKINS, M. T., MENZOIAN, J. O. & VITA, J. A. 2002. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*, 105, 1567-72.
- 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, 757-69.
- GOMES, A. V., YOUNG, G. W., WANG, Y., ZONG, C., EGHBALI, M., DREWS, O., LU, H., STEFANI, E. & PING, P. 2009. Contrasting proteome biology and functional heterogeneity of the 20 S proteasome complexes in mammalian tissues. *Mol Cell Proteomics*, 8, 302-15.
- GOMES, A. V., ZONG, C., EDMONDSON, R. D., LI, X., STEFANI, E., ZHANG, J., JONES, R. C., THYPARAMBIL, S., WANG, G. W., QIAO, X., BARDAG-GORCE, F. & PING, P. 2006. Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circ Res*, 99, 362-71.
- GOUGOS, A. & LETARTE, M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*, 265, 8361-4.
- GREGORY, A. L., XU, G., SOTOV, V. & LETARTE, M. 2014. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*, 35 Suppl, S93-9.

- GUERRERO-ESTEO, M., SANCHEZ-ELSNER, T., LETAMENDIA, A. & BERNABEU, C. 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem*, 277, 29197-209.
- GUTTERMAN, D. D., CHABOWSKI, D. S., KADLEC, A. O., DURAND, M. J., FREED, J. K., AIT-AISSA, K. & BEYER, A. M. 2016. The Human Microcirculation: Regulation of Flow and Beyond. *Circ Res*, 118, 157-72.
- HADI, H. A., CARR, C. S. & AL SUWAIDI, J. 2005. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*, 1, 183-98.
- HAWINKELS, L. J. A. C., KUIPER, P., WIERCINSKA, E., VERSPAGET, H. W., LIU, Z., PARDALI, E., SIER, C. F. M. & TEN DIJKE, P. 2010. Matrix Metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-Mediated Endoglin Shedding Inhibits Tumor Angiogenesis. 70, 4141-4150.
- HUA, S. 2013. Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. *Front Pharmacol*, 4, 127.
- HUBBARD, A. K. & ROTHLEIN, R. 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*, 28, 1379-86.
- 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, 19027-30.
- CHEN, C., MOBLEY, J. L., DWIR, O., SHIMRON, F., GRABOVSKY, V., LOBB, R. R., SHIMIZU, Y. & ALON, R. 1999. High affinity very late antigen-4 subsets expressed on T cells are mandatory for spontaneous adhesion strengthening but not for rolling on VCAM-1 in shear flow. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162, 1084-1095.
- IGIC, R. & SKRBIC, R. 2014. The renin-angiotensin system and its blockers. *Srp Arh Celok Lek*, 142, 756-63.
- IYAMA, K., HAJRA, L., IYAMA, M., LI, H., DICHIARA, M., MEDOFF, B. D. & CYBULSKY, M. I. 1999. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*, 85, 199-207.

- JAWIEN, J., NASTALEK, P. & KORBUT, R. 2004. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*, 55, 503-17.
- JENSEN, E. C. 2012. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)*, 295, 369-71.
- JEZKOVA, K., RATHOUSKA, J., NEMECKOVA, I., FIKROVA, P., DOLEZELOVA, E., VAREJCKOVA, M., VITVEROVA, B., TYSONOVA, K., SERWADCZAK, A., BUCZEK, E., BERNABEU, C., LOPEZ-NOVOA, J. M., 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.
- JHA, H. C., DIVYA, A., PRASAD, J. & MITTAL, A. 2010. Plasma circulatory markers in male and female patients with coronary artery disease. *Heart Lung*, 39, 296-303.
- KARÁSEK, D., VAVERKOVÁ, H., HALENKA, M. & HUTYRA, M. 2004. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*, 6, 450-453. ISSN 1212-7299.
- KARETOVÁ, D. 2002. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína pro praxi*, 4, 119-122. ISSN 1212-7299.
- KERR, P., TAM, R. & PLANE, F. 2011. Endothelium. In: Fitridge, R., Thompson, M., editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [online]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534266/>
- KONING, G. A., SCHIFFELERS, R. M. & STORM, G. 2002. Endothelial cells at inflammatory sites as target for therapeutic intervention. *Endothelium*, 9, 161-71.
- KRICKA, L. J. 1991. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem*, 37, 1472-81.
- KUMAR, A. G., DAI, X. Y., KOZAK, C. A., MIMS, M. P., GOTTO, A. M. & BALLANTYNE, C. M. 1994. Murine VCAM-1. Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form. *J Immunol*, 153, 4088-98.
- KURIEN, B. T. & SCOFIELD, R. H. 2006. Western blotting. *Methods*, 38, 283-93.
- LARSSON, P., ALWIS, I., NIEGO, B., SASHINDRANATH, M., FOGELSTRAND, P., WU, M. C., GLISE, L., MAGNUSSON, M., DAGLAS, M., BERGH, N., JACKSON, S. P.,

