

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Vplyv dapagliflozínu na expresiu a funkciu  
endoglínu a s ním súvisiacich biomarkerov  
endotelovej dysfunkcie u ľudských diabetických  
koronárnych endotelových buniek**

**Valéria Vavreková**

**Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Katarína Tripská, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2023**

## **PodĎakovanie**

Hlavne by som sa chcela poĎakovať mojej školiteľke PharmDr. Kataríne Tripskej, Ph.D, ktorá ma viedla celou diplomovou prácou. Ďakujem jej za všetok venovaný čas, rýchlu spätnú väzbu, dobrú komunikáciu, trpezlivosť a ochotu jak pri experimentálnej časti, tak aj pri písaní diplomovej práce. Ďalej by som sa chcela tiež poĎakovať prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za podporu, zrozumiteľnú komunikáciu, rady a poznatky pri písaní diplomovej práce. Na záver by som sa chcela poĎakovať svojej rodine sa podporu a dôveru, ktorú mi dávali nielen počas robenia a písania diplomovej práce, ale počas celého môjho štúdia.

"Vyhlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetky literárne a iné zdroje, z ktorých som pri vypracovaní tejto práce čerpala, sú uvedené v zozname literatúry a sú patrične citované v práci. Táto práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu."

V Hradci Králové

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	10
2.1	Endogln .....	10
2.1.1	Štruktúra a expresia endoglínu .....	10
2.1.2	Regulácia endoglínu .....	11
2.1.3	Signalizácia a funkcia endoglínu .....	13
2.1.4	Solubilný endogln .....	15
2.2	Endotel .....	16
2.2.1	Fyziologická funkcia endotelu .....	17
2.2.2	Endotelová dysfunkcia – definícia, prejavy, biomarkery .....	18
2.2.3	Úloha endoglínu v endotelovej dysfunkcii .....	21
2.2.4	Typy endotelových buniek používaných vo výskume kardiovaskulárneho systému .....	22
2.3	Diabetes mellitus .....	25
2.3.1	Definícia a typy .....	25
2.3.2	Úloha endoglínu u diabetu mellitu .....	29
2.4	Dapagliflozín .....	30
2.4.1	Mechanizmus účinku .....	31
2.4.2	Nežiadúce účinky .....	33
2.4.3	Klinické použitie .....	33
2.5	Metódy používané na detekciu endoglínu .....	34
2.5.1	Prietoková cytometria – základné princípy .....	34
2.5.2	Adhézia monocytov k endotelovým bunkám .....	36
2.5.3	ELISA – základné princípy .....	37
3	ZADANIE - CIEĽ PRÁCE .....	42

4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	43
4.1	DM-HCAEC.....	43
4.2	THP-1 MONOCYTY.....	43
4.3	Príprava vzoriek.....	44
4.3.1	Rozmrazovanie buniek.....	44
4.3.2	Pasážovanie buniek.....	45
4.3.3	Premedikácia buniek.....	47
4.4	Prietoková cytometria.....	50
4.5	Adhézia monocytov k endotelovým bunkám.....	57
4.6	ELISA.....	63
5	VÝSLEDKY.....	73
5.1	Počiatkové nastavenie koncentrácií a časov dapagliflozínu.....	73
5.2	Optimalizácia experimentálnych podmienok.....	79
5.3	Funkčná analýza.....	83
5.4	Analýza sEng.....	83
6	DISKUSIA.....	85
7	ZÁVER.....	87
8	ZOZNAM SKRATIEK.....	88
9	ZOZNAM OBRÁZKOV.....	90
10	ZOZNAM TABULIEK.....	91
11	ZOZNAM GRAFOV.....	92
12	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	93

# **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Názov diplomovej práce: Vplyv dapagliflozínu na expresiu a funkciu endoglínu a s ním súvisiacich biomarkerov endotelovej dysfunkcie u ľudských diabetických koronárnych endotelových buniek**

**Autor: Valéria Vavreková**

**Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Katarína Tripská, Ph.D.**

Cieľ práce: Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, ako dapagliflozín vplýva na expresiu a funkciu endoglínu (Eng) a s ním súvisiacich biomarkerov endotelovej dysfunkcie v rôznych časoch a koncentráciách u ľudských diabetických buniek.

Metódy: V tejto diplomovej práci sme pracovali s ľudskými diabetickými koronárnymi endotelovými bunkami. Tie sme premedikovali dapagliflozínom v rôznych časoch a koncentráciách, a dimethylsulfoxid bol použitý ako kontrola. Pomocou prietokovej cytometrie sme merali proteínovú expresiu Eng a biomarkerov endotelovej dysfunkcie. Pomocou prietokovej cytometrie sme tiež merali mieru adhézie monocytov k endotelovým bunkám. Za využitia metódy ELISA, sme detekovali hladiny solubilného endoglínu (sEng).

Výsledky: Preukázali sme, že 1nM koncentrácia dapagliflozínu počas 12-hodinovej premedikácie viedla k zníženiu expresie proteínov adhézných molekúl. Ďalej sme zistili, že aj proteínová expresia Eng sa významne znižuje pri nízkych koncentráciách dapagliflozínu. V skúmaných časoch a koncentráciách nemal dapagliflozín signifikantný vplyv na adhéziu monocytov, ani na tvorbu sEng.

Záver: Záverom je, že nízke koncentrácie dapagliflozínu môžu viesť k zníženej proteínovej expresii Eng a adhézných molekúl. Proteínová expresia Eng však nebola znížená dostatočne na to, aby to malo signifikantný vplyv na adhéziu monocytov k endotelovým bunkám, ani na tvorbu solubilného endoglínu.

Kľúčové slová: endogлін, endotelová dysfunkcia, diabetes mellitus, dapagliflozín

# **ABSTRACT**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Title of Diploma Thesis: Effect of dapagliflozin on the expression and function of endoglin and related biomarkers of endothelial dysfunction in human diabetic coronary artery endothelial cells**

**Author: Valéria Vavreková**

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

Aim: The aim of this thesis was to investigate how dapagliflozin affects the expression and function of endoglin (Eng) and related biomarkers of endothelial dysfunction at different times and concentrations in human diabetic cells.

Methods: In this thesis, we worked with human diabetic coronary endothelial cells. We premedicated these with dapagliflozin at different times and concentrations, and dimethyl sulfoxide was used as a control. We measured protein expression of Eng and biomarkers of endothelial dysfunction using flow cytometry. We also used flow cytometry to measure the rate of monocyte adhesion to endothelial. Using ELISA, we detected soluble endoglin (sEng) levels.

Results: We demonstrated that a 1nM concentration of dapagliflozin during a 12-hour premedication period led to a decrease in protein expression of adhesion molecules. We further showed that protein expression of Eng was also significantly reduced with low concentrations of dapagliflozin. At the times and concentrations examined, dapagliflozin had no significant effect on monocyte adhesion or on sEng formation.

Conclusion: In conclusion, low concentrations of dapagliflozin may lead to decreased protein expression of Eng and adhesion molecules. However, protein expression of Eng was not reduced sufficiently to have a significant effect on monocyte adhesion to endothelial cells, nor on soluble endoglin formation.

Keywords: endoglin, endothelial dysfunction, diabetes mellitus, dapagliflozin

# 1 ÚVOD

Endoglín je transmembránový glykoproteín, ktorý je považovaný za koreceptor transformujúceho rastového faktora  $\beta$ . Je exprimovaný napríklad v endotelových bunkách, aktivovaných monocytoch či makrofágoch (1). Je zodpovedný za fyziologickú funkciu endotelu, ale zároveň sa podieľa na mnohých patologických procesoch. Existujú dve formy, a to membránový (Eng) a solubilný (sEng). sEng je do krvného obehu uvoľňovaný pri rôznych patologických stavoch (2), ako je arteriálna hypertenzia, diabetes mellitus typu 2 a ďalšie (3). Eng sa podieľa na regulácii expresie a správnej funkcie endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS) (4, 5), čo je enzým dôležitý pre udržanie správnej funkcie endotelu. Pri patologických stavoch sa aktivita eNOS znižuje, čo môže viesť k rozvoju endotelovej dysfunkcie (6). Eng tiež zohráva dôležitú úlohu pri transendotelovej migrácii leukocytov, čo je dané tým, že obsahuje v extracelulárnej doméne arginin-glycin-asparágovú kyselinu (RGD), ktorá sa môže viazať na integríny na povrchu leukocytov (7).

Endotelová dysfunkcia (ED) označuje stav, pri ktorom endotel stráca svoje fyziologické vlastnosti a posúva sa smerom k vazokonstrikčnému, protrombotickému a prozápalovému stavu (8). Spôsobuje zhoršenie cievnej relaxácie a zvýšenie cievneho odporu, čo vedie k zvýšeniu krvného tlaku a poškodeniu orgánov. Základným prejavom tohto stavu je zhoršená biologická dostupnosť oxidu dusnatého (9). ED je spojovaná s väčšinou foriem kardiovaskulárnych ochorení, ako je hypertenzia, ischemická choroba srdca, chronické srdcové zlyhanie či diabetes mellitus (10).

Diabetes mellitus je chronické ochorenie, ktoré sa vyznačuje zvýšenou hladinou glukózy v krvi (hyperglykémiou), ktorá rôznymi mechanizmami prispieva k vzniku endotelovej dysfunkcie. Hyperglykémia je výsledkom neschopnosti tela produkovať inzulín, rezistencie voči pôsobeniu inzulínu alebo ich kombinácie. Typ 2 je najčastejším typom diabetes mellitus a postihuje asi 90% pacientov s touto diagnózou (11). Diabetes sa prejavuje rôznymi príznakmi, ako sú nadmerný smäd, časté močenie, únava, chudnutie alebo zvýšená chuť do jedla. Liečba diabetes mellitus závisí od typu ochorenia, príčiny, príznakov a individuálnych potrieb pacienta (12).



Dapagliflozín je reverzibilný inhibítor sodno-glukózového kotransportéra-2 (SGLT-2), ktorý je používaný pri liečbe diabetes mellitus typu 2 (13). Inhibíciou SGLT-2 dapagliflozín blokuje reabsorpciu glukózy v obličkách, čím zvyšuje jej vylučovanie močom a znižuje jej hladinu v krvi (14-16).

Keďže v súčasnosti nie sú k dispozícii štúdie skúmajúce vplyv SGLT-2 inhibítorov na Eng, tak sa budeme v tejto diplomovej práci zaoberať vplyvom dapagliflozínu na expresiu a funkciu Eng a s ním súvisiacich biomarkerov endotelovej dysfunkcie, u ľudských diabetických buniek.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Endoglin

Endoglin (Eng), tiež zvaný aj ako CD105, je transmembránový glykoproteín, ktorý je považovaný za koreceptor pre ligandy zo superrodiny transformujúceho rastového faktora  $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF $\beta$ ). Podieľa sa na fyziologickej funkcii endotelu, ale tiež hrá podstatnú úlohu pri rôznych patologických stavoch. Existujú dve rôzne formy, a to membránový Eng exprimovaný rôznymi bunkami a solubilný endoglin (sEng) cirkulujúci v plazme alebo kultivačnom médiu buniek (17).

#### 2.1.1 Štruktúra a expresia endoglinu

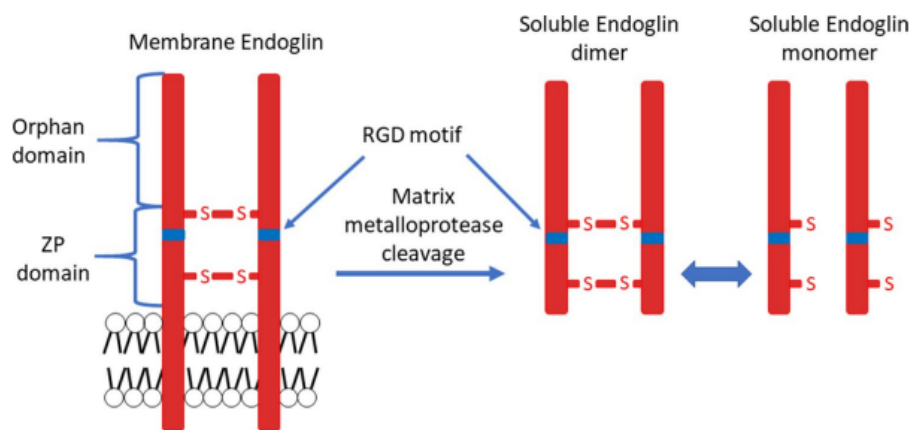
Ľudský endoglin je homodimérny membránový glykoproteín s molekulovou hmotnosťou približne 180 kDa, zložený z dvoch podjednotiek spojených disulfidickou väzbou (18). Je exprimovaný prevažne na endotelových bunkách (endothelial cells, EC) (19), ale bol detekovaný aj v bunkách hladkého svalstva ciev (20), aktivovaných monocytoch a makrofágoch (21), fibroblastoch (22), pečeneňových hviezdicových bunkách a iných bunkách (23).

Eng pozostáva z extracelulárnej časti, hydrofóbnej transmembránovej časti a krátkej cytoplazmatickej domény, ktorá je bohatá na serín/treonín. Extracelulárna časť Eng obsahuje osirotenú doménu (nevykazuje významnú homológiu so žiadnymi inými rodinami proteínov) a časť zóna pellucida (ZP), ktorá je zodpovedná za interakciu proteín-proteín. Časť domény ZP tvorí arginin-glycin-asparágová kyselina (RGD), čo je základná rozpoznávacía štruktúra pre väzbu na integríny a iné RGD receptory (Obr.1) (24, 25).

Boli identifikované dve alternatívne zostrihané izoformy Eng (26). Ich štruktúra sa líši počtom aminokyselín v cytoplazmatickej doméne, úrovňou fosforylácie a afinitou k receptorom. Izoforma dlhý endoglin (long endoglin, L-Eng) obsahuje cytoplazmatický reťazec zložený zo 47 aminokyselín a je známe, že stimuluje endotelovú bunkovú migráciu, proliferáciu a angiogenézu prostredníctvom dráhy ALK1/SMAD1/5. Krátky endoglin (short endoglin, S-Eng)

je minoritná izoforma Eng s cytoplazmatickým reťazcom, ktorý je zložený zo 14 aminokyselín. S-Eng pravdepodobne inhibuje proliferáciu, migráciu endotelových buniek a bolo ukázané, že indukuje starnutie endotelových buniek prostredníctvom ALK5/SMAD2/3 dráhy (27). Keďže L-Eng je predominantná forma a úloha S-Eng je v súčasnosti nejasná, budeme sa v ďalších kapitolách tejto práce venovať izoforme L-Eng, ktorú tiež budeme označovať ako Eng.

**Obrázok 1: Štruktúra endoglínu**



Na obrázku vľavo je znázornená štruktúra membránového endoglínu. Jeho extracelulárna časť obsahuje osirotenú doménu a časť zóna pellucida. Vpravo sa nachádza znázornenie solubilného endoglínu.

ZP - zóna pellucida, RGD - arginin-glycin-asparágová kyselina

Prevzaté z: *Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome* (28)

### 2.1.2 Regulácia endoglínu

Expresia membránového Eng je regulovaná rôznymi transkripčnými faktormi ako je faktor 6 podobný Krueppelovi (Kruppel-like factor 6, KLF6) (člen rodiny zinkového prsta KLF6, ktorý je konštitutívne exprimovaný v ľudských tkanivách) (29), nukleárny faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) podjednotka p65 (NF- $\kappa$ B p65), pečenný X jadrový receptor (liver X nuclear receptor, LXR; faktor súvisiaci s

metabolizmom cholesterolu a oxysterolový receptor) (30), hypoxiou indukovaný faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (transkripčný faktor zápalového a oxidačného stresu) (31-33) a špecifický proteín 1 (specificity protein 1, Sp1) (30).

Aby bolo možné pochopiť mechanizmy zapojené do regulácie expresie Eng bol izolovaný klon genómovej DNA, ktorý obsahoval sekvenciu Eng. To viedlo k zisteniu, že génu pre Eng chýbajú boxy TATA a CAAT, ale namiesto toho obsahuje dve oblasti bohaté na guanín-cytozín (GC) a motívy pre Sp1, NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$ , estrogén-responzívne elementy a iné (34). Taktiež bolo identifikované kritické miesto Sp1 pre bazálnu transkripciu Eng. Mutácia v tejto sekvencii alebo pridanie inhibítora Sp1 viedlo k eliminácii bazálnej transkripčnej aktivity a zníženie citlivosti promotora Eng na TGF $\beta$  (35).

Ďalej bola tiež objavená vysoká expresia Eng v neovaskulatúre za hypoxických podmienok (ako sú ischemické tkanivá alebo nádory), ale mechanizmy, ktoré sú základom tejto zvýšenej expresie, neboli známe. Preto Sánchez-Elsner a kol. skúmal úlohu hypoxie v regulácii Eng. Preukázali, že Eng promótor je aktivovaný za hypoxických podmienok, čo vedie k zvýšenej regulácii Eng mRNA transkriptu a proteínovej expresie Eng na bunkovom povrchu. To viedlo k objavu miesta pre naviazanie HIF-1 $\alpha$  v géne pre Eng, ktorý môže regulovať expresiu Eng na transkripčnej úrovni (32).

Skutočnosť, že Eng a KLF6 (jadrový proteín, ktorý obsahuje tri zinkové prsty, ktoré sú zodpovedné za väzbu na GC motív v promótoroch rôznych génov) (36, 37) sú oba indukované počas vaskulárneho poškodenia, spoločne s vedomím, že transaktivácia Eng je závislá od GC boxov, viedli Botella a kol. preskúmať, či medzi nimi existuje nejaké spojenie. Výsledkom bolo zistenie, že vaskulárne poškodenie u potkanov malo za následok indukciu KLF6, ktorá následne viedla k indukcii Eng. Taktiež, poškodenie endotelových buniek viedlo k okamžitej indukcii KLF6, po ktorej nasledovala zvýšená expresia Eng. Okrem toho endotelové bunky transfekované vektorom KLF6 exprimovali 3,2-krát viac Eng mRNA ako bunky transfekované prázdny vektorom (29). Bolo preukázané, že okrem iného môže KLF6 pôsobiť aj ako koaktivátor NF- $\kappa$ B; konkrétnejšie, môže interagovať s podjednotkou p65 v jadrách a viazať sa na promotory cieľových génov NF- $\kappa$ B p65 (38).

Ďalší transkripčný faktor bol objavený, keď Henry-Berger a kol. pracovali na identifikácii nových cieľov LXR v placente s cieľom zlepšiť pochopenie invázie trofoblastov. Zistili, že ošetrovanie buniek pomocou T0901317, agonistu LXR, viedlo k významnému zvýšeniu hladín Eng mRNA a proteínov (2).

Všetky tieto dôkazy naznačujú, že regulácia expresie Eng je vzájomne prepojená a zahŕňa mnoho rôznych mechanizmov a dráh.