- MEDCALF, R. L. & JERN, S. 2016. Valproic acid selectively increases vascular endothelial tissue-type plasminogen activator production and reduces thrombus formation in the mouse. *J Thromb Haemost*, 14, 2496-2508.
- LAWSON, C. & WOLF, S. 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 61, 22-32.
- LERMAN, A. & BURNETT, J. C., JR. 1992. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*, 86, III12-19.
- LEVINE, R. J., LAM, C., QIAN, C., YU, K. F., MAYNARD, S. E., SACHS, B. P., SIBAI, B. M., EPSTEIN, F. H., ROMERO, R., THADHANI, R., KARUMANCHI, S. A. & GROUP, C. S. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355, 992-1005.
- LEY, K. & HUO, Y. 2001. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 107, 1209-1210.
- LIBBY, P., RIDKER, P. M. & MASERI, A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135-43.
- LING, S., NHEU, L. & KOMESAROFF, P. A. 2012. Cell adhesion molecules as pharmaceutical target in atherosclerosis. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12, 175-183.
- LOPEZ-NOVOA, J. M. & BERNABEU, C. 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, H959-74.
- LUM, H. & ROEBUCK, K. A. 2001. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C719-41.
- MACPHEE, D. J. 2010. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 61, 171-7.
- MAHMOOD, T. & YANG, P.-C. 2012. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4, 429-434.
- MANTOVANI, A. & DEJANA, E. 1998. Endothelium. In: Delves, P. J., editors. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* [online]. Oxford: Elsevier. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012226765600222X>

- MATSUDAIRA, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem*, 262, 10035-8.
- MCCARRON, J. G., LEE, M. D. & WILSON, C. 2017. The Endothelium Solves Problems That Endothelial Cells Do Not Know Exist. *Trends Pharmacol Sci*, 38, 322-338.
- MCEVER, R. P. 2015. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, 107, 331-9.
- MCEVER, R. P. & ZHU, C. 2010. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 363-96.
- MICHIELS, C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*, 196, 430-43.
- MILLER, D. W., GRAULICH, W., KARGES, B., STAHL, S., ERNST, M., RAMASWAMY, A., SEDLACEK, H. H., MULLER, R. & ADAMKIEWICZ, J. 1999. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer*, 81, 568-72.
- MOJCIK, C. F. & SHEVACH, E. M. 1997. Adhesion molecules: a rheumatologic perspective. *Arthritis Rheum*, 40, 991-1004.
- MOMBOULI, J. V. & VANHOUTTE, P. M. 1999. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*, 31, 61-74.
- MONCADA, S., HIGGS, E. A. & VANE, J. R. 1977. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*, 1, 18-20.
- MURO, S. & MUZYKANTOV, V. R. 2005. Targeting of antioxidant and anti-thrombotic drugs to endothelial cell adhesion molecules. *Curr Pharm Des*, 11, 2383-401.
- NACHTIGAL, P., ZEMANKOVA VECEROVA, L., RATHOUSKA, J. & STRASKY, Z. 2012. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 224, 4-11.
- NAKASHIMA, Y., RAINES, E. W., PLUMP, A. S., BRESLOW, J. L. & ROSS, R. 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18, 842-851.
- NEMECKOVA, I., SERWADCZAK, A., OUJO, B., JEZKOVA, K., RATHOUSKA, J., FIKROVA, P., VAREJCKOVA, M., BERNABEU, C., LOPEZ-NOVOA, J. M.,

- CHLOPICKI, S. & NACHTIGAL, P. 2015. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One*, 10, e0119665.
- NORDT, T. K. & BODE, C. 2000. [Endothelium and endogenous fibrinolysis]. *Z Kardiol*, 89, 219-26.
- O'BRIEN, K. D., ALLEN, M. D., MCDONALD, T. O., CHAIT, A., HARLAN, J. M., FISHBEIN, D., MCCARTY, J., FERGUSON, M., HUDKINS, K. & BENJAMIN, C. D. 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 92, 945-951.
- OETTGEN, H. & BROIDE, D. H. 2012. 1 - Introduction to mechanisms of allergic disease. In: Holgate, S. T., Church, M. K., Broide, D. H. & Martinez, F. D., editors. *Allergy (Fourth Edition)* [online]. Edinburgh: W.B. Saunders. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780723436584000056>
- OHENE-ABUAKWA, Y. & PIGNATELLI, M. 2000. Adhesion Molecules as Diagnostic Tools in Tumor Pathology. *Int J Surg Pathol*, 8, 191-200.
- OLIVEIRA-PAULA, G. H., LACCHINI, R. & TANUS-SANTOS, J. E. 2016. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene*, 575, 584-99.
- PANKOW, J. S., DECKER, P. A., BERARDI, C., HANSON, N. Q., SALE, M., TANG, W., KANAYA, A. M., LARSON, N. B., TSAI, M. Y., WASSEL, C. L. & BIELINSKI, S. J. 2016. Circulating cellular adhesion molecules and risk of diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabet Med*, 33, 985-91.
- PARK, K. H. & PARK, W. J. 2015. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci*, 30, 1213-25.
- PERUCCI, L. O., GOMES, K. B., FREITAS, L. G., GODOI, L. C., ALPOIM, P. N., PINHEIRO, M. B., MIRANDA, A. S., TEIXEIRA, A. L., DUSSE, L. M. & SOUSA, L. P. 2014. Soluble endoglin, transforming growth factor-Beta 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia. *PLoS One*, 9, e97632.

- PIRAHANCHI Y. & BROWN, K. N. 2018. Physiology, Endothelial Derived Relaxation Factor (EDRF). In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537010/>
- QU, Z., XU, H. & TIAN, Y. 2015. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and bradykinin peptides in rats with myocardial infarction. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 3410-7.
- QUINTERO-RONDEROS P., ARANGO M. T., CASTIBLANCO J., CORREA N. E. & MONTOYA-ORTÍZ, G. 2013. Analysis of proteins and antibodies. In: Anaya, J. M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., et al., editors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [online]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459443/>
- RAJENDRAN, P., RENGARAJAN, T., THANGAVEL, J., NISHIGAKI, Y., SAKTHISEKARAN, D., SETHI, G. & NISHIGAKI, I. 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*, 9, 1057-69.
- RAMOS, C. L., HUO, Y., JUNG, U., GHOSH, S., MANKA, D. R., SAREMBOCK, I. J. & LEY, K. 1999. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res*, 84, 1237-44.
- RATHOUSKA, J., JEZKOVA, K., NEMECKOVA, I. & NACHTIGAL, P. 2015. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*, 243, 383-388.
- RUIZ-REMOLINA, L., OLLAURI-IBANEZ, C., PEREZ-ROQUE, L., NUNEZ-GOMEZ, E., PEREZ-BARRIOCANAL, F., LOPEZ-NOVOA, J. M., PERICACHO, M. & RODRIGUEZ-BARBERO, A. 2017. Circulating soluble endoglin modifies the inflammatory response in mice. *PLoS One*, 12, e0188204.
- SCHOLZ, D., DEVAUX, B., HIRCHE, A., POTZSCH, B., KROPP, B., SCHAPER, W. & SCHAPER, J. 1996. Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res*, 284, 415-23.
- SORENSEN, K. E., CELERMAJER, D. S., GEORGAKOPOULOS, D., HATCHER, G., BETTERIDGE, D. J. & DEANFIELD, J. E. 1994. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest*, 93, 50-5.