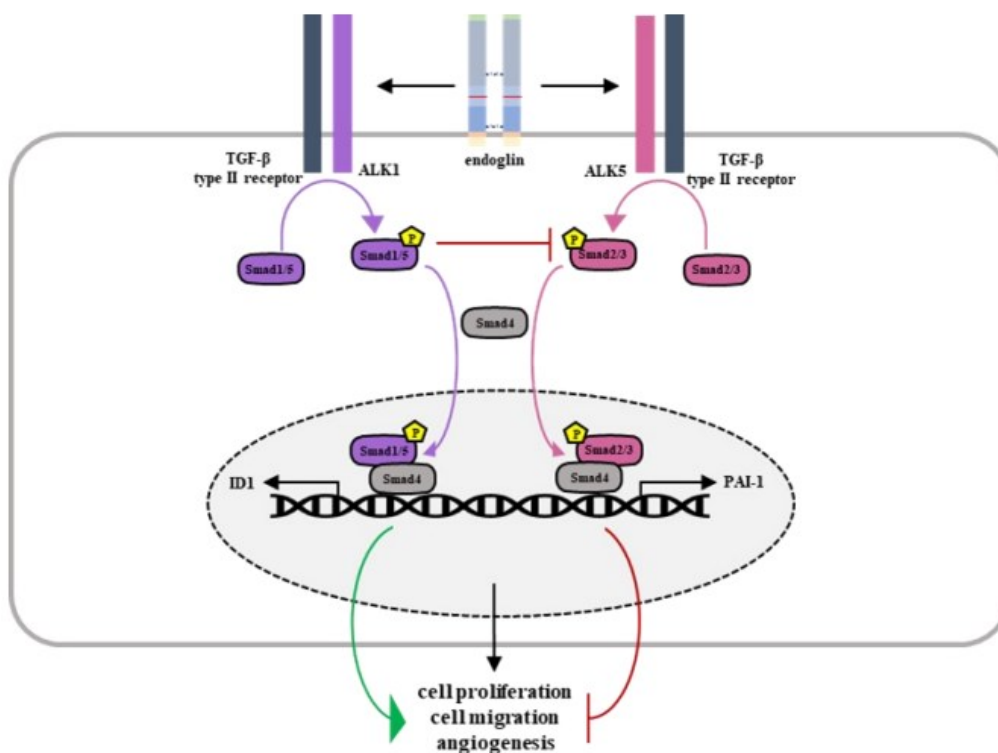
### 2.1.3 Signalizácia a funkcia endoglinu

Endoglin je dôležitým regulátorom signalizácie TGF $\beta$  pri rôznych fyziologických a patologických stavoch (39). TGF $\beta$  1 a 3 patria medzi najdôležitejšie ligandy pre endoglin spolu s kostným morfogenetickým proteínom 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9). Väzba týchto ligandov reguluje expresiu a signalizáciu endoglinu v endotelových bunkách (40-42).

Receptory TGF $\beta$  možno rozdeliť do troch odlišných podtypov: receptory typu I, tiež nazývané ako kinázy podobné aktivínovému receptoru (activin receptor like kinase 1-7, ALK1-7), receptory typu II (TGF $\beta$ 2, BMPR2, ...) a receptory typu III (Eng a  $\beta$ -glykán) (19, 43). Väzba ligandov na Eng v komplexe s receptorom typu II vedie ku aktivácii a zmene konformácií receptoru typu I (44). Receptor typu I potom môže fosforylovať transkripčné faktory Smad, ktoré prenášajú signál do jadra (45, 46).

Eng je prídavný receptor, ktorému chýba vnútorná kinázová aktivita a vyžaduje koexpresiu receptorov typu I a typu II na to, aby na seba mohol naviazať svoje ligandy. Eng môže tvoriť komplex buď s receptorom ALK1 alebo ALK5, a tak môže modulovať, ktorá signálna dráha Smad bude aktivovaná (19, 47). Väzba Eng na ALK1 vedie k aktivácii signálnej dráhy ALK1/Smad1/5, ktorá stimuluje proliferáciu a migráciu endotelových buniek (4). Väzba Eng na ALK5 vedie k aktivácii signálnej dráhy ALK5/Smad2/3, ktorá inhibuje proliferáciu a migráciu endotelových buniek. Týmto mechanizmom Eng udržiava rovnováhu medzi signalizáciou ALK1/Smad1/5 a ALK5/Smad2/3, čím reguluje, či sú endotelové bunky v aktivovanom alebo pokojovom stave (Obr.2) (5).

Obrázok 2: Úloha endoglinu v TGF $\beta$  signalizácii



Eng sprostredkováva rovnováhu medzi aktiváciou signálnych dráh ALK1/Smad1/5 a ALK5/Smad2/3. Potom, čo sa Eng viaže k receptoru TGF $\beta$  typu I (buď ALK1 alebo ALK5), sú príslušné transkripčné faktory Smad fosforylované. Následne vytvoria komplex so Smad4 a premiestnia sa do jadra, kde aktivujú transkripciu rôznych génov. Aktivácia signálnej dráhy ALK1/Smad1/5 vedie k zvýšenej bunkovej proliferácii, bunkovej migrácii a angiogenéze; zatiaľ čo aktivácia ALK5/Smad2/3 tieto procesy inhibuje.

TGF $\beta$  type II receptor – receptor TGF $\beta$  typu II, ALK1 - kináza podobná aktivínovému receptoru 1, ALK5 - kináza podobná aktivínovému receptoru 5

Autor obrázka: Katarína Tripská (obrázok použitý so súhlasom autora)

Okrem toho sa ukázalo, že Eng sa podieľa na fosforylácii (signalizácii) Smad2/3, čo vedie k regulácii exprese a správnej funkcie endotelovej syntázy oxidu dusnatého (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) v endotelových

bunkách a demonštruje vzťah medzi Eng a NO-dependentnou vazodilatáciou (48, 49).

Eng zohráva úlohu aj v regulácii mezenchýmových kmeňových buniek kostnej drene (50) a v regulácii epitelovo-mezenchýmovej transformácie počas tvorby srdcových chlopní (51). Okrem toho Eng ovplyvňuje účinnosť tvorby hemangioblastu, spoločného embryonálneho predchodcu krvotvornej a endotelovej línie (Obr.3) (52). Eng má kľúčovú úlohu pri obnove ciev sprostredkovanou krvnými mononukleárnymi bunkami (53). To potvrdzuje aj fakt, že myši s nulovým Eng zomierajú v polovici gestácie na angiogénne a kardiovaskulárne defekty (54-56).

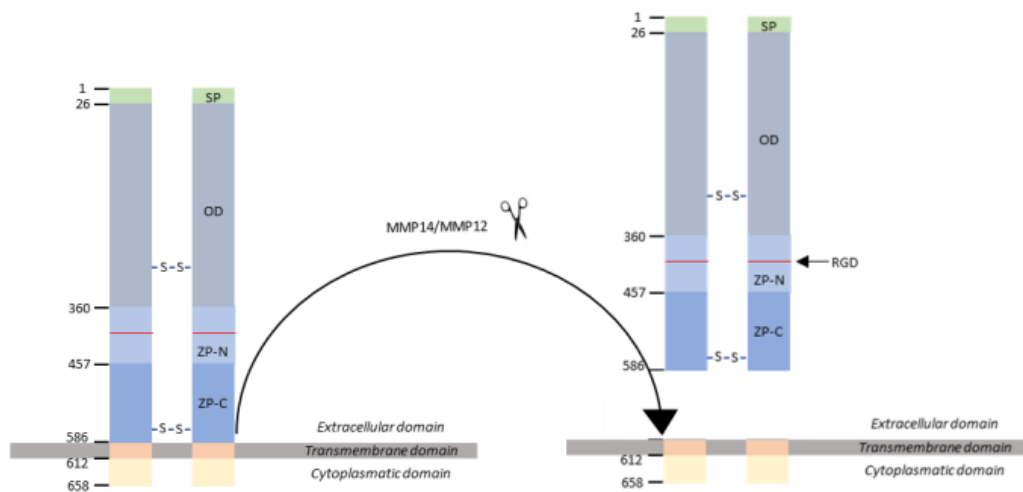
Eng tiež zohráva úlohu pri hereditárnej hemoragickej telangiektázií typu 1 (HHT1), čo je autozomálne dominantné ochorenie charakterizované epistaxou (krvácaním z nosa), teleangiektázami (rozšírenými drobnými kapilármi, ktoré sú vidno na koži) a multiorgánovou cievnou dyspláziou (poruchou vývoja ciev), ktoré sú spôsobené nedostatočnou expresiou Eng (57, 58).

#### **2.1.4 Solubilný endoglín**

Solubilný Eng (sEng) je produktom enzymatického štiepenia membránového Eng matricovými metaloproteinázami (MMP). Doteraz sa preukázalo, že existujú dve MMP, ktoré štiepia Eng – matricová metaloproteináza 12 a 14 (MMP12 a MMP14). Miesto štiepenia sa nachádza na aminokyselinách (AMK) 586-587. To znamená, že sa takmer celá Eng extracelulárna doména po proteolytickom štiepení uvoľní do obehu (Obr.3) (3).

sEng je do krvného obehu uvoľňovaný pri rôznych patologických stavoch (39), ako je arteriálna hypertenzia, diabetes mellitus II. typu (59), familiárna hypercholesterolémia (60) a ďalšie. Plazmatická koncentrácia sEng bola zvýšená u pacientov s pokročilým diabetes mellitus a koncentrácia sEng tiež pozitívne koreluje s jeho komplikáciami, ako je retinopatia, periférna neuropatia alebo nefropatia (59, 61-63).

**Obrázok 3: Štiepenie endoglínu**



Na obrázku je znázornené štiepenie membránového Eng pomocou MMP14 alebo MMP12 v polohe 586-587 AMK, čo má za následok uvoľnenie extracelulárnej domény (sEng) do obehu.

MMP14 - matricová metaloproteináza 14, MMP12 - matricová metaloproteináza 12, RGD - arginin-glycin-asparágová kyselina

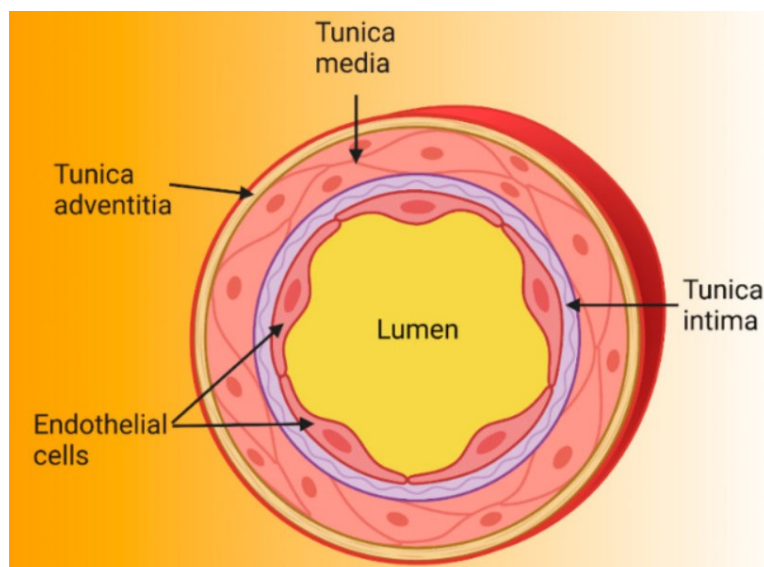
Autor obrázka: Katarína Tripská (obrázok použitý so súhlasom autora)

## 2.2 Endotel

Endotel je tvorený jednou vrstvou EC umiestnenou vo vrstve intimy tepien (Obr.4) (64, 65). Po mnoho rokov bol endotel považovaný za jednoduchú bariéru ohraničujúcu stenu cievy (64), ale v súčasnosti je známe, že hrá dôležitú úlohu v kardiovaskulárnej fyziológii a patofyziológii (66).



**Obrázok 4: Štruktúra arteriálnej steny**



*Arteriálne steny sa skladajú z troch vrstiev: tunica intima je najvnútornejšia vrstva a je tvorená endotelovými bunkami ukotvenými v bazálnej lamíne (spojivovom tkanive); tunica media obsahuje bunky hladkého svalstva ciev a reguluje cievny tonus; a tunica adventitia je najvzdialenejšia vrstva a obsahuje nervové zakončenia, perivaskulárne tukové tkanivo a spojivové tkanivo (67-69).*

*Prevzaté z: Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches (70)*

### **2.2.1 Fyziologická funkcia endotelu**

Štruktúra endotelových buniek a funkčná integrita sú rozhodujúce pre udržanie správnej funkcie endotelu. Jednou z hlavných funkcií endotelu je regulácia transendotelovej migrácie leukocytov cez spojenia medzi endotelovými bunkami počas zápalu. K tomu dochádza v dôsledku interakcie integrínov na povrchu leukocytov s bunkovými adhéznymi molekulami umiestnenými na povrchu endotelových buniek, ako je E-selektín, intercelulárna bunková adhézna molekula-1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), vaskulárna bunková adhézna molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) alebo trombocytová a endotelová bunková adhézna molekula-1 (71).

Ďalšou kľúčovou funkciou endotelu je regulácia cievneho tonusu. EC sú schopné sprostredkovať cievny tonus produkciou vazodilatačných a vazokonstrikčných látok. Uvoľňovanie oxidu dusnatého (nitric oxide, NO) hrá kľúčovú úlohu pri indukcii vazodilatácie (72). Molekuly podieľajúce sa na vazodilatácii zahŕňajú prostacyklín (68, 73) a hyperpolarizačný faktor odvodený od endotelu (68, 74). EC tiež produkujú vazokonstrikčné mediátory, ako je endotelín-1 (75, 76).

Endotel hrá tiež kľúčovú úlohu pri zabezpečovaní správnej hemostatickej rovnováhy, teda optimálneho prietoku krvi. Za fyziologických podmienok EC zabraňujú trombóze pomocou rôznych antikoagulačných a antitrombogénnych mechanizmov (77, 78).

Dôležitou funkciou EC je tiež angiogenéza, proces tvorby nových ciev z existujúceho endotelu. Najdôležitejším hnacím motorom tvorby ciev je vaskulárny endotelový rastový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) (8, 65).

### **2.2.2 Endotelová dysfunkcia – definícia, prejavy, biomarkery**

Termín endotelová dysfunkcia (ED) označuje stav, pri ktorom endotel stráca svoje fyziologické vlastnosti a posúva sa smerom k vazokonstrikčnému, protrombotickému a prozápalovému stavu (79). Prozápalový stav je definovaný zvýšenou permeabilitou endotelu, agregáciou krvných doštičiek, adhéziou leukocytov k endotelu a produkciou prozápalových cytokínov (9).

Základným prejavom tohto stavu je zhoršená biologická dostupnosť NO, ktorá môže byť dôsledkom buď zníženej produkcie eNOS alebo zvýšenej eliminácie NO reaktívnymi formami kyslíka (reactive oxygen species, ROS) (6). eNOS je enzým udržiavajúci správnu funkciu cievneho endotelu. Keď je aktivita eNOS znížená hypercholesterolémiou a/alebo zápalom môže to viesť k rozvoju ED. (10)

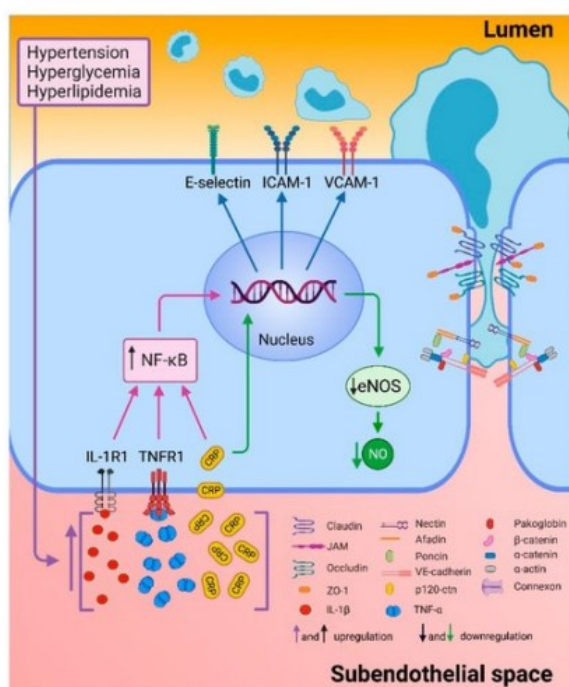
ED je spojovaná s väčšinou foriem kardiovaskulárnych ochorení, ako je hypertenzia, ischemická choroba srdca, chronické srdcové zlyhanie, ischemická choroba dolných končatín, diabetes mellitus, chronické zlyhanie obličiek a

závažné vírusové infekcie (80). Okrem toho hyperglykémia, inzulínová rezistencia, hyperinzulinémia a dyslipidémia nezávisle prispievajú k ED rôznymi mechanizmami (79).

Biomarkery ED môžu poskytnúť viac informácií o riziku rozvoja kardiovaskulárnych ochorení, a preto je hľadanie nových biomarkerov veľmi dôležité (81, 82).

Pri kardiovaskulárnych ochoreniach ako hypertenzia, hyperglykémia či hyperlipidémia dochádza k indukcií prozápalových cytokínov, ako je interleukín 1 beta (IL1 $\beta$ ) a tumor nekrotizujúci faktor alfa (tumor necrosis factor-alpha, TNF $\alpha$ ). Ďalší induktor adhézných molekúl môže byť proteín akútnej fázy (c-reactive protein, CRP), ktorý je produkovaný pečeňou ako odpoveď na interleukín 6 (IL6) (81). CRP tiež znižuje transkripciu eNOS a destabilizuje mRNA eNOS, čo vedie k poklesu NO (83, 84). Na základe prozápalovej aktivácie prostredníctvom faktora NF- $\kappa$ B dochádza k zvýšenej expresii endotelových adhézných molekúl (napr. E-selektínu, P-selektínu, ICAM-1 a VCAM-1) (85). Ďalej reorganizácia aktínových filamentov (prostredníctvom iných signálnych dráh) vedie k otvoreniu medzibunkových spojení, čo umožňuje leukocytom transmigrovať do subendotelového priestoru (Obr.5) (83, 84).

**Obrázok 5: Biomarkery endotelovej dysfunkcie**



Z obrázka je možné vidieť, že endotelová dysfunkcia môže byť navodená hypertenziou, hyperglykémiou a hyperlipidémiou, čo vedie k zvýšenej produkcii  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$  a CRP. Tieto prozápalové cytokíny sa viažu na ich receptory a na základe toho dochádza ku zvýšenej aktivácii faktora  $NF-\kappa B$ , ktorý stimuluje transkripciu biomarkerov endotelovej dysfunkcie, ako je E-selektín, ICAM-1, VCAM-1. Okrem toho CRP tiež znižuje transkripciu eNOS, čo vedie k zníženiu NO.

$IL1\beta$  – interleukín 1 beta,  $TNF\alpha$  - tumor nekrotizujúci faktor alfa, CRP – proteín akútnej fázy,  $NF-\kappa B$  - nukleárny faktor kappa B, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, eNOS - endotelová syntáza oxidu dusnatého, NO – oxid dusnatý

Prevzaté z : *Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches* (70).

Selektíny sú zodpovedné za počiatkové zachytenie a rolovanie leukocytov na povrchu vaskulárnych EC. E-selektín sa zvyčajne nenachádza v pokojovom endoteli, ale je transkripčne indukovaný zápalovými mediátormi. Je exprimovaný

výlučne na aktivovanom endoteli, preto sa jeho prítomnosť v cirkulujúcej krvi považuje za nezvratný dôkaz aktivácie endotelu (86, 87). P-selektín sa konštitutívne syntetizuje a ukladá v sekrečných granulách, z ktorých sa môže po stimulácii mediátormi zápalu rýchlo premiestniť na povrch bunky (88). Expresia P-selektínu bola tiež preukázaná v poškodenom endoteli aterosklerotického plátu, ale nie v zdravom endoteli, čo naznačuje, že zvýšená expresia P-selektínu sa môže považovať za indikátor ED (89).

Ďalším typickým znakom aktivovaného endotelu je zvýšená proteínová expresia VCAM-1. VCAM-1 je exprimovaný prevažne EC aktivovanými prozápalovými cytokínmi, reaktívnymi formami kyslíku alebo oxidovaným lipoproteínom s nízkou hustotou (90, 91). Jeho zvýšená expresia bola zistená v miestach, kde je typicky prítomná ateroskleróza (92). VCAM-1 je kľúčovým regulátorom adhézie leukocytov a transendotelovej migrácie prostredníctvom interakcie s veľmi neskorým antigénom-4, tiež nazývaným  $\alpha 4\beta 1$ , ktorý sa nachádza na leukocytoch (93).

Napriek tomu, že ICAM-1 je konštitutívne exprimovaný v nízkych hladinách na EC (a iných typoch buniek), aktivácia endotelu zápalovými cytokínmi (TNF $\alpha$ , IL1, interferón gama) a ROS môže viesť k významnému zvýšeniu expresie ICAM-1 (94). Okrem iného sa ICAM-1 nachádza aj v aterosklerotických plakoch, kde sa podieľa na ich progresii (95). Solubilná forma ICAM-1 bola detegovaná v plazme pacientov s kardiovaskulárnym ochorením (cardiovascular disease, CVD) a korelovala aj so závažnosťou ochorenia (96, 97). Z týchto zistení vyplýva, že ICAM-1 aj jeho rozpustná forma môžu byť cennými biomarkermi odrážajúcimi vývoj ED a aterosklerózy (94-97).

### **2.2.3 Úloha endoglínu v endotelovej dysfunkcii**

Ako už bolo v tejto práci spomínané, tak Eng je homodimérny transmembránový glykoproteín, ktorý je exprimovaný v arteriálnych EC (1). Ďalej vieme, že v *in vivo* štúdiách sa Eng podieľa na signalizácii Smad2/3, čo vedie k regulácii expresie a správnej funkcie eNOS v EC a demonštruje vzťah medzi Eng a NO-dependentnou vazodilatáciou. Eng by sa teda mohol považovať za

vazoprotektívnu alebo endotelovú ochrannú molekulu (48, 49). Na druhej strane v *in vitro* štúdiách sa zistilo, že membránový Eng interaguje prostredníctvom RGD peptidu s leukocytovými integrínmi. Bolo dokázané, že by sa Eng mohol podieľať na integrínmi sprostredkovanvej zápalovej infiltrácii leukocytov (7) a adhézii krvných doštičiek na endotel (98).

Ďalšia *in vitro* štúdia ukázala, že plazmatická koncentrácia sEng by mohla slúžiť ako indikátor patológií spojených s diabetes mellitus, ako je hypertenzia, ED či ateroskleróza (59). Na druhej strane bolo ukázané, že aj sEng môže prostredníctvom RGD peptidu interagovať s integrínmi na leukocytoch a teda zohrávať protektívnu úlohu u transendotelovej migrácie leukocytov (7).

#### **2.2.4 Typy endotelových buniek používaných vo výskume kardiovaskulárneho systému**

Vo všeobecnosti rozlišujeme 2 modely buniek a to bunkové línie a primárne bunky (99).

Bunkové línie pozostávajú z kultivovaných buniek odvodených od špecifického darcu (pôvodného tkaniva), ktoré získali schopnosť neobmedzene proliferovať. Zvyčajne však ide o zriedkavý jav, pretože väčšina buniek dokonca aj v nádorovom tkanive prestane proliferovať po obmedzenom počte bunkových delení (100). Takáto bunková línia môže byť opakovane pasážovaná a spoľahlivo sa zotavuje z kryokonzervácie (101, 102). Taktiež sú bunkové línie dobre známymi modelmi na štúdium zdravia a chorôb, najmä rakoviny (100). Výhodou ľudských bunkových línií je, že sa ľahko pestujú v suspenznej kultúre bez séra, rýchlo sa reprodukovujú a majú účinnú produkciu proteínov. Možnou nevýhodou použitia ľudských bunkových línií sú faktory, ako nesprávne identifikované či kontaminované bunkové línie (103). Ďalšou veľkou nevýhodou je, že väčšina bunkových línií je dobre prispôsobená dvojrozmernému kultivačnému prostrediu, v dôsledku čoho sa často geneticky a fenotypovo líšia od svojho tkanivového pôvodu a vykazujú zmenenú morfológiu. Endotelovým bunkovým líniám napríklad chýbajú rôzne funkčné markery, zatiaľ čo primárne endotelové bunky si tieto kritické vlastnosti zachovávajú (104, 105).

Ďalej sa vo výskume kardiovaskulárneho systému používajú primárne ľudské kultúry, ktoré predstavujú bunky izolované zo záujmového orgánu. Ich výhodou na rozdiel od bunkových línií je, že primárne bunky majú normálnu bunkovú morfológiu a zachovávajú si mnoho dôležitých markerov a funkcií (104, 105). Nevýhodou je však to, že primárne EC majú obmedzenú životnosť a v minulosti bola ich dostupnosť obmedzená. V priebehu rokov sa však proces izolácie buniek z rôznych tkanív, ako je pupočná žila, aorta alebo koronárne artérie stal dostupnejším. Aj keď práca s primárnymi bunkami môže byť náročnejšia, tak napriek tomu poskytujú údaje, ktoré lepšie zodpovedajú *in vivo* podmienkam (106).

Kardiovaskulárny systém so svojou hierarchickou a komplexnou architektúrou pozostáva z viacerých typov buniek, ktoré sa spoločne podieľajú na správnej funkcii celého systému. Napríklad efektívna spolupráca kardiomyocytov a nemyocytových buniek je kľúčová pre správnu fyziológiu srdca. V cievach majú EC a bunky hladkého svalstva rôzne úlohy, ale obe sú nevyhnutné pre správnu funkciu ciev. Dysfunkcia čo i len jedného typu buniek môže viesť k rozvoju rôznych patológií (106).

Endotelové bunky ľudskej pupočníkovej žily (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) (Obr.6A) sú jedným z najpoužívanejších typov buniek v kardiovaskulárnom výskume (107). Aj keď tento model nepredstavuje všetky typy EC nachádzajúcich sa v organizme, tak HUVEC sú vynikajúcim modelom na štúdium vlastností vaskulárneho endotelu a hlavných biologických dráh zapojených do funkcie endotelu (108).

Venózne a arteriálne EC však majú odlišný pôvod a vykazujú rôzne molekulárne a funkčné vlastnosti (109). Napríklad, keď Deng a kol. študovali rôznu predispozíciu artérií a žíl k ateroskleróze, zistili, že profil bazálnej génovej expresie buniek zo žíl vykazuje vyššiu ochranu proti ED v porovnaní s bunkami z artérií, čo naznačuje, že arteriálne bunky sú lepším modelom aterosklerózy (110). Preto použitie ľudských aortálnych endotelových buniek (human aortic endothelial cells, HAEC) (Obr.6B) môže byť presnejšie na štúdium chorôb, ako je ateroskleróza, ktorá sa prirodzene v žilách nevyskytuje. HAEC produkujú trombotické a antitrombotické faktory, ako je inhibítor aktivátora plazminogénu 1

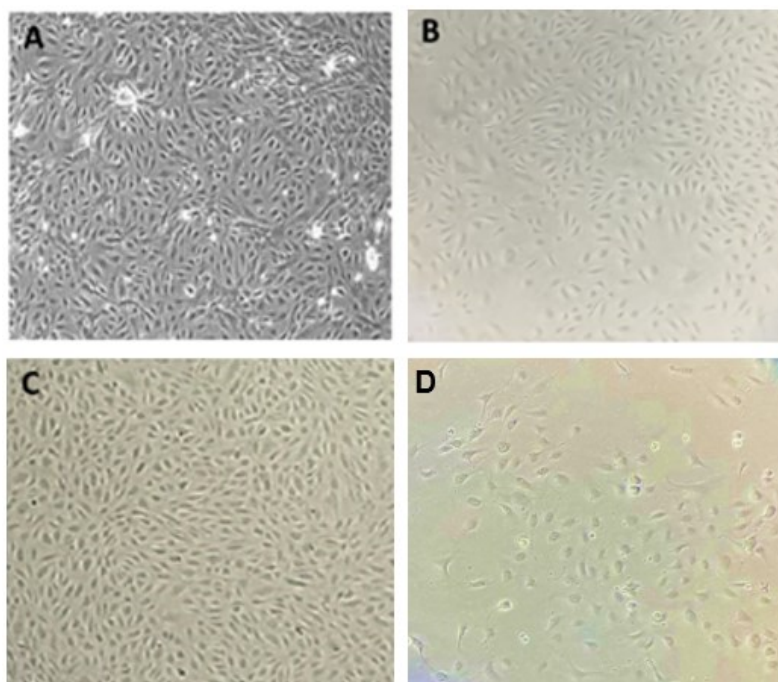
a aktivátor tkanivového plazminogénu a tiež reagujú na stimuláciu TNF $\alpha$  expresiou ICAM-1, zníženou produkciou NO a endotelínu-1 (111).

Ďalšie EC často používané v kardiovaskulárnom výskume sú ľudské mikrovaskulárne endotelové bunky (human microvascular endothelial cells, HMVEC) (Obr.6C). Zvyčajne sú izolované z kože, pľúc alebo srdca. Exprimujú všetky klasické markery EC a tiež vykazujú typickú dlažobnú morfológiu. Tieto bunky sa väčšinou používajú na štúdium angiogenézy, hojenia rán, zápalu a medzibunkovej komunikácie, ale nemajú veľké uplatnenie pri ateroskleróze (112-114).

Ďalším často používaným typom buniek v kardiovaskulárnom výskume sú primárne ľudské endotelové bunky koronárnych artérií (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) (Obr.6D), ktoré sú komerčne dostupné a stávajú sa veľmi populárnymi pri štúdiách angiogenézy (115), migrácie buniek (116) alebo pri štúdiách transportu glukózy (117). Okrem toho sa primárne HCAEC často používajú na skúmanie bariérovej funkcie, pretože exprimujú mnohé proteíny na povrchu buniek (118, 119).



**Obrázok 6: Typy endotelových buniek**



Na obrázkoch sú znázornené typy endotelových buniek používané v kardiovaskulárnom výskume. A) Endotelové bunky ľudskej pupočníkovej žily (HUVEC) (120). B) Ľudské endotelové bunky aorty (HAEC) (autor obrázka: Katarína Tripská (obrázok použitý so súhlasom autora)). C) Ľudské mikrovaskulárne endotelové bunky (HMVEC) izolované z pľúc (121) . D) Ľudské endotelové bunky koronárnych artérií u pacienta s diabetes mellitus (human diabetic coronary artery endothelial cells, DM-HCAEC) v pasáži 6 (obrázok vytvorený autorom).

## 2.3 Diabetes mellitus

### 2.3.1 Definícia a typy

Diabetes mellitus (DM) je skupina chronických metabolických stavov, z ktorých všetky sú charakterizované zvýšenými hladinami glukózy v krvi (hyperglykémiou). Zvýšené hladiny glukózy v krvi sú výsledkom neschopnosti tela produkovať inzulín, rezistencie voči pôsobeniu inzulínu alebo ich kombinácie. Túto skupinu stavov možno rozdeliť do 4 klinicky odlišných typov: diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, gestačný diabetes a tzv. „iné špecifické

typy“ (122). Medzi príznaky výraznej hyperglykémie patrí nadmerné močenie, nadmerný smäd, strata hmotnosti, rozmazané videnie a niekedy zvýšená chuť do jedla (Obr.7). Chronickú hyperglykémiu môže sprevádzať aj zhoršenie rastu a náchylnosť na určité infekcie. Medzi akútne, život ohrozujúce následky nekontrolovaného diabetu patria hyperglykémia s ketoacidózou alebo neketotický hyperosmolárny syndróm (12).

**Obrázok 7: Klinické príznaky diabetes mellitus**

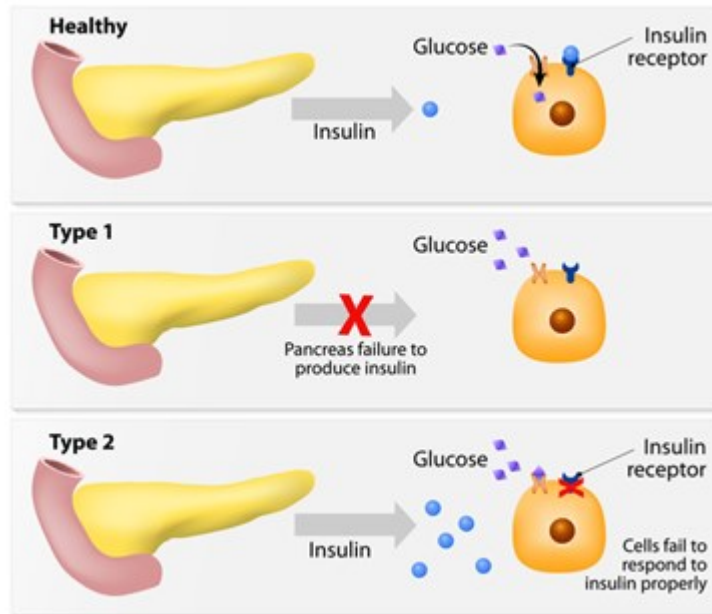


*Medzi klinické príznaky u pacienta s diabetes mellitus patria napríklad polydipsia (nadmerný smäd), polyúria (nadmerné močenie), únava, strata hmotnosti, rozmazané videnie či polyfágia (nadmerná chuť do jedla) (obrázok vytvorený autorom).*

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) (predtým nazývaný „inzulín-dependentný diabetes mellitus“) je charakterizovaný deštrukciou beta buniek v pankrease spôsobenou autoimunitným procesom, ktorý zvyčajne vedie k absolútnemu nedostatku inzulínu. Nástup je väčšinou akútny, vyvíja sa v priebehu niekoľkých dní až týždňov. U viac ako 95 percent osôb s DM1 sa toto ochorenie rozvinie pred dosiahnutím veku 25 rokov, pričom výskyt je rovnaký u oboch pohlaví so zvýšenou prevalenciou v bielej populácii (Obr.8) (123, 124).

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) (predtým nazývaný „non-inzulín-dependentný diabetes mellitus“) je charakterizovaný inzulínovou rezistenciou v periférnom tkanive a defektom sekrécie inzulínu beta bunkami. DM2 je najbežnejšia forma DM a je vysoko spojená s rodinnou anamnézou DM, vyšším vekom, obezitou a nedostatkom pohybu. Vyskytuje sa častejšie u žien, najmä u žien s tehotenským DM v anamnéze a tiež u černochoch, Hispáncov a u domorodých Američanov. Inzulínová rezistencia a hyperinzulinémia nakoniec vedú k poruche glukózovej tolerancie. Defektné beta bunky sa vyčerpajú, čo ďalej podporuje cyklus glukózovej intolerancie a hyperglykémie. Etiológia DM2 je multifaktoriálna a čiastočne geneticky založená (Obr.8) (123, 124).

**Obrázok 8: Zdravý pankreas verzus pankreas u pacientov s DM1 a DM2**



U zdravého pacienta je hladina glukózy v krvi regulovaná inzulínom a ďalšími hormónmi. U pacientov trpiacich na DM1 dochádza k deštrukcii beta buniek v pankrease, čo zvyčajne vedie k absolútnemu nedostatku inzulínu. To znamená, že glukóza sa nemôže dostať do buniek a hromadí sa v krvi. U pacientov trpiacich na DM2 dochádza k poruche citlivosti buniek na inzulín (inzulínová rezistencia), pretože bunky prestanú reagovať na jeho účinok. Nedostatočná funkcia inzulínu spôsobuje poruchu transportu glukózy z krvi do bunky, čo vedie k hyperglykémii a tiež k nedostatku glukózy v bunke.

Prevzaté z: Type 2 diabetes (125)

Ďalším menej častým typom je gestačný diabetes, čo je forma glukózovej intolerancie, ktorá postihuje niektoré ženy počas tehotenstva (122).

Ostatné typy diabetes mellitus rôznych etiológií tvoria skupinu nazývanú „iné špecifické typy“. Do tejto skupiny patria osoby s genetickými poruchami funkcie beta-buniek (tento typ sa predtým nazýval MODY) alebo s poruchami účinku inzulínu. Patria tu aj osoby s ochoreniami exokrinného pankreasu, ako je pankreatitída alebo cystická fibróza, ďalej osoby s dysfunkciou spojenou s inými

endokrinopatiami (napr. akromegália) a osoby s dysfunkciou pankreasu spôsobenou liekmi, chemikáliami alebo infekciami (123, 124).

DM môže byť diagnostikovaný 4 spôsobmi na základe príslušných hodnôt. Prvý spôsob diagnostiky DM je na základe hodnoty glukózy v plazme nalačno, ktorej hodnota je  $\geq 7,0$  mmol/l. Pred týmto vyšetrením je nutné dodržať nulový kalorický príjem aspoň 8 hodín. Druhý spôsob diagnostiky DM je pomocou hodnoty glukózy v plazme za 2 hodiny po prijme glukózy, počas perorálneho glukózového tolerančného testu, ktorej hodnota je  $\geq 11,1$  mmol/l. Tretí spôsob je pomocou kritérií glykovaného hemoglobínu. DM je diagnostikovaný pokiaľ hodnota glukózy v plazme pomocou tohto kritéria je  $\geq 48$  mmol/mol. Diagnostika u pacientov s klasickými príznakmi hyperglykémie alebo hyperglykemickej krízy sa robí pomocou náhodnej hladiny glukózy v plazme  $\geq 11,1$  mmol/l. Uprednostňovaným diagnostickým testom je meranie hladiny glukózy v plazme nalačno, ale možno použiť akúkoľvek kombináciu dvoch abnormálnych výsledkov testu (126).

DM môže postihnúť mnoho rôznych orgánových systémov v tele a časom môže viesť k závažným komplikáciám. Komplikácie možno klasifikovať ako mikrovaskulárne alebo makrovaskulárne. Mikrovaskulárne komplikácie zahŕňajú poškodenie nervového systému (neuropatia), poškodenie obličiek (nefropatia) a poškodenie oka (retinopatia) (11). Makrovaskulárne komplikácie zahŕňajú kardiovaskulárne ochorenia, mozgovú príhodu a periférne cievne ochorenia. Ochorenie periférnych ciev môže viesť k neliečiteľným modrinám alebo zraneniam, gangréne a v konečnom dôsledku k amputácii (127).

### **2.3.2 Úloha endoglínu u diabetu mellitu**

Hyperglykémia je jedným zo symptómov súvisiacich s metabolickým syndrómom a je charakteristickým znakom DM. Aj keď úloha Eng pri hyperglykémii a DM nie je široko preskúmaná, niektoré štúdie sa pokúšali popísať možný vzťah medzi nimi (128).

Alvarez-Munoz a kol. sledovali expresiu membránového Eng v kultivovaných kožných fibroblastoch u pacientov s DM1 s diabetickou nefropatiou

a bez nej. Ukázali, že expresia Eng bola zvýšená u pacientov s DM1 s nižším rizikom nefropatie v porovnaní s pacientmi s vyšším rizikom nefropatie, čo naznačuje ochrannú úlohu Eng pri rozvoji diabetickej nefropatie (128).

Ďalšia štúdia preukázala, že bunky HUVEC stimulované konštantnou alebo oscilujúcou vysokou hladinou glukózy (25 mmol/l) viedli k zvýšenej mRNA expresii Eng (129), čo bolo následne potvrdené aj na bunkách HAEC (130).

Existuje tiež niekoľko štúdií o úlohe sEng počas DM. Zistilo sa, že sEng je zvýšený u pacientov s pokročilým DM a jeho koncentrácia koreluje so závažnosťou diabetickej nefropatie (63, 131), diabetickej retinopatie (59) a diabetickej neuropatie (61). Ďalšia štúdia ukázala, že hyperglykémia aj hypoglykémia u pacientov s DM boli schopné zvýšiť hladiny sEng a autori naznačili, že toto zvýšenie súvisí s oxidačným stresom, ktorý sa vyvíja pri týchto stavoch (132). Okrem toho Cawyer a kol. preukázali, že vysoké hladiny glukózy tiež významne zvýšili hladiny sEng (133).

## **2.4 Dapagliflozín**

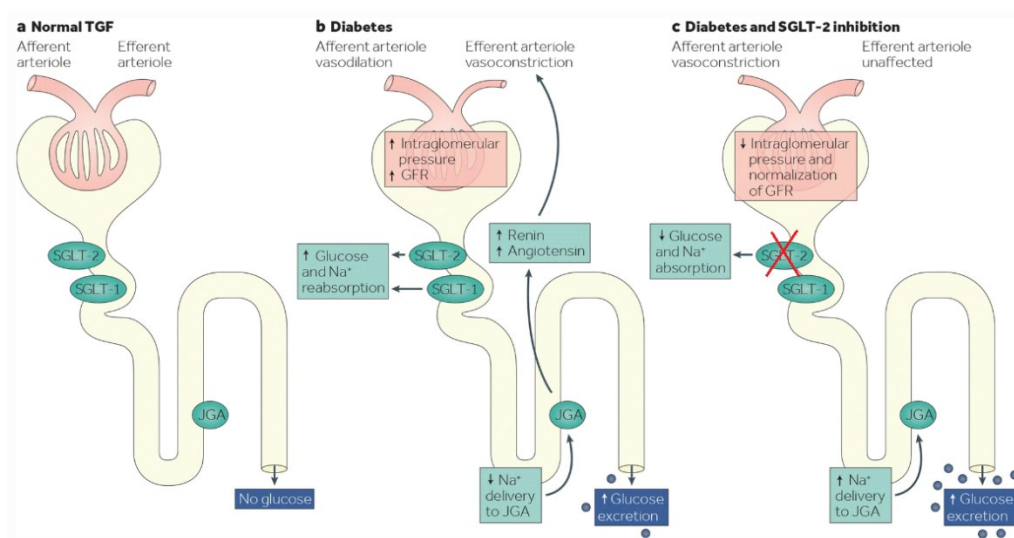
Liečivo dapagliflozín je vysoko účinný (inhibičná konštanta 0,55 nmol/l) reverzibilný inhibítor sodno-glukózového kotransportéra-2 (sodium-glucose cotransporter-2, SGLT-2), ktorý patrí medzi hlavné transportéry zodpovedné za absorpciu glukózy (13).

Dapagliflozín sa po perorálnom podaní rýchlo absorbuje, pričom vo všeobecnosti dosahuje maximálne plazmatické koncentrácie do 2 hodín po podaní nalačno. Podáva sa v dávke 10 mg 1x denne, a po tejto dávke je jeho absolútna perorálna biologická dostupnosť 78 %. Dapagliflozín je z veľkej časti metabolizovaný glukuronyltransferázou (enzým v pečeni a obličkách) na svoj hlavný neaktívny metabolit 3-O-glukuronid. Metabolity dapagliflozínu neprispievajú k jeho účinkom na zníženie glukózy (134, 135). Dapagliflozín a jeho metabolity sa z veľkej časti vylučujú močom (75 %) a z menšej časti tiež stolicou (21 %) (134). Po jednorazovej dávke dapagliflozínu 10 mg u zdravých jedincov bol priemerný plazmatický eliminačný polčas dapagliflozínu 12,9 h (135).

### **2.4.1 Mechanizmus účinku**

Inhibítory SGLT-2 sú relatívne novou triedou antidiabetík používaných predovšetkým na liečbu DM2 (14-16). Tieto liečivá znižujú reabsorpciu glukózy v obličkách a podporujú jej vylučovanie močom inhibíciou vysokokapacitného glukózového transportéra SGLT-2 umiestneného v proximálnom stočenom tubule, čím znižujú hladinu glukózy nezávisle od pôsobenia inzulínu (Obr.9) (14, 15). Tento jedinečný mechanizmus účinku inhibítorov SGLT-2 dopĺňa mechanizmus iných tried antidiabetík, čo umožňuje ich použitie v kombinovanej terapii s inými liečivami na DM, vrátane inzulínu (136).

## Obrázok 9: Porovnanie glukózovej homeostázy v obličkách



Na obrázku a) je znázornená glukózová homeostáza v obličkách u jedincov bez diabetu, u ktorých je glukóza (spolu s Na<sup>+</sup>) reabsorbovaná pomocou SGLT-2 a SGLT-1 a TGF je zachovaná. Obrázok b) znázorňuje pacientov s DM, u ktorých je reabsorpcia glukózy zvýšená (spolu s Na<sup>+</sup>) prostredníctvom SGLT-2 a SGLT-1. Následne potom dochádza k zníženému dodaniu Na<sup>+</sup> do JGA, čo spôsobí aktiváciu systému renín-angiotenzín-aldosterón. U týchto pacientov je tiež zvýšená rýchlosť glomerulárnej filtrácie a zvýšený intraglomerulárny tlak. Obrázok c) znázorňuje pacientov s DM, ktorí sú liečení inhibítorom SGLT-2. U týchto pacientov je podaním SGLT-2 inhibítora znížená reabsorpcia glukózy a Na<sup>+</sup> (čím sa zvyšuje jeho dodanie do JGA) a dochádza k zvýšenému vylučovaniu glukózy močom. U týchto pacientov sa po podaní inhibítora SGLT-2 normalizuje rýchlosť glomerulárnej filtrácie a intraglomerulárny tlak sa znižuje.

GFR - rýchlosť glomerulárnej filtrácie, JGA - juxtaglomerulárny aparát, Na<sup>+</sup> - sodík, SGLT 1 alebo 2 - sodno-glukózový kotransportér typu 1 alebo 2, DM2 - diabetes typu 2, TGF - tubuloglomerulárna spätná väzba.

Prevzaté z : *The Pleiotropic Effects of Sodium–Glucose Cotransporter-2 Inhibitors: Beyond the Glycemic Benefit* (137)



### 2.4.2 Nežiadúce účinky

Najčastejším hlavným nežiadúcim účinkom inhibície SGLT-2 je to, že dochádza k zvýšeniu hladín glukózy v moči, čo môže viesť k infekciám močových ciest a pohlavných orgánov, zvýšenej frekvencii močenia a nerovnováhe elektrolytov. U väčšiny pacientov liečených inhibítormi SGLT-2 sa tiež vyskytlo mierne zníženie krvného tlaku (čo môže byť prospešné u pacientov s hypertenziou) a mierny vplyv na profil lipidov v sére (138). Predpokladá sa, že časť ich účinku na zníženie krvného tlaku je spôsobená osmotickou diurézou (139). U niektorých pacientov však môžu inhibítory SGLT-2 príliš znížiť krvný tlak, čo môže viesť k hypotenziám (hlavne posturálnej), závratom a dehydratáciám. Účinky vzhľadom na lipidový profil môžu byť prospešné (zvýšené lipoproteíny s vysokou hustotou a znížené triacylglyceroly) alebo škodlivé (zvýšené hladiny lipoproteínov s nízkou hustotou) (138).

### 2.4.3 Klinické použitie

Inhibítory SGLT-2 sú novšou triedou látok znižujúcich hladinu glukózy a ich používanie vedie ku glykozúrii a zníženiu postprandiálnej glykémie u pacientov s DM2. V konečnom dôsledku môže ich užívanie viesť k zníženiu hospitalizácií a spomaleniu diabetickej nefropatie u pacientov s DM2, bez ohľadu na prítomnosť predchádzajúceho kardiovaskulárneho alebo renálneho ochorenia (140, 141). Popri pozitívnych účinkoch na hladinu glukózy boli popísané aj ďalšie pleiotropné účinky týchto liekov. Ukázalo sa, že inhibítory SGLT-2 majú kardiovaskulárny prínos vrátane zníženia krvného tlaku a zníženia plazmatickej hladiny kyseliny močovej, čo môže prispievať k ich renálnym protektívnym účinkom. Okrem toho majú inhibítory SGLT-2 tiež priaznivé účinky na zníženie aktivácie systému renín-angiotenzín-aldosterón, plazmatického objemu a zápalu (142-144). Medzi prínosy patrí tiež zlepšenie renálnej funkcie, lipidového profilu, steatózy pečene a štruktúry srdca (145-147). Vo väčšine klinických štúdií sa dapagliflozín tiež spájal s miernym znížením telesnej hmotnosti (približne 2–3 kg počas 12–24 týždňov liečby). Tieto účinky sú prospešné na prevenciu alebo redukciu makro- a mikrovaskulárnych komplikácií a môžu byť obzvlášť prospešné u pacientov s komplikáciami DM alebo s rizikom komplikácií DM, ako je CVD,

srdcové zlyhanie (heart failure, HF) alebo chronická choroba obličiek (chronic kidney disease, CKD) (137).

Dapagliflozín sa okrem liečby DM2 používa aj pri HF a CKD. V posledných rokoch sa objavilo niekoľko štúdií, ktoré preukázali významný prínos inhibítorov SGLT-2 v týchto indikáciách. Tieto zistenia viedli k prehodnoteniu stratégie liečby DM2, pričom odborné spoločnosti odporúčajú zaradiť SGLT-2 inhibítory tiež u pacientov s preukázaným CVD, HF alebo CDK (148-150). Predpokladá sa, že jedným z kľúčových mechanizmov pozorovaných kardiovaskulárnych prínosov inhibítorov SGLT-2 je zníženie srdcovej záťaže prostredníctvom zvýšenej osmotickej diurézy a zníženia preloadu, zatiaľ čo sa predpokladá, že zníženie krvného tlaku a zmeny vaskulárnej funkcie znižujú afterload (151). V týchto štúdiách boli inhibítory SGLT-2 spojené so významným znížením rizika progresie ochorenia obličiek v porovnaní s placebom u pacientov s DM2 a preukázaným CVD. Mechanizmy, ktoré sú základom zlepšených renálnych výsledkov sú pravdepodobne multifaktoriálne a potenciálne spojené s ich priamymi hemodynamickými a renovaskulárnymi účinkami (143, 152). Zmeny renálnej hemodynamiky spojené s inhibítormi SGLT-2 vedú k akútnemu zníženiu odhadovanej glomerulárnej filtrácie a albuminúrie a nie sú pozorované pri iných triedach liečiv na zníženie glukózy (153).

## **2.5 Metódy používané na detekciu endoglínu**

### **2.5.1 Prietoková cytometria – základné princípy**

Prietoková cytometria (flow cytometry, FC) je metóda, ktorá rýchlo analyzuje jednotlivé bunky alebo častice vo chvíli, keď prechádzajú cez jeden alebo viacero laserov, zatiaľ čo sú suspendované v pufovanom roztoku na báze soli. Pri tejto metóde sa meria rozptyl viditeľného svetla, ktoré dopadá na jednotlivé častice. Tým sa získavajú informácie o ich veľkosti a tvare. Rozptyl viditeľného svetla sa meria v dvoch rôznych smeroch, v smere dopredu (Forward Scatter, FSC), ktorý môže indikovať relatívnu veľkosť bunky, a pri 90° (Side Scatter, SSC), ktorý indikuje vnútornú zložitosť alebo granularitu bunky (Obr.10). Pomocou FC môžeme merať aj fluorescenciu. Vzorky na meranie fluorescencie

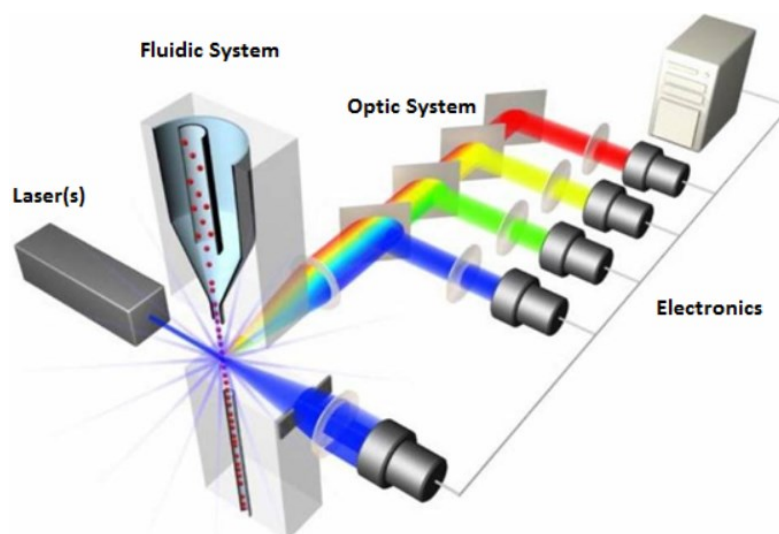
sa môžu pripravovať napríklad tak, že sa proteíny na bunkách označia protilátkami (154).

FC sa uplatňuje vo viacerých disciplínach ako je imunológia, virológia, molekulárna biológia či monitorovanie infekčných chorôb (154).

Prietokové cytometre sú zariadenia, ktoré sa skladajú z troch hlavných častí: fluidiky, optiky a elektroniky (Obr.10). Fluidika je zodpovedná za prepravu a zaostrenie vzorky v nosnej kvapaline (zvyčajne pufrovanom fyziologickom roztoku) do bodu, kde je ožiarená laserom. Aby meracím bodom prešla práve jedna častica je zaistené pomocou hydrodynamického zaostrenia. Hydrodynamické zaostrenie je metóda, ktorá umožňuje zúžiť prúd vzorky v prietokovej cytometrii. Vzorka je vstreknutá do „lievika“, ktorým prúdi nosná kvapalina pod vysokým tlakom. Tým sa dosiahne, že vzorka sa sústreďuje do úzkeho prúdu v strede lievika. Optika sa skladá z laserov, ktoré excitujú vzorku, a zbernej optiky (elektrónky fotonásobiča alebo fotonásobiace trubice a fotodiódy), ktoré zachytávajú viditeľné a fluorescenčné svetlo emitované vzorkou. Najbežnejšie lasery používané v tradičných prietokových cytometroch sú 488 nm (modrý), 405 nm (fialový), 561 nm (zeleno-žltý), 640 nm (červený) a 355 nm (ultrafialový). Okrem toho sa v FC používajú aj dichroické filtre, ktoré smerujú fluorescenčné svetlo na pásmové filtre, ktoré prepúšťajú len určité vlnové dĺžky svetla, ktoré potom dopadnú na detektory. Elektronika spracováva tieto svetelné signály a poskytuje informácie o vlastnostiach vzorky (154).

Po zmeraní vzoriek nasleduje analýza. Vyhodnotenie výsledkov získaných pomocou FC pozostáva z vytvorenia oblasti okolo populácie cieľových buniek (gating) a aplikácie iných parametrov na túto oblasť. To umožňuje vybrať špecifické skupiny buniek na ďalšiu analýzu vybraných markerov (154).

**Obrázok 10: Znáznornenie prietokovej cytometrie**



*Prietokový cytometer pozostáva z troch základných komponentov: fluidný systém, optika (ktorej súčasťou sú lasery) a elektronika.*

*Prevzaté z : Flow Cytometry - A Survey and the Basics (155)*

### **2.5.2 Adhézia monocytov k endotelovým bunkám**

Jedným z možných spôsobov, ako detegovať aktiváciu endotelu je meranie adhémie monocytov. Adhémia je proces, pri ktorom monocyty priľnú k endotelu. Tento proces je ovplyvnený zápalovými cytokínmi a oxidačným stresom, ktoré zvyšujú expresiu adhézných molekúl na povrchu endotelu. Princíp merania adhémie monocytov k EC pomocou FC spočíva v tom, že sa monocyty označia pomocou roztoku na značenie buniek. Potom sa tieto označené monocyty pridajú k EC a inkubujú sa. Po určitom čase sa odstránia neprilnuté monocyty. Zmes EC a prilnutých monocytov sa spracuje a zmeria pomocou prietokového cytometra. Tam môžeme na základe fluorescencie rozdeliť zmes buniek na EC a monocyty a následne kvantifikovať počet prilnutých monocytov. Týmto spôsobom sa dá zistiť stupeň adhémie monocytov k EC v závislosti od rôznych faktorov (156, 157).

### 2.5.3 ELISA – základné princípy

Enzýmovo značený imunisorbentný test (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) je citlivá a špecifická imunologická metóda, ktorá využíva špecifickú väzbu antigénu a protilátky na detekciu prítomnosti určitých molekúl vo vzorke vrátane protilátok, antigénov, proteínov, glykoproteínov a hormónov. Detekcia týchto produktov sa uskutočňuje komplexovaním protilátok a antigénov, aby sa dosiahol merateľný výsledok. Protilátka je typ proteínu produkovaného imunitným systémom jednotlivca a obsahuje špecifické oblasti, na ktoré sa viažu antigény. Antigen je látka, ktorá vyvoláva tvorbu protilátok a imunitnú odpoveď. Môže byť z vonkajšieho alebo vnútorného prostredia a keď sa naviaže na špecifickú časť protilátky (epitop), spustí reakciu imunitného systému. Táto interakcia sa využíva pri testovaní ELISA a umožňuje identifikovať špecifické protilátky a antigény len s malým množstvom testovanej vzorky (158-161).

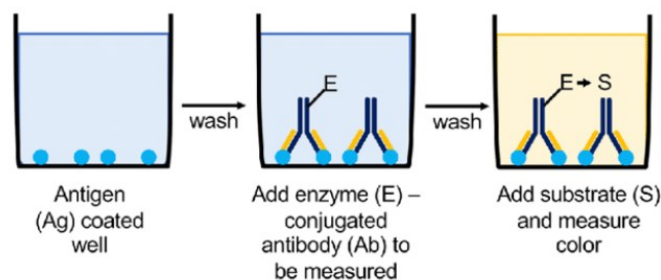
Testy ELISA sa uskutočňujú na polystyrénových platniach, typicky v 96-jamkových platniach potiahnutých tak, aby veľmi silne viazali proteín. V závislosti od typu ELISA testovanie vyžaduje záchytnú protilátku/antigén, primárnu a/alebo sekundárnu detekčnú protilátku, analyt/antigén, tlmivý roztok, premývací roztok a substrát/chromogén. Detekčná protilátka je špecifická protilátka, ktorá sa viaže iba na požadovaný antigén, zatiaľ čo sekundárna protilátka je konjugovaná s enzýmom a viaže sa na detekčnú protilátku. Detekcia sa vykonáva pridaním substrátu. Enzým potom reaguje so substrátom a vytvára farebný signál. Intenzita signálu je úmerná množstvu antigénu vo vzorke. Jedným z najčastejšie používaných enzýmov je chrenová peroxidáza (horseradish peroxidase, HRP), ktorá katalyzuje oxidáciu rôznych substrátov za prítomnosti peroxidu vodíka. Výsledkom tejto reakcie je zmena na modrú farbu (159-161).

Na stanovenie koncentrácie antigénu vo vzorke je potrebné vytvoriť kalibračnú krivku pomocou rôznych riedení štandardu so známou koncentráciou. Z grafu kalibračnej krivky sa potom určí koncentrácia antigénu na základe jej absorbancie. Absorbancia je miera, akou vzorka pohlcuje svetlo. Čím tmavšia je farba vzorky, tým viac svetla sa pohltí. Meria sa spektrofotometrom a závisí od koncentrácie antigénu alebo protilátky vo vzorke (159-161).

Existuje niekoľko spôsobov, ako vykonať ELISA na detekciu antigénov alebo protilátok v biologických vzorkách. Medzi najbežnejšie patria: priama ELISA, nepriama ELISA, sendvičová ELISA a kompetitívna ELISA (162).

Pri priamej ELISA sa antigén priamo naviaže na povrch doštičky a potom sa k nemu pripojí protilátka označená enzýmom alebo fluoroforom. Medzi výhody použitia priamej ELISA patrí eliminácia krížovej reaktivity sekundárnych protilátok a vďaka menšiemu počtu krokov je rýchlejšia v porovnaní s nepriamou ELISA. Medzi jej nevýhody patrí nízka citlivosť v porovnaní s inými typmi ELISA a vysoká cena reakcie (Obr.11) (159, 160, 163).

**Obrázok 11: Priama ELISA**



*Antigén sa naviaže na povrch jamky a následne sa jamka premyje. Pridá sa protilátka konjugovaná s enzýmom a doska sa znova premyje. Na záver sa pridá substrát a dochádza k zmene farby.*

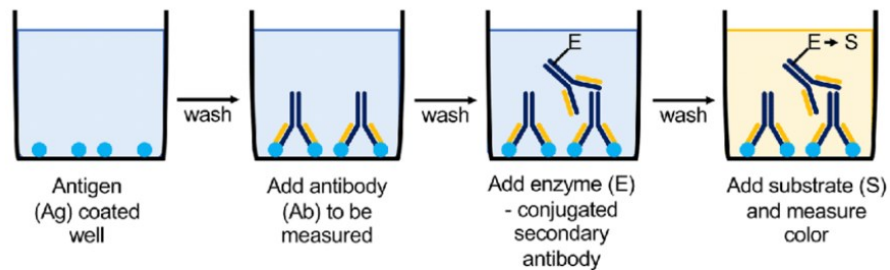
*Ag – antigén, Ab – protilátka, E – enzým, S – substrát*

*Prevzaté z : Review: immunoassays in DNA damage and instability detection (164)*

Pri nepriamej ELISA sa antigén tiež naviaže na povrch doštičky, ale potom sa k nemu pripojí primárna protilátka a následne sekundárna protilátka označená enzýmom alebo fluoroforom. V porovnaní s priamou ELISA má táto metóda vyššiu citlivosť. Je tiež menej nákladná a flexibilnejšia vďaka veľkému množstvu primárnych protilátok, ktoré je možné kombinovať. Nevýhodou tohto typu ELISA

je riziko skríženej reaktivity medzi sekundárnymi detekčnými protilátkami (Obr.12) (159, 160, 165).

**Obrázok 12: Nepriama ELISA**



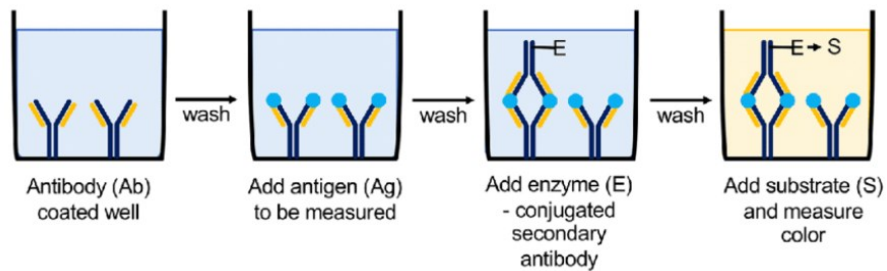
*Antigén sa naviaže na povrch jamky a následne sa jamka premyje. Potom sa pridá primárna protilátka a doska sa znova premyje. Následne sa pridá sekundárna protilátka konjugovaná s enzýmom a doska sa premyje. Na záver sa pridá substrát a dochádza k zmene farby.*

*Ag - antigén, Ab - protilátka, E - enzým, S – substrát*

*Prevzaté z : Review: immunoassays in DNA damage and instability detection (164)*

Pri sendvičovej ELISA sa doštička pokryje protilátkou špecifickou pre antigén, potom sa k nej pridá antigén a nakoniec sa pridá detekčná protilátka označená enzýmom alebo fluoroforom. Táto metóda sa nazýva ako „sendvičová“, pretože antigén je vložený medzi dve protilátky (záchytnú a detekčnú). Spomedzi všetkých typov ELISA má najvyššiu citlivosť, ale vyžaduje dve protilátky, ktoré sa viažu na rôzne epitopy v danom antigéne. Hlavnými nevýhodami tohto typu ELISA sú čas a náklady (Obr.13) (159, 160, 166).

### Obrázok 13: Sendvičová ELISA



*Jamka sa potiahne záchytnou protilátkou a následne sa premyje. Potom sa pridá antigén a znova sa doska premyje. Následne sa pridá sekundárna protilátka (detekčná) konjugovaná s enzýmom a doska sa premyje. Na záver sa pridá substrát a dochádza k zmene farby.*

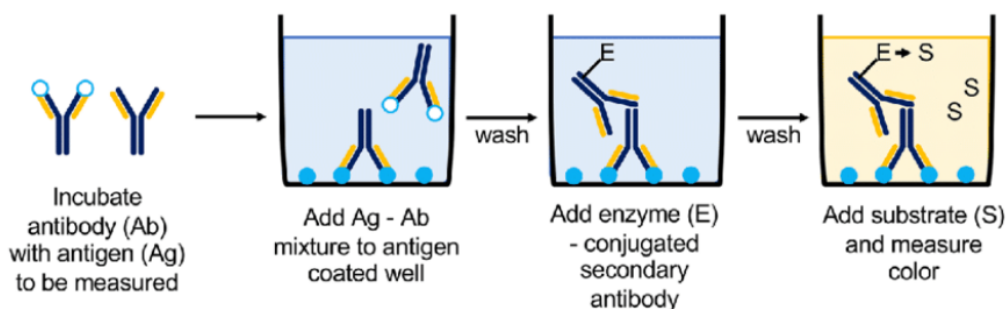
*Ag - antigén, Ab - protilátka, E - enzým, S – substrát*

*Prevzaté z : Review: immunoassays in DNA damage and instability detection (164)*

Kompetitívna ELISA testuje prítomnosť protilátky (špecifickej pre antigény) a antigénov v testovacom sére. Jedna z modifikácií tohto typu testu ELISA môže využívať dve špecifické protilátky proti rovnakému antigénu, protilátku konjugovanú s enzýmom a ďalšiu protilátku prítomnú v testovacom sére (ak je sérum pozitívne). Spojenie dvoch protilátok do jamiek umožní kompetíciu o väzbu na antigén. Prítomnosť zmeny farby znamená, že test je negatívny, pretože protilátka konjugovaná s enzýmom naviazala antigény (nie protilátky testovacieho séra). Neprítomnosť farby indikuje pozitívny test na prítomnosť protilátok v testovacom sére. Táto metóda má niekoľko výhod: nevyžaduje zložité prípravy vzorky, dokáže detegovať rôzne antigény v jednej vzorke, je vhodná aj pre malé antigény a poskytuje konzistentné výsledky. Medzi nevýhody kompetitívnej ELISA patrí nízka špecificita a tiež to, že nemôže byť použitá v zriedených vzorkách (Obr.14) (159, 163).



**Obrázok 14: Kompetitívna ELISA**



*Najprv sa protilátka inkubuje spolu s antigénom. Potom sa do jamky pridá zmes protilátky, ktorá naviazala antigén a protilátky bez antigénu a doska sa premyje. Následne sa pridá sekundárna protilátka konjugovaná s enzýmom a doska sa premyje. Na záver sa pridá substrát. Prítomnosť zmeny farby znamená, že test je negatívny na prítomnosť protilátok.*

*Ag - antigén, Ab - protilátka, E - enzým, S – substrát*

*Prevzaté z : Review: immunoassays in DNA damage and instability detection (164)*

Testy ELISA možno použiť na mnoho účelov vrátane rýchlych skriningových testov protilátok na vírus ľudskej imunodeficiencie, detekcie iných vírusov, baktérií, hubových autoimunitných ochorení, potravinových alergénov, krvnej skupiny, prítomnosti tehotenského hormónu hCG, laboratórneho a klinického výskumu, forenznú toxikológiu a mnohé ďalšie diagnostické nastavenia (167, 168).

### **3 ZADANIE - CIEĽ PRÁCE**

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, ako dapagliflozín vplýva na expresiu a funkciu endoglínu a s ním súvisiacich biomarkerov endotelovej dysfunkcie ako sú ICAM-1 a VCAM-1, v rôznych časoch a koncentráciách u ľudských diabetických koronárnych endotelových buniek.

## **4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **4.1 DM-HCAEC**

V tejto experimentálnej práci sme používali ľudské diabetické koronárne endotelové bunky (DM-HCAEC), ktoré boli zakúpené od firmy Lonza (katalógové číslo CC-2922).

Pre ich rast a výživu sme používali médium, ktoré slúži pre bunky ako zdroj živín a poskytuje im optimálne prostredie.

S bunkami sme pracovali vždy v laminárnom boxe, aby sme sa vyhli kontaminácií. Laminárny box sme vždy po práci s bunkami dôkladne vyčistili etanolom. V prípade, že sme s bunkami nepracovali, tak boli preložené do inkubátora. Ten udržiava optimálne podmienky pre rast buniek, a to 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### **4.2 THP-1 MONOCYTY**

Monocyty sú typom bielych krviniek, ktoré sa tvoria v kostnej dreni a cirkulujú v krvi. Keď sa v tele objaví infekcia alebo poškodenie tkaniva, monocyty sú priťahované k miestu zápalu chemickými signálmi. Monocyty potom prilnú k EC, pomocou špeciálnych molekúl na ich povrchu, ako sú selektíny, integríny a fagocytárne receptory. Tieto molekuly umožňujú monocytovú adhéziu a migráciu cez endotelovú vrstvu do zápalového tkaniva. Tam sa monocyty diferencujú na makrofágy alebo dendritické bunky, ktoré majú schopnosť fagocytovať baktérie a produkovať rôzne mediátory imunitnej odpovede, ako je napríklad interferón. Adhézia monocytov k endotelovým bunkám je teda nevyhnutným krokom v obrane organizmu proti patogénom a oprave poškodených tkanív (169, 170).

V tejto diplomovej práci sme sa v krátkosti zaoberali aj monocytmi a ich adhéziou na EC. Konkrétne sme používali THP-1 monocyty poskytnuté od S. Čejkovej (IKEM, Praha, Česká republika).

THP-1 je bunková línia ľudských monocytov získaná z pacienta s akútnou monocytovou leukémiou. Táto bunková línia sa často využíva na skúmanie funkcií monocytov/makrofágov, mechanizmov, signálnych dráh a transportu živín a liečiv. Okrem toho je tiež bežným modelom na odhad modulácie aktivít monocytov a makrofágov (171). Vo všeobecnosti sa bunky THP-1 morfológicky aj funkčne podobajú primárnym bunkám, vrátane markerov ich diferenciácie (172).

### **4.3 Príprava vzoriek**

Pre každý náš experiment sme si museli najprv vzorky pripraviť. Do tejto prípravy bolo zahrnuté rozmrazovanie, pasážovanie a premedikácia buniek. Bunky sme si najprv rozmrazili v deň 0. Následne sme ich pasážovali v deň 3 a premedikovali v deň 7. Vlastný experiment bol vo väčšine prípadov druhý deň po premedikácií, čiže v deň 8 (s výnimkou experimentu po 6 hodinách).

#### **4.3.1 Rozmrazovanie buniek**

Najprv sme si pripravili želatínu, ktorá je potrebná na potiahnutie nádoby, v ktorej potom rastú bunky. Okrem toho sme si dali nahriať médium do vodného kúpeľa na 20 minút.

##### **Príprava želatíny:**

1. Do kadičky sme dali 76ml fosfátového tlmivého roztoku (phosphate buffered saline, PBS) a 4ml 2% želatíny tak, aby výsledná koncentrácia želatíny bola 0,1%.
2. Túto zmes sme natiahli do 20ml injekčnej striekačky a nasadili na ňu 0,22 $\mu$ m filter.
3. Následne sme zmes prefiltrovali do fľaše.

##### **Zloženie HCAEC média:**

- 200 ml základného média pre rast endotelových buniek

- 22 ml fetálneho hovädzieho séra (fetal bovine serum, FBS)
- 800 µl fibroblastového rastového faktora
- 80 µl hydrokortizónu
- 200 µl cievneho endotelového rastového faktora (vascular endothelial growth factor, VEGF)
- 200 µl rekombinantného rastového faktora podobného inzulínu
- 200 µl kyseliny askorbovej
- 200 µl ľudského epidermálneho rastového faktora
- 200 µl gentamicin sulfát - amfotericinu

### **Postup rozmrazovania buniek:**

1. Vzali sme si dve Petriho misky a potiahli ich pripravenou želatínou. To sme urobili tak, že sme si do každej misky napipetovali 1,5ml želatíny a potom sme ju rozprestierali po celej miske pokývaním a tiež jemným poklepaním o dlaň. Potom sme misky vložili do inkubátora na 20 minút.
2. Po 20 minútach sme Petriho misky vybrali a odsali z nich prebytočnú želatínu pomocou odsávačky v laminárnom boxe.
3. Následne sme pridali 8ml nahriateho média do každej misky a išli sme pre bunky do mrazničky (-80°C). Vialky s bunkami boli v pasáži P-4.
4. Z mrazničky sme doniesli dve vialky buniek, ktoré sme rozmrazili vo vodnom kúpeli tak, aby v kryoskúmavkách zostala malá guľička ľadu.
5. Obsah kryoskúmaviek sme preniesli pomocou pipety do Petriho misiek.
6. Petriho misky sme si popísali názvom buniek, dátumom rozmrazenia, podpisom a pasážou (P-5) a následne vložili do inkubátora. Tento deň sme si označili ako deň 0.

### **4.3.2 Pasážovanie buniek**

Pasážovanie buniek je technika, ktorá umožňuje udržiavať a množiť bunkové kultúry pri laboratórnych podmienkach. Pasážovanie buniek spočíva v tom, že sa bunky z jednej kultivačnej nádoby prenesú do inej, kde majú viac

priestoru a živín na rast a delenie. Pasážovanie buniek sa vykonáva s cieľom zabrániť preplneniu a starnutiu buniek.

### **Postup pasážovania buniek:**

1. Najprv sme si bunky pozreli pod mikroskopom a skontrolovali sme či sú dostatočne namnožené.
2. Potom sme si dali nahriať médium, PBS, PBS s 2% FBS a akutázu. Nahrievali sme ich aspoň 20 minút pri 37°C.
3. Kultivačné nádoby, čiže štyri 12-jamkové dosky, sme si potiahli želatínou tak, že sme si do každej jamky napipetovali 250µl želatíny.
4. Dosky sme vložili do inkubátora na 20 minút.
5. Z inkubátora sme si vybrali Petriho misky a odsali sme staré médium.
6. Následne sme do každej misky pridali 3ml PBS, ktoré slúži na odstránenie mŕtvych buniek a zvyškov média. Potom sme PBS odsali a tento krok sme zopakovali 2x.
7. Následne sme do každej misky pridali 1,5ml akutázy, ktorá slúži na odlepenie buniek z dna nádoby. Petriho misky sme dali naspäť do inkubátora na 5 minút.
8. Po vybratí z inkubátora sme si v mikroskope skontrolovali, či sa bunky skutočne odlepili od dna.
9. Do každej misky sme pridali 3ml PBS s 2% FBS, ktorý slúži na inhibíciu akutázy. Následne sme misky preplachovali pipetou a bunky sme preniesli do dvoch 15ml falkoniek. Tento krok sme zopakovali 2x.
10. Falkonky sme vložili do centrifúgy na 3 minúty pri relatívnej centrifugačnej sile (rcf) 300. Potom sme z falkoniek odsali supernatant (tekutinu nad usadeninou) a každú peletku (usadeninu na spodku) sme resuspendovali v 2,4ml nového média.
11. Z inkubátora sme si vybrali 12-jamkové dosky a odsali z nich prebytočnú želatínu. Následne sme do každej jamky napipetovali 400µl nového média a 100µl pripravenej bunkovej suspenzie.
12. Dosky sme si popísali názvom buniek, dátumom pasážovania, podpisom a aktuálnou pasážou (P-6) a následne sme dosky vložili do inkubátora. Tento deň sme si označili ako deň 3.

### 4.3.3 Premedikácia buniek

#### 1. Experimentálny dizajn premedikácie – 6,12 a 24 hodín

Prvý experimentálny dizajn slúžil na výber približného času a koncentrácie. V tomto experimente sme mali 6 skupín a každá skupina obsahovala 6 vzoriek (Tab.1). Dohromady sme tak na experiment mali 36 vzoriek a 12 kontrolných jamiek (Tab.2).

**Tabuľka 1: Experimentálny dizajn premedikácie – 6,12 a 24 hodín**

	Koncentrácia	Premedikácia pomocou	Počet vzoriek
1.skupina	1nM	DMSO	6
2.skupina	1nM	DAPA	6
3.skupina	10nM	DMSO	6
4.skupina	10nM	DAPA	6
5.skupina	100nM	DMSO	6
6.skupina	100nM	DAPA	6

*DMSO – dimethylsulfoxid, DAPA – dapagliflozín*

**Tabuľka 2: Kontrolné skupiny pre experiment 6,12 a 24 hodín**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nezn.b.	Eng	ICAM-1	VCAM-1	PI	PI	Nezn.b. na nastavenie prístroja					
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

*Nezn.b. – neznačené bunky, Eng - endoglin, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, PI- propidium jodid*

Najprv sme si museli vypočítať potrebné objemy dimethylsulfoxidu (DMSO) a dapagliflozínu (DAPA), ktoré sme si chceli napipetovať do pripravených 12-jamkových dosiek. V jednej jamke bolo 500µl média. DMSO a DAPA sme pipetovali z pripravených zásobných roztokov.

## Výpočet objemu pridaného DMSO/DAPA:

a) 1nM

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

$$V_2 = \frac{c_1 \cdot V_1}{c_2}$$

$$V_2 = \frac{1nM \times 500\mu l}{100nM} = 5\mu l$$

b) 10nM

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

$$V_2 = \frac{c_1 \cdot V_1}{c_2}$$

$$V_2 = \frac{10nM \times 500\mu l}{1000nM} = 5\mu l$$

c) 100nM

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

$$V_2 = \frac{c_1 \cdot V_1}{c_2}$$

$$V_2 = \frac{100nM \times 500\mu l}{10\,000nM} = 5\mu l$$

## 2. Experimentálny dizajn premedikácie – 12 a 16 hodín

Na základe získaných výsledkov sme si v druhom experimentálnom dizajne upravili pracovné časy a koncentrácie. Experiment sme preto robili po 12 a 16 hodinovej premedikácií, kde sme mali 4 skupiny po 10 vzoriek (Tab.3). Dohromady sme tak na experiment mali 40 vzoriek a 8 kontrolných jamiek (Tab.4).











**Tabuľka 3: Experimentálny dizajn premedikácie - 12 a 16 hodín**

	Koncentrácia	Premedikácia pomocou	Počet vzoriek
1.skupina	1nM	DMSO	10
2.skupina	1nM	DAPA	10
3.skupina	2nM	DMSO	10
4.skupina	2nM	DAPA	10

DMSO – dimethylsulfoxid, DAPA – dapagliflozín

**Tabuľka 4: Kontrolné skupiny pre experiment 12 a 16 hodín**

1	2	3	4	5	6	7	8
Nezn.b.	Eng	ICAM-1	VCAM-1	PI	PI	Nezn.b.	
							

Nezn.b. – neznačené bunky, Eng - endoglin, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, PI - propidium jodid

Ako aj v prvom experimente, sme si museli najprv vypočítať potrebné objemy DMSO a DAPA, ktoré sme následne napipetovali do pripravených 12-jamkových dosiek. V jednej jamke bolo 500µl média. DMSO a DAPA sme pipetovali z pripravených zásobných roztokov.

**Výpočet objemu pridaného DMSO/DAPA:**

**d) 2nM**

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

$$V_2 = \frac{c_1 \cdot V_1}{c_2}$$

$$V_2 = \frac{2nM \times 500\mu l}{100nM} = 10\mu l$$

### 3. Experimentálny dizajn premedikácie u metódy adhézie

Podľa výsledkov z FC sme pre adhéziu vybrali najslubnejší experimentálny dizajn. Na experiment sme použili 4 skupiny, pričom sme mali 11-12 vzoriek na skupinu. Okrem toho sme mali 2 kontrolné vzorky (Tab.5).

Už z predchádzajúcej metódy sme vedeli aké množstvá DMSO/DAPA je potrebné do jamiek pridať, pretože sme pracovali s rovnakými koncentráciami ako u FC.

**Tabuľka 5: Experimentálny dizajn premedikácie u metódy adhézie**

	Koncentrácia	Premedikácia pomocou	Počet vzoriek
1.skupina	1nM	DMSO	12
2.skupina	1nM	DAPA	12
3.skupina	2nM	DMSO	12
4.skupina	2nM	DAPA	11

1.Kontrola	x	čisté EC	1
2.Kontrola	x	značené THP-1	1

*DMSO – dimethylsulfoxid, DAPA – dapagliflozín, EC – endotelové bunky, THP-1 – monocyty*

### 4.4 Prietoková cytometria

V našich experimentálnych dizajnoch sme využívali prietokovú cytometriu viackrát a to v rôznych časoch a koncentráciách.

#### **Postup práce :**

1. Začali sme tým, že sme si dali nahriať roztok PBS, PBS s 2% FBS a akutázu. Všetko sme nechali nahrievať približne 20-30 min pri teplote 37°C.
2. Z 12-jamkových dosiek sme si pomocou odsávačky odsali staré médium.
3. Napipetovali sme 500µl PBS do každej jamky a následne odsali. Tento postup sme opakovali 2x.

4. Po odsatí PBS sme do každej jamky pridali 150µl akutázy a potom sme dosky vložili do inkubátora na 5 min pri 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.
5. Dosky sme vybrali z inkubátora a pod mikroskopom sme si skontrolovali, či sa bunky po pôsobení akutázy skutočne odlepili od dna. Potom sme pridali 100µl PBS s 2% FBS do každej jamky a následne sme každú jamku preplachovali pipetou. Po prepláchnutí jamky sme jej obsah preniesli do jamky v 96-jamkovej doske s dnom v tvare „V“. V tomto kroku sme si ešte z 12-jamkovej dosky preniesli 2 jamky nepremedikovaných buniek do 2 ependorfiek. Bunky v jednej ependorfke sme potom usmrtili tak, že sme ich najprv zahriali na 2 minúty pri 65°C a následne sme ich dali do ľadu na 2 minúty. Ependorfky sme dali stočiť v centrifúge na 3 minúty pri 300 rcf, následne sme ich spojili a preniesli do jednej jamky v 96-jamkovej doske. Tieto bunky nám slúžili ako pozitívna kontrola na PI.
6. Dosku sme vložili do centrifúgy na 3 minúty pri 300 rcf. Po skončení sme supernatant vyliali rýchlym švihom do umývadla.
7. Peletku sme resuspendovali poklepaním dosky o tvrdý povrch a do každej jamky sme napipetovali 200µl PBS s 2% FBS pomocou multikanálovej pipety. Následne sme dosku dali scentrifugovať na 3 minúty pri 300 rcf. Po skončení sme vyliali supernatant rýchlym švihom do umývadla. Tento postup sme opakovali 2x.
8. Medzi tým sme si v ependorfkách pripravili jednofarbné kontroly Eng, ICAM-1, VCAM-1 a PI. Okrem toho sme si pripravili mastermix, kde boli zmiešané všetky protilátky v PBS s 2% FBS. Do každej ependorfky sme napipetovali vypočítaný objem PBS s 2% FBS a doňho sme napipetovali odpovedajúcu protilátku (Tab.6,7,8,9).

**Tabuľka 6: Príprava jednofarebných kontrol (1.experimentálny dizajn)**

	Príprava protilátok	
	Protilátka na 1 jamku v $\mu$ l	PBS na 1 jamku v $\mu$ l
Eng	1	99
ICAM-1	1	99
VCAM-1	1	99
PI	0,5	99,5

Na jednu jamku 96-jamkovej dosky sme potrebovali napipetovať 100 $\mu$ l. Na základe toho sme si vytvorili tabuľku s objemami, ktoré sme následne v ďalšom kroku pipetovali.

Eng - endoglin, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, PI- propidium jodid, PBS – fosfátový tlmivý roztok

**Tabuľka 7: Príprava mastermixu (1.experimentálny dizajn)**

	Príprava mastermixu	
	Protilátka/ PBS na 1 jamku v $\mu$ l	Protilátka/ PBS na 38 jamiek v $\mu$ l
Eng	1	38
ICAM-1	1	38
VCAM-1	1	38
PI	0,5	19
PBS	96,5	3667

Na jednu jamku 96 jamkovej dosky sme potrebovali napipetovať 100 $\mu$ l. V 1. experimentálnom dizajne sme mali 36 vzoriek, ale počítali sme s rezervou, takže sme si pripravili mastermix pre 38 vzoriek.

Eng - endoglin, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, PI- propidium jodid, PBS – fosfátový tlmivý roztok

**Tabuľka 8: Príprava jednofarebných kontrol (2.experimentálny dizajn)**

	Príprava protilátok	
	Protilátka na 1 jamku v $\mu$ l	PBS na 1 jamku v $\mu$ l
Eng	1	99
ICAM-1	1	99
VCAM-1	1	99
PI	0,5	99,5

Na jednu jamku 96-jamkovej dosky sme potrebovali napipetovať 100 $\mu$ l. Na základe toho sme si vytvorili tabuľku s objemami, ktoré sme následne v ďalšom kroku pipetovali.

Eng - endoglin, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, PI- propidium jodid, PBS – fosfátový tlmivý roztok

**Tabuľka 9: Príprava mastermixu (2.experimentálny dizajn)**

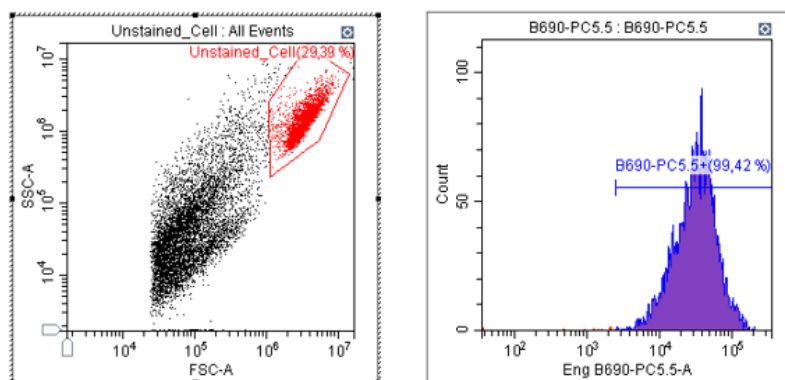
	Príprava mastermixu	
	Protilátka/ PBS na 1 jamku v $\mu$ l	Protilátka/ PBS na 42 jamiek v $\mu$ l
Eng	1	42
ICAM-1	1	42
VCAM-1	1	42
PI	0,5	21
PBS	96,5	4053

Na jednu jamku 96-jamkovej dosky sme potrebovali napipetovať 100 $\mu$ l. V 2. experimentálnom dizajne sme mali 40 vzoriek, ale počítali sme s rezervou, takže sme si pripravili mastermix na 42 vzoriek.

Eng - endoglin, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, PI- propidium jodid, PBS – fosfátový tlmivý roztok

9. Po scentrifugovaní dosky sme supernatant vyliali rýchlym švihom do umývadla, peletku sme resuspendovali poklepaním dosky o tvrdý povrch a do každej jamky sme napipetovali 100µl odpovedajúcej protilátky.
10. Dosku sme dali inkubovať na 30 minút pri 4°C v tme (v chladničke).
11. Po 30 minútach sme dosku scentrifugovali 3 minúty pri 300 rcf. Následne sme supernatant vyliali rýchlym švihom do umývadla.
12. Peletku sme resuspendovali poklepaním dosky o tvrdý povrch a do každej jamky sme napipetovali 200µl PBS s 2% FBS pomocou multikanálovej pipety. Následne sme dosku dali scentrifugovať na 3 minúty pri 300 rcf. Po skončení sme vyliali supernatant rýchlym švihom do umývadla. Tento postup sme opakovali 2x.
13. Po vyliatí supernatantu sme peletku znova resuspendovali poklepaním dosky o tvrdý povrch a do každej jamky sme napipetovali 150µl PBS z chladničky.
14. Na záver sme dosku zmerali v cytometri.
  - a) Najprv sme si urobili kompenzáciu tak, že sme zmerali neznačené bunky. Podľa toho sme si vytvorili oblasť, tzv. „gate“, aby sme ohraničili našu populáciu záujmu. Nakreslenie oblasti okolo vybraných populácií buniek sa nazýva ako „gating“. V takto vybraných oblastiach potom môžeme sledovať rôzne parametre, ktoré nás zaujímajú. To umožňuje vybrať špecifické skupiny buniek na ďalšiu analýzu markerov.
  - b) Potom sme zmerali jednofarebné kontroly (single-stain controls) jednotlivých protilátok (Eng, ICAM-1, VCAM-1, PI). V týchto vzorkách sa vždy nachádzala len 1 protilátka, ktorú sme zmerali. Po zmeraní sme si na histograme vytvorili gate, ktorý nám udával v akom rozmedzí fluorescencie nám daná protilátka dáva pozitívny signál (Obr.15).

**Obrázok 15: Tvorba gatov**

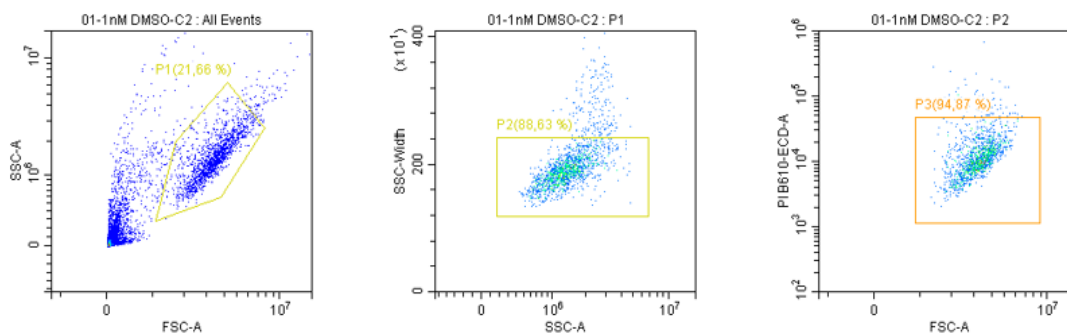


Na ľavom grafe je zobrazená populácia záujmu, ktorú sme vytvorili po meraní týchto neznačených buniek. Túto oblasť sme potom použili na ďalšie merania protilátok. Na pravom grafe je vidieť meranie jednej z protilátok (Eng), u ktorej sme vyznačili oblasť podľa rozmedzia jej fluorescencie.

FCS – priamy rozptyl, SSC – bočný rozptyl, Eng – endoglin

- c) Po zmeraní všetkých kontrol sme si vytvorili kompenzačnú maticu. V programe sme si popísali dosku tak, že sme si podľa skupín označili jamky. Na to sme aplikovali vytvorenú kompenzačnú maticu a spustili sme meranie. Na začiatku merania sme si najprv vytvorili oblasti záujmu (Obr.16), tzv. „gating strategy“ pomocou troch grafov. V grafe č.1 sa zo všetkých udalostí odstraňuje tzv. bunkový debris, ktorý sa spravidla nachádza vľavo dole. V grafe č.2 sa vylučujú dvojice buniek, ktoré sa nachádzajú vpravo hore. Tento gate sa označuje ako P2 a vypovedá nám to o tom, že sa v tejto oblasti už nenachádzajú dvojice buniek. V grafe č.3 sa vylučujú mŕtve bunky, ktoré sa nachádzajú hore. Je to tým, že mŕtve bunky majú narušenú bunkovú membránu, a tak pohlcujú propídium jodid, ktorý sa do živých buniek nedostane (vďaka neporušenej membráne). Tento gate sa označuje ako P3 a vypovedá nám to o tom, že sa v tejto oblasti nachádzajú už len živé bunky.

**Obrázok 16: Stratégia tvorenia oblastí okolo buniek**



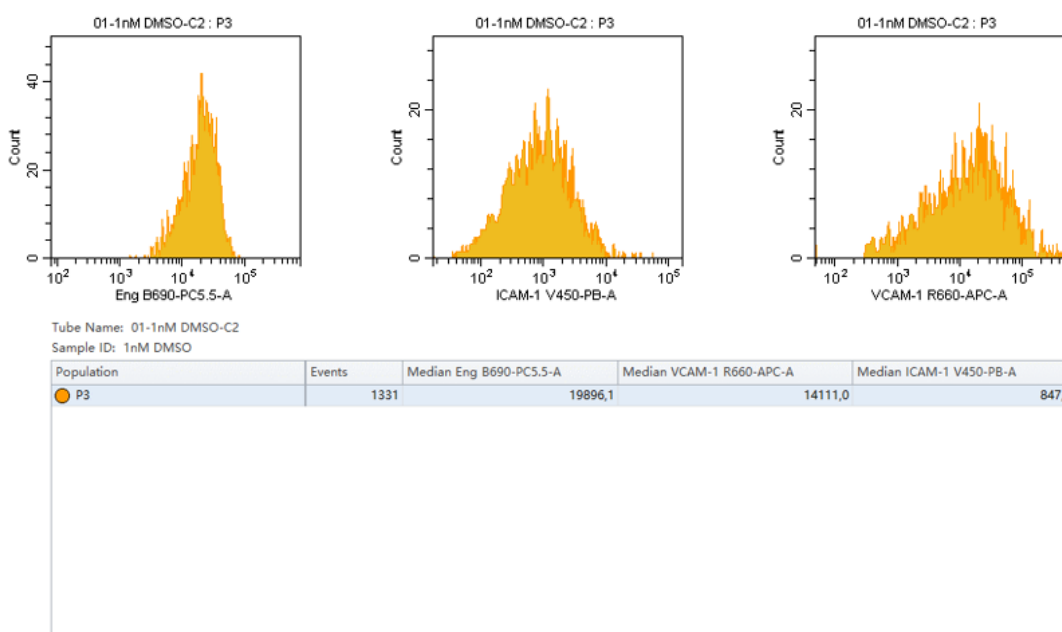
Tieto grafy nám slúžia na výber populácie záujmu. V grafe č.1 sa na ose x nachádza FCS-A, ktorý indikuje relatívnu veľkosť bunky. Na ose y sa nachádza SSC-A, ktorý indikuje vnútornú zložitnosť alebo granularitu bunky. Tento graf slúži na odstránenie zvyškov buniek (debrisu). V grafe č.2 sa na ose x nachádza SSC-A a na ose y je SSC – W, ktorý indikuje šírku bunky. Tento graf slúži na oddelenie dvojíc buniek (doubletov). V grafe č.3 je na ose x FCS-A a na ose y je fluorescencia PI, ktorý označuje mŕtve bunky. Tento graf slúži na oddelenie mŕtvych buniek od živých.

DMSO – dimethylsulfoxid, FCS – priamy rozptyl, SSC – bočný rozptyl, PI – propídium jodid

- d) V cytometri sme si potom nastavili ďalšie parametre. Tieto parametre sme merali len na bunkách, ktoré sa nachádzali v gate P3 (Obr.17).



**Obrázok 17: Histogramy protilátok je popis**



Na týchto 3 histogramoch nám osa x zobrazuje intenzitu fluorescencie a osa y počet buniek. Vľavo sa nachádza histogram pre Eng meraný v B690 filtri. Histogram uprostred zobrazuje ICAM-1 meraný v V450 filtri a vpravo sa nachádza histogram zobrazujúci VCAM-1, ktorý bol meraný v R660 filtri. Všetky vzorky sme merali v gate P3. Tiež sme si do tabuľky vyniesli počet udalostí a mediánovú fluorescencnú intenzitu (MFI), čo je stredná hodnota intenzity fluorescencie.

Eng - endoglin, ICAM-1 - intercelulárna bunková adhézna molekula-1, VCAM-1 - vaskulárna bunková adhézna molekula-1, DMSO – dimetylsulfoxid

e) Následne sme namerané výsledky vyhodnotili v Exceli a štatistickom programe GraphPad.

#### 4.5 Adhézia monocytov k endotelovým bunkám

Metódou adhézie sme sledovali počet monocytov priľnutých k EC. Tento jav sme merali pomocou prietokovej cytometrie. Pracovali sme s bunkami, ktoré

boli premedikované 12 hodín pred experimentom pomocou DMSO a DAPA v 2 koncentráciách (1nM a 2nM). Experimentálny dizajn obsahoval 4 skupiny, pričom 3 skupiny obsahovali po 12 vzoriek a 1 skupina obsahovala 11 vzoriek (2nM DAPA). Okrem toho sme mali aj 2 kontroly, a to EC, ktoré neboli premedikované a monocyty (THP-1), ktoré boli značené pomocou Vibrant DiO.

**Postup práce :**

1. Dali sme si nahriať rastové médium bez FBS.
2. Na jednu jamku sme si mali odobrať  $1 \times 10^5$  THP-1. Náš počet jamiek bol 48, ale odobrali sme viac THP-1, aby sme ich mohli neskôr použiť na tvorbu gatu v cytometri. To znamená, že s kontrolami sme chceli odobrať množstvo THP-1 potrebné na 50 jamiek, teda 5 miliónov THP-1. Pomocou počítacky buniek sme zistili koncentráciu THP-1 ( $1,23 \times 10^6$  buniek na ml). Na základe koncentrácie sme si vypočítali, že na to aby, sme mali 5 miliónov THP-1 potrebujeme odobrať 4,07ml média s bunkami, ktoré sme následne napipetovali do 5ml endorfky.

***Výpočet potrebného počtu monocytov:***

$$\begin{array}{l} \uparrow 1 \text{ jamka} \dots 100\,000 \text{ THP-1} \uparrow \\ \uparrow 50 \text{ jamiek} \dots X \text{ THP-1} \uparrow \end{array}$$

---


$$X = \frac{50 \cdot 100\,000 \text{ THP}}{1} = 5\,000\,000 \text{ THP-1}$$

***Výpočet objemu monocytov:***

$$\begin{array}{l} \uparrow 1\,230\,000 \text{ THP} \dots \text{v } 1 \text{ ml} \uparrow \\ \uparrow 5\,000\,000 \text{ THP} \dots X \text{ ml} \uparrow \end{array}$$

---


$$X = \frac{5\,000\,000 \cdot 1 \text{ ml}}{1\,230\,000} = 4,07 \text{ ml}$$

3. Ependorfku sme dali do centrifúgy na 3 minúty pri 300rcf.

- Medzitým sme si vypočítali, koľko média bez FBS je potrebné pridať v nasledujúcom kroku. Vypočítali sme si to podľa toho, že na  $1 \times 10^6$  THP-1 je potrebné pridať 1ml média.

**Výpočet objemu média bez FBS:**

$$\begin{array}{l} \uparrow 1 \text{ ml média na } 1\,000\,000 \text{ THP-1} \uparrow \\ \uparrow X \text{ ml média na } 5\,000\,000 \text{ THP-1} \uparrow \end{array}$$

---


$$X = \frac{5\,000\,000 * 1 \text{ ml}}{1\,000\,000} = \mathbf{5 \text{ ml média}}$$

- Po scentrifugovaní sme si odsali supernatant a peletku THP-1 resuspendovali v 5ml média bez FBS.
- K THP-1 sme pridali Vybrant DiO. Výrobca Vybrant DiO uvádza, že ideálna koncentrácia na značenie je  $4 \mu\text{l}$  Vibrant DiO na  $1 \times 10^6$  THP-1. Na základe toho sme do ependorfky pridali  $20 \mu\text{l}$  Vibrant DiO a vložili ju do inkubátora na 15 minút pri  $37^\circ\text{C}$  s  $5\% \text{ CO}_2$ .

**Výpočet Vybrant DiO v  $\mu\text{l}$  :**

$$\begin{array}{l} \uparrow 1\,000\,000 \text{ THP} \dots 4 \mu\text{l farbičky} \uparrow \\ \uparrow 5\,000\,000 \text{ THP} \dots X \mu\text{l Vybrant DiO} \uparrow \end{array}$$

---


$$X = \frac{5\,000\,000 * 4 \mu\text{l}}{1\,000\,000} = \mathbf{20 \mu\text{l Vybrant DiO}}$$

- Po vybratí z inkubátora sme ependorfku znova vložili do centrifúgy na 3 minúty pri 300rcf a potom sme odsali supernatant.
- Ďalej sme pokračovali premývaním. Premývali sme s 3ml média bez FBS, stočili sme v centrifúge na 3 minúty pri 300rcf a odsali. Tento krok sme opakovali 2x.
- Vedeli sme, že do každej jamky chceme pridať  $1 \times 10^5$  THP-1 v  $100 \mu\text{l}$ , takže sme si vypočítali, že THP-1 musíme rozriediť v 5ml média.

### **Výpočet objemu média bez FBS:**

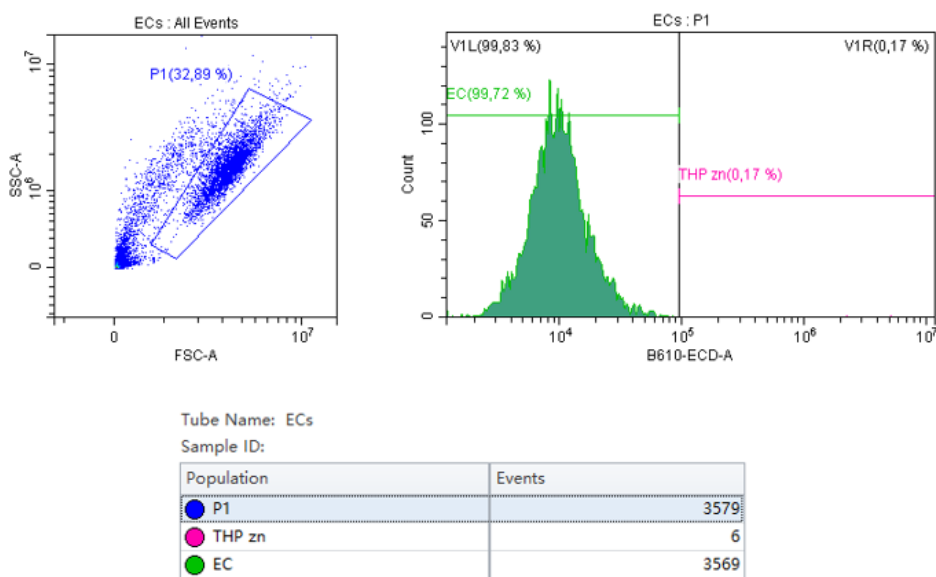
$$\begin{array}{ccc} \uparrow & 100\mu\text{l na } 100\,000 \text{ THP-1} & \uparrow \\ & X\mu\text{l na } 5\,000\,000 \text{ THP-1} & \end{array}$$

---

$$X = \frac{5\,000\,000 * 100\mu\text{l}}{100\,000} = 5\,000\mu\text{l} = \mathbf{5\text{ml média}}$$

10. Potom sme pridali 5ml média bez FBS a resuspendovali peletku.
11. Naše 12-jamkové dosky sme si vybrali s inkubátora a do každej jamky sme napipetovali 100 $\mu\text{l}$  pripravenej zmesi. Dosky sme opäť vložili do inkubátora na 1 hodinu pri 37°C.
12. Medzitým sme si dali nahriať PBS s 1% BSA a akutázu na 20 minút pri 37°C.
13. Po hodine sme si vybrali dosky z inkubátora, a odsali sme z nich médium a neadherentné THP-1.
14. Dosky sme preplachovali s 300 $\mu\text{l}$  PBS, jemne premiešali a odsali. Tento krok sme opakovali 2x.
15. Pridali sme 150 $\mu\text{l}$  akutázy a dosky dali na 5 minút do inkubátora.
16. Potom sme si dosky pod mikroskopom skontrolovali a uistili sa, že sú bunky odlepené od povrchu.
17. Pripravili sme si potrebný počet 1,5ml ependorfiek s nízkou priľnavosťou. Potom sme do dosiek pridali 300 $\mu\text{l}$  PBS s 1% BSA a resuspendovali pipetou. Resuspendovaný objem sme preniesli do ependorfiek. Tento postup sme opakovali 2x.
18. Ependorfky sme dali stočiť do centrifúgy na 3 minúty pri 300 rcf a následne sme odsali supernatant.
19. Na záver sme do každej ependorfky pridali 200 $\mu\text{l}$  studeného PBS.
20. V poslednom kroku sme si vzorky zmerali na cytometri.
  - a) Najprv sme si zmerali naše kontroly EC (Obr.18) a THP-1 značené (obr.19) a podľa toho sme si vytvorili gate.

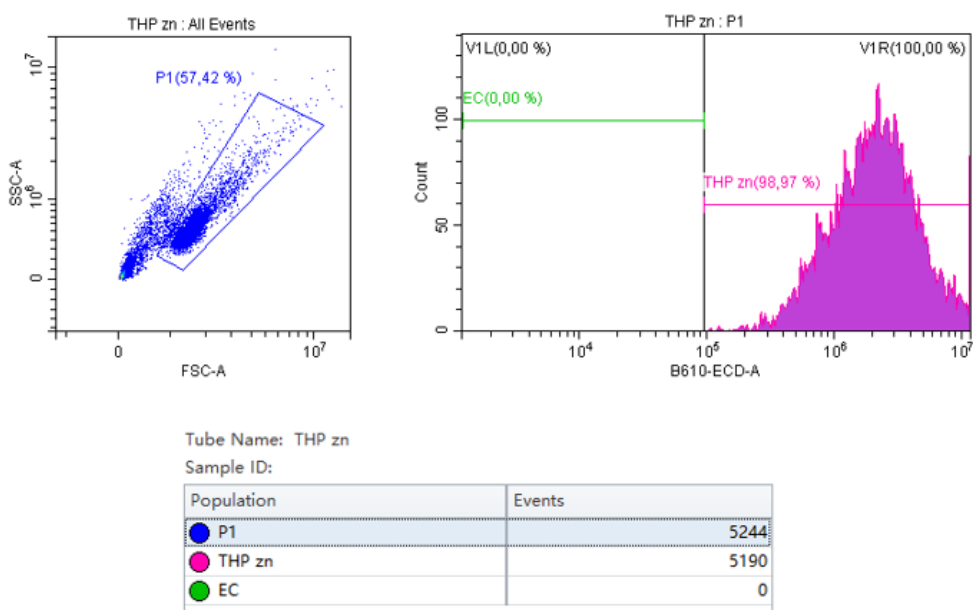
**Obrázok 18: Graf kontroly pre EC**



Vytvorený gate P1 v bodovom grafe (vľavo) sme aplikovali na histogram (vpravo), v ktorom sme si tiež urobili gate pomocou strednej osy. Na základe takto vytvorených kontrolných histogramov sme potom vedeli, v akej časti grafu sa nachádzajú EC. V spodnej tabuľke je vidieť koľko udalostí sme namerali v danej populácii.

FCS – priamy rozptyl, SSC – bočný rozptyl, PI – propídium jodid, EC – endotelové bunky, THP - monocyty

**Obrázok 19: Graf kontroly pre značené THP-1**

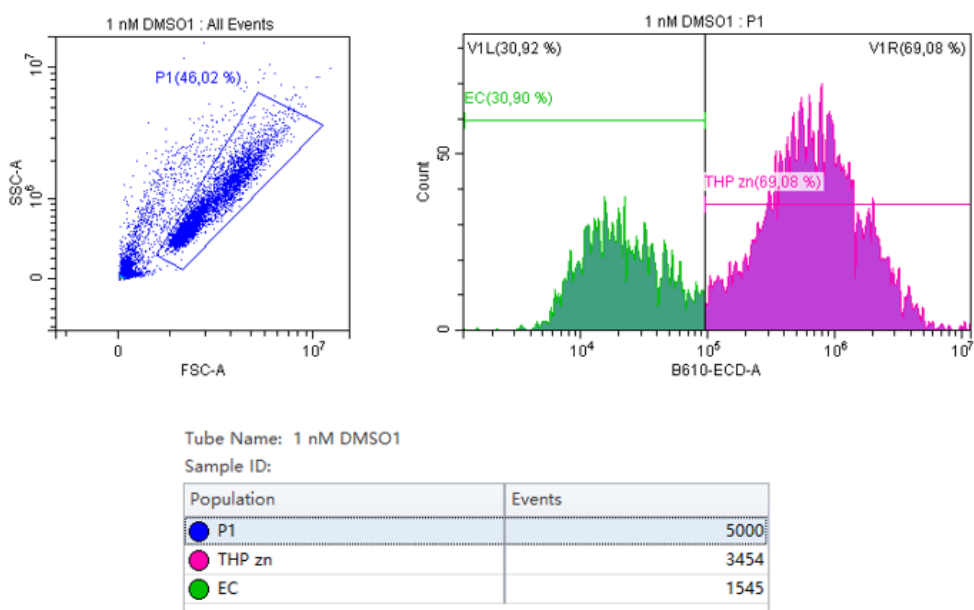


Vytvorený gate P1 v bodovom grafe (vľavo) sme aplikovali na histogram (vpravo), v ktorom sme si tiež urobili gate pomocou strednej osy. Na základe takto vytvorených kontrolných histogramov sme potom vedeli, v akej časti grafu sa nachádzajú THP-1. V spodnej tabuľke je vidieť koľko udalostí sme namerali v danej populácii.

FCS – priamy rozptyl, SSC – bočný rozptyl, PI – propidium jodid, EC – endotelové bunky, THP - monocyty

- b) Potom sme si začali merať naše vzorky. Každú vzorku sme zmerali 2x (Obr.20).

**Obrázok 20: Grafy pre 1nM DMSO**



Vytvorený gate vľavo sme aplikovali na histogram vpravo. Na základe histogramu a zmerných kontrol pre EC a THP-1, vieme povedať, že sa vo vzorke nachádzajú EC v ľavej časti a THP-1 v pravej časti. U každej vzorky sme nahrávali 5 000 udalostí v oblasti P1, čo je znázornené v spodnej tabuľke.

FCS – priamy rozptyl, SSC – bočný rozptyl, PI – propídium jodid, EC – endotelové bunky, THP – monocyty, DMSO - dimethylsulfoxid

21. Výsledky sme vyhodnotili pomocou Excelu a GraphPadu a uvádzali ako počet adherentných THP-1 monocytov.

## 4.6 ELISA

Touto metódou sme chceli zistiť množstvo sEng v médiu buniek stimulovaných dapagliflozínom. Vzorky sme získali odobratím supernatantu (média) z 12-jamkových dosiek, ktoré sme mali pripravené na experiment 12 hodinovej FC. Z každej skupiny sme si odobrali 10 vzoriek. Vzorky sme potom dali do -80°C a vybrali sme ich až v čase potreby.

Existujú rôzne typy ELISA. V tejto diplomovej práci sme používali sendvičovú ELISA.

### **Postup sendvičovej ELISA :**

1. Deň pred experimentom sme si vybrali vzorky z  $-80^{\circ}\text{C}$  a dali ich do chladničky ( $4^{\circ}\text{C}$ ).
2. Potom sme si zriedili záchytnú protilátku na pracovnú koncentráciu (uvedená v certifikáte o analýze)  $2\mu\text{g/ml}$  pomocou roztoku PBS, a to tak, že sme si vypočítali množstvo roztoku potrebného na 96 jamiek na základe toho, že do každej jamky potrebujeme pridať  $100\mu\text{l}$ . Zohľadnili sme aj 25% rezervu pre prípad straty alebo chýb. Objem potrebného PBS činil  $12\text{ml}$  ( $12000\mu\text{l}$ ). Následne sme si vypočítali koľko máme pridať záchytnej protilátky do roztoku PBS. Daný objem ( $66,7\mu\text{l}$ ) sme odobrali z falkonky s PBS a následne tam pridali ten istý objem záchytnej protilátky. Takto pripravenú záchytnú protilátku sme premiešali a napipetovali reverzne do 96-jamkovej dosky ( $100\mu\text{l}$  na 1 jamku) pomocou multikanálovej pipety. Dosku sme potom prelepili adhéznou fóliou, vložili do prístroja a nechali inkubovať cez noc pri izbovej teplote, pri 500 otáčkach za minútu (RPM).

#### ***Výpočet objemu záchytnej protilátky :***

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

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1}$$

$$V_1 = \frac{2\mu\text{g/ml} \times 12\,000\mu\text{l}}{360\mu\text{g/ml}} = 66,7\mu\text{l}$$

3. Na druhý deň sme začali prípravou:

#### **a) Premývacieho roztoku podľa protokolu**

Premývací roztok slúži na odstránenie použitých látok, ktoré sa na dosku v predchádzajúcom kroku nenaviazali. Do odmernej banky sme napipetovali  $20\text{ml}$  koncentrovaného premývacieho roztoku



pomocou serologickej pipety a následne sme ho zriedili destilovanou vodou do objemu 500ml.

**b) Riediaceho činidla (reagent diluent (RD))**

Toto činidlo je určené na prípravu pracovných riedení detekčnej protilátky a koncentrovaných konjugátov streptavidínu. Slúži na udržanie stability detekčnej protilátky a enzymatickej aktivity streptavidínu. RD sme si nariesili v pomere 1:5 s roztokom PBS. Náš požadovaný objem bol 80ml. To znamená, že sme pridali 16ml koncentrovaného RD a 64ml roztoku PBS.

***Výpočet RD:***

*Zriedenie 1:5*

*Potrebuje pridať 80ml*

$$1 \text{ dielik... } \frac{80}{5} = \mathbf{16ml \text{ koncentrovaného RD}}$$

$$\mathbf{Objem PBS : 80ml - 16ml = 64ml \text{ roztoku PBS}}$$

4. Dosku sme si vybrali z prístroja, odlepili fóliu a vyliali jej obsah. Následne sme ju premývali pripraveným premývacím roztokom pomocou multikanálovej pipety (250µl na jamku). Obsah dosky sme znova vyliali a premývanie opakovali 3x.
5. Potom sme do dosky napipetovali RD v objeme 250µl na jamku, prelepili adhéznou fóliou a dali do prístroja na 1 hodinu pri izbovej teplote pri 500 RPM.
6. Za ten čas kým sme čakali, sme si pripravili kalibračnú radu. Najprv sme si vypočítali, koľko koncentrovaného štandardu je potrebné pridať na prípravu najkoncentrovanejšieho bodu kalibračnej rady. Následne sme si pripravili 7 ependorfiek a označili si ich podľa potrebných koncentrácií od 8000pg/ml do 125pg/ml a 1 extra ako slepú vzorku pre kontrolu (Obr.21). Ependorfky sme si naplnili objemom 500µl RD, s výnimkou prvej vzorky (8000pg/ml), kde sme pridali 1000µl RD. Z prvej ependorfky sme odobrali 21,1µl RD a pridali 21,1µl koncentrovaného štandardu. Pripravený roztok sme zvortexovali a preniesli 500µl do

druhej ependorfky (4000pg/ml). Takto sme postupovali až do koncentrácie 125pg/ml.

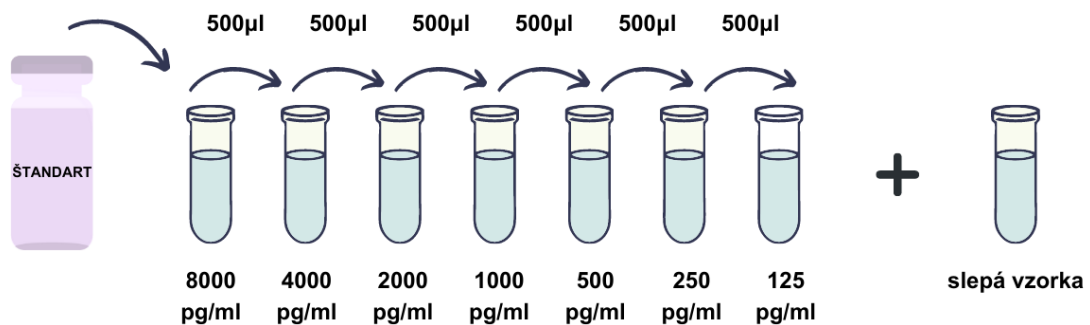
**Výpočet objemu potrebného štandardu :**

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

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1}$$

$$V_1 = \frac{8 \text{ ng/ml} \times 1000 \mu\text{l}}{380 \text{ ng/ml}} = 21,1 \mu\text{l}$$

**Obrázok 21: Príprava vzoriek na kalibračnú krivku**



Kalibračná rada bola pripravená sériovým zriedením v koncentráciách 8000-125pg/ml. Okrem koncentrovaných vzoriek sme si pripravili aj slepú vzorku, kde sa nachádzalo len 500µl zásobného roztoku RD (obrázok vytvorený autorom).

- Po hodine sme vybrali dosku z prístroja, odlepili fóliu a vyliali jej obsah. Následne sme ju premývali pripraveným premývacím roztokom v objeme 250µl. Obsah dosky sme znova vyliali a premývanie opakovali 3x.
- Následne sme do každej jamky pridali 50µl RD a 50µl vzoriek podľa vytvorenej šablóny (Tab.10). Dosku sme prelepili adhéznou fóliou a dali do prístroja na 2 hodiny pri izbovej teplote pri 500 RPM.

**Tabuľka 10: Šablóna dosky u ELISA**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	1_1 nM DMSO	2_1 nM DMSO	3_1 nM DMSO	4_1 nM DMSO	5_1 nM DMSO	6_1 nM DMSO	7_1 nM DMSO	8_1 nM DMSO	9_1 nM DMSO	10_1 nM DMSO
<b>B</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	1_1 nM DMSO	2_1 nM DMSO	3_1 nM DMSO	4_1 nM DMSO	5_1 nM DMSO	6_1 nM DMSO	7_1 nM DMSO	8_1 nM DMSO	9_1 nM DMSO	10_1 nM DMSO
<b>C</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	1_1 nM DAPA	2_1 nM DAPA	3_1 nM DAPA	4_1 nM DAPA	5_1 nM DAPA	6_1 nM DAPA	7_1 nM DAPA	8_1 nM DAPA	9_1 nM DAPA	10_1 nM DAPA
<b>D</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	1_1 nM DAPA	2_1 nM DAPA	3_1 nM DAPA	4_1 nM DAPA	5_1 nM DAPA	6_1 nM DAPA	7_1 nM DAPA	8_1 nM DAPA	9_1 nM DAPA	10_1 nM DAPA
<b>E</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	1_2 nM DMSO	2_2 nM DMSO	3_2 nM DMSO	4_2 nM DMSO	5_2 nM DMSO	6_2 nM DMSO	7_2 nM DMSO	8_2 nM DMSO	9_2 nM DMSO	10_2 nM DMSO
<b>F</b>	<b>2000</b>	<b>2000</b>	1_2 nM DMSO	2_2 nM DMSO	3_2 nM DMSO	4_2 nM DMSO	5_2 nM DMSO	6_2 nM DMSO	7_2 nM DMSO	8_2 nM DMSO	9_2 nM DMSO	10_2 nM DMSO
<b>G</b>	<b>4000</b>	<b>4000</b>	1_2 nM DAPA	2_2 nM DAPA	3_2 nM DAPA	4_2 nM DAPA	5_2 nM DAPA	6_2 nM DAPA	7_2 nM DAPA	8_2 nM DAPA	9_2 nM DAPA	10_2 nM DAPA
<b>H</b>	<b>8000</b>	<b>8000</b>	1_2 nM DAPA	2_2 nM DAPA	3_2 nM DAPA	4_2 nM DAPA	5_2 nM DAPA	6_2 nM DAPA	7_2 nM DAPA	8_2 nM DAPA	9_2 nM DAPA	10_2 nM DAPA

*Najprv sme si napipetovali kalibračnú radu. Každú vzorku sme napipetovali do dvoch jamiek vedľa seba. Potom sme si napipetovali naše vzorky tak isto do 2 jamiek, ale pod sebou.*

*DMSO – dimethylsulfoxid, DAPA - dapagliflozín*

9. Tesne pred skončením 2 hodín v prístroji sme si pripravili detekčnú protilátku. Zriedili sme si ju na pracovnú koncentráciu 50ng/ml v 12ml RD. Potrebný objem detekčnej protilátky, ktorý sme si vypočítali bol 66,7µl. Tento objem sme odobrali z 12 ml zásobného roztoku RD a následne pridali ten istý objem detekčnej protilátky.

**Výpočet objemu detekčnej protilátky :**

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

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1}$$

$$V_1 = \frac{0,05 \mu\text{g/ml} \times 12\ 000 \mu\text{l}}{9 \mu\text{g/ml}} = 66,7 \mu\text{l}$$

10. Po 2 hodinách sme vybrali dosku z prístroja, odlepili fóliu a vyliali jej obsah. Následne sme ju premývali pripraveným premývacím roztokom v objeme 250 $\mu$ l. Obsah dosky sme znova vyliali a premývanie opakovali 3x.
11. Do každej jamky sme potom pridávali pripravený roztok detekčnej protilátky v objeme 100 $\mu$ l a znova prelepili adhéznou fóliou a dali na 2 hodiny do prístroja za rovnakých podmienok.
12. Pred skončením 2 hodín sme si pripravili roztok streptavidínu-HRP v RD. Požadovaná pracovná koncentrácia bola udaná ako 200 násobné zriedenie zásobného roztoku. Na základe pomeru sme si vypočítali, že potrebujeme pridať 60 $\mu$ l streptavidínu-HRP. Následne sme odobrali 60 $\mu$ l z 12ml roztoku RD a napipetovali sme tam 60 $\mu$ l streptavidínu-HRP.

***Výpočet objemu streptavidínu-HRP:***

*Zriedenie 1:200*

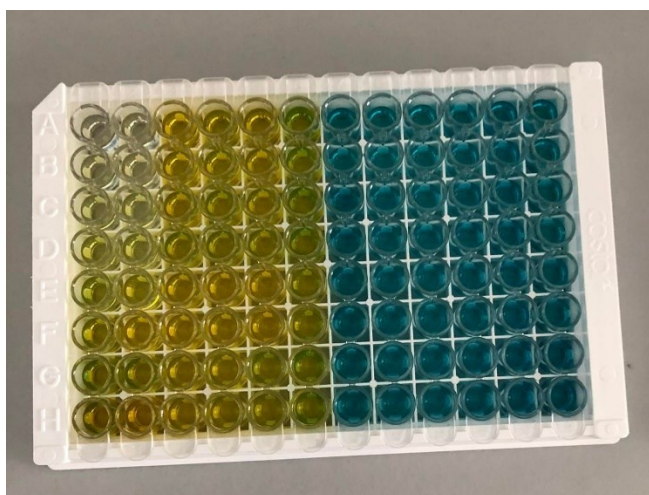
*Potrebujeme pridať 12000 $\mu$ l (12ml)*

$$1 \text{ dielik... } \frac{12000\mu\text{l}}{200} = \mathbf{60\mu\text{l streptavidínu-HRP}}$$

13. Po 2 hodinách sme vybrali dosku z prístroja, odlepili fóliu a vyliali jej obsah. Následne sme ju premývali pripraveným premývacím roztokom v objeme 250 $\mu$ l. Obsah dosky sme znova vyliali a premývanie opakovali 3x.
14. Následne sme do každej jamky pridali 100 $\mu$ l streptavidínu-HRP. Dosku sme prelepili adhéznou fóliou a dali na 20 min do prístroja pri rovnakých podmienkach až na to, že v tomto kroku prebiehala inkubácia za tmy.
15. Pred uplynutím 20 minút sme si pripravili roztok substrátu zmiešaním dvoch farebných činidiel A a B. Obe činidlá sme pridávali v objeme 6ml tak, aby celkový roztok substrátu bol 12ml.
16. Potom sme dosku znova premývali 3x ako v predchádzajúcich krokoch.

17. Následne sme do každej jamky pridávali 100 $\mu$ l substrátu a pozorovali ako sa mení sfarbenie roztoku na modré. Dosku sme prelepili adhéznou fóliou a dali na 20 min do prístroja pri rovnakých podmienkach ako pred tým. V tomto kroku bolo tiež dôležité, aby inkubácia prebiehala za tmy.
18. Na záver sme do každej jamky napipetovali 50 $\mu$ l stop roztoku (stop solution), ktorý je potrebný na zastavenie reakcie, čo sme pozorovali zmenou farby z modrej na žltú (Obr.22). Po pridaní sme išli ihneď vzorky zmerať. Merali sme absorbanciu pri vlnovej dĺžke 450nm a 540nm.

**Obrázok 22: Zmena farby po pridaní roztoku na zastavenie reakcie**



*Na obrázku je vidieť ako sa smerom z ľava do prava menila farba na doske po pridaní roztoku na zastavenie reakcie (obrázok vytvorený autorom).*

19. Výsledky sme následne spracovali do tabuliek pomocou Excelu a GraphPadu.
- a) Najprv sme z výsledných hodnôt absorbancií pri 540nm a 450nm vytvorili tabuľku tak, že sme si odčítali hodnoty koncentrácií pri 540nm od hodnôt pri 450nm (Tab.11).

**Tabuľka 11: Výsledné hodnoty rozdielu absorbancií 540nm a 450 nm**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>0,056</b>	<b>0,103</b>	1,877	1,874	2,135	2,243	1,619	1,346	1,248	1,587	1,81	1,585
<b>B</b>	<b>0,152</b>	<b>0,155</b>	1,925	1,873	2,085	2,255	1,589	1,347	1,244	1,455	1,8	1,488
<b>C</b>	<b>0,272</b>	<b>0,277</b>	2,228	2,189	2,133	2,571	2,132	1,563	1,429	1,77	1,994	1,514
<b>D</b>	<b>0,496</b>	<b>0,478</b>	2,163	2,188	2,182	2,512	2,142	1,548	1,568	1,832	1,946	1,503
<b>E</b>	<b>0,89</b>	<b>0,914</b>	2,173	2,209	2,118	2,303	1,972	1,548	1,572	1,749	1,956	1,771
<b>F</b>	<b>1,641</b>	<b>1,794</b>	2,183	1,981	2,258	2,388	1,997	1,607	1,595	1,79	1,991	1,834
<b>G</b>	<b>2,823</b>	<b>2,83</b>	2,308	2,185	2,153	2,455	1,953	1,668	1,796	1,949	2,306	2,413
<b>H</b>	<b>3,771</b>	<b>3,871</b>	2,358	2,131	2,177	2,401	1,874	1,612	1,656	1,975	2,317	2,347

Tieto hodnoty sú v tabuľke zoradené na základe nami vytvorenej šablóny. V stĺpcoch 1 a 2 sú hodnoty koncentrácií z kalibračnej rady. V stĺpcoch 3 až 12 sú naše vzorky DMSO alebo DAPA, pričom každá vzorka je v dvoch riadkoch. Výsledné hodnoty sú vypočítané na základe rozdielu 2 hodnôt absorbancií.

- b) Následné sme od týchto hodnôt odčítali slepú vzorku (blanc) (Tab.12).

**Tabuľka 12: Hodnoty po odčítaní slepej vzorky**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>-0,024</b>	<b>0,0235</b>	1,7975	1,7945	2,0555	2,1635	1,5395	1,2665	1,1685	1,5075	1,7305	1,5055
<b>B</b>	<b>0,0725</b>	<b>0,0755</b>	1,8455	1,7935	2,0055	2,1755	1,5095	1,2675	1,1645	1,3755	1,7205	1,4085
<b>C</b>	<b>0,1925</b>	<b>0,1975</b>	2,1485	2,1095	2,0535	2,4915	2,0525	1,4835	1,3495	1,6905	1,9145	1,4345
<b>D</b>	<b>0,4165</b>	<b>0,3985</b>	2,0835	2,1085	2,1025	2,4325	2,0625	1,4685	1,4885	1,7525	1,8665	1,4235
<b>E</b>	<b>0,8105</b>	<b>0,8345</b>	2,0935	2,1295	2,0385	2,2235	1,8925	1,4685	1,4925	1,6695	1,8765	1,6915
<b>F</b>	<b>1,5615</b>	<b>1,7145</b>	2,1035	1,9015	2,1785	2,3085	1,9175	1,5275	1,5155	1,7105	1,9115	1,7545
<b>G</b>	<b>2,7435</b>	<b>2,7505</b>	2,2285	2,1055	2,0735	2,3755	1,8735	1,5885	1,7165	1,8695	2,2265	2,3335
<b>H</b>	<b>3,6915</b>	<b>3,7915</b>	2,2785	2,0515	2,0975	2,3215	1,7945	1,5325	1,5765	1,8955	2,2375	2,2675

Hodnoty v tabuľke sú zoradené na základe nami vytvorenej šablóny. V stĺpcoch 1 a 2 sú hodnoty koncentrácií z kalibračnej rady. V stĺpcoch 3 až 12 sú naše vzorky DMSO alebo DAPA, pričom každá vzorka je v dvoch riadkoch. Výsledné hodnoty sú výsledkom po odčítaní slepej vzorky od predchádzajúcich hodnôt.

- c) Potom sme hodnoty koncentrácií z dvoch meraní rovnakých vzoriek spriemerovali (Tab.13).

**Tabuľka 13: Spriemerované hodnoty koncentrácií**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>0,0000</b>		1,8215	1,794	2,0305	2,1695	1,5245	1,267	1,1665	1,4415	1,7255	1,457
<b>B</b>	<b>0,0740</b>											
<b>C</b>	<b>0,1950</b>		2,116	2,109	2,078	2,462	2,0575	1,476	1,419	1,7215	1,8905	1,429
<b>D</b>	<b>0,4075</b>											
<b>E</b>	<b>0,8225</b>		2,0985	2,0155	2,1085	2,266	1,905	1,498	1,504	1,69	1,894	1,723
<b>F</b>	<b>1,6380</b>											
<b>G</b>	<b>2,7470</b>		2,2535	2,0785	2,0855	2,3485	1,834	1,5605	1,6465	1,8825	2,232	2,3005
<b>H</b>	<b>3,7415</b>											

Tieto hodnoty sú v tabuľke zoradené na základe nami vytvorenej šablóny. V stĺpcoch 1 a 2 sú hodnoty koncentrácií z kalibračnej rady. V stĺpcoch 3 až 12 sú naše vzorky DMSO alebo DAPA. Výsledkom sú spriemerované hodnoty koncentrácií.

- d) Na záver sme spriemerované hodnoty koncentrácií vložili do softvéru AssayFit Pro, ktorý nám vytvoril 4-PL kalibračnú krivku, na základe ktorej vypočítal výsledné koncentrácie (Tab.14).

**Tabuľka 14: Výsledné hodnoty koncentrácií**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>0,0</b>		2255,3	2214,4	2582,9	2819,2	1836,2	1506,4	1384,2	1726,9	2114,5	1747,1
<b>B</b>	<b>93,0</b>											
<b>C</b>	<b>267,4</b>		2726,3	2714,4	2661,8	3377,0	2627,5	1771,9	1697,8	2108,8	2360,1	1710,7
<b>D</b>	<b>521,7</b>											
<b>E</b>	<b>986,0</b>		2696,5	2558,3	2713,5	2993,4	2382,6	1800,9	1808,9	2063,8	2365,5	2110,9
<b>F</b>	<b>1990,8</b>											
<b>G</b>	<b>4023,6</b>		2970,3	2662,7	2674,5	3149,7	2274,1	1884,5	2002,6	2347,8	2931,0	3057,9
<b>H</b>	<b>7977,7</b>											

Tieto hodnoty sú v tabuľke zoradené na základe nami vytvorenej šablóny. V stĺpcoch 1 a 2 sú hodnoty koncentrácií z kalibračnej rady. V radách 3 až 12 sú naše vzorky DMSO alebo DAPA. Výsledné hodnoty koncentrácií sme získali po vložení predchádzajúcich hodnôt do softvéru.



## 5 VÝSLEDKY

Výsledky v tejto práci uvádzame ako medián s interkvartilovým rozpätím. Mann-Whitney testom (neparametrický t-test) sme určili hladinu štatistickej významnosti ( $p$ ). Hodnota  $p \leq 0,05$  sa považuje za štatisticky významný rozdiel. Štatisticky významné hodnoty sa označujú symbolom „\*“, pričom platí, že