- 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, 2645-57.
- STEINBERG, H. O., CHAKER, H., LEAMING, R., JOHNSON, A., BRECHTEL, G. & BARON, A. D. 1996. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*, 97, 2601-10.
- STRASKY, Z., VECEROVA, L., RATHOUSKA, J., SLANAROVA, M., BRCAKOVA, E., KUDLACKOVA, Z., ANDRYS, C., MICUDA, S. & NACHTIGAL, P. 2011. Cholesterol Effects on Endoglin and Its Downstream Pathways in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *Circulation Journal*, 75, 1747-1755.
- STUEHR, D. J. & VASQUEZ-VIVAR, J. 2017. Nitric oxide synthases-from genes to function. *Nitric Oxide*, 63, 29.
- TAYLOR, S. C. & POSCH, A. 2014. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int*, 2014, 361590.
- THIAGARAJAN, R. R., WINN, R. K. & HARLAN, J. M. 1997. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost*, 78, 310-4.
- TONIOLO, A., BUCCELLATI, C., PINNA, C., GAION, R. M., SALA, A. & BOLEGO, C. 2013. Cyclooxygenase-1 and prostacyclin production by endothelial cells in the presence of mild oxidative stress. *PLoS One*, 8, e56683.
- TORTORA, G. J. & DERRICKSON, B. 2011. *Principles of Anatomy & Physiology, 13th Edition, Volume 2 - Maintenance and Continuity of the Human Body*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 802-811 p. ISBN 978-0-470-92429-7.
- TUCKER, W. D. & MAHAJAN, K. 2018. Anatomy, Blood Vessels. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470401/>
- USHIYAMA, S., LAUE, T. M., MOORE, K. L., ERICKSON, H. P. & MCEVER, R. P. 1993. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J Biol Chem*, 268, 15229-37.

- VALBUENA-DIEZ, A. C., BLANCO, F. J., OUJO, B., LANGA, C., GONZALEZ-NUNEZ, M., LLANO, E., PENDAS, A. M., DIAZ, M., CASTRILLO, A., LOPEZ-NOVOA, J. M. & BERNABEU, C. 2012. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*, 126, 2612-24.
- VAN DE GRAAFF, K. M. 2000. *Human Anatomy, Updated 5th Edition*. U.S.: McGraw-Hill Education, 538-543 p. ISBN 0-07-232667-0.
- VENKATESHA, S., TOPORSIAN, M., LAM, C., HANAI, J., MAMMOTO, T., KIM, Y. M., BDOLAH, Y., LIM, K. H., YUAN, H. T., LIBERMANN, T. A., STILLMAN, I. E., ROBERTS, D., D'AMORE, P. A., EPSTEIN, F. H., SELLKE, F. W., ROMERO, R., SUKHATME V. P., LETARTE, M. & KARUMANCHI, S. A. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*, 12, 642-649.
- VISCHER, U. M. 2006. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost*, 4, 1186-93.
- VITVEROVA, B., BLAZICKOVA, K., NAJMANOVÁ, I., VICEN, M., HYŠPLER, R., DOLEZELOVA, E., NEMECKOVA, I., DUINTJER TEBBENS, J., BERNABEU, C., PERICACHO, M. & NACHTIGAL, P. 2018. Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis*, 271, 15-25.
- VON SCHEIDT, M., ZHAO, Y., KURT, Z., PAN, C., ZENG, L., YANG, X., SCHUNKERT, H. & LUSIS, A. J. 2017. Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis. *Cell Metab*, 25, 248-261.
- WAKEFIELD, T. W., MYERS, D. D. & HENKE, P. K. 2009. Role of selectins and fibrinolysis in VTE. *Thromb Res*, 123 Suppl 4, S35-40.
- WINDISCH, R., PIRSCHTAT, N., KELLNER, C., CHEN-WICHMANN, L., LAUSEN, J., HUMPE, A., KRAUSE, D. S. & WICHMANN, C. 2019. Oncogenic Deregulation of Cell Adhesion Molecules in Leukemia. *Cancers (Basel)*, 11.
- WITKOWSKA, A. M. & BORAWSKA, M. H. 2004. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw*, 15, 91-8.
- YAKOVLEV, S. & MEDVED, L. 2018. Effect of fibrinogen, fibrin, and fibrin degradation products on transendothelial migration of leukocytes. *Thromb Res*, 162, 93-100.

ZADELAAR, S., KLEEMANN, R., VERSCHUREN, L., DE VRIES-VAN DER WEIJ, J., VAN DER HOORN, J., PRINCEN, H. M. & KOOISTRA, T. 2007. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1706-21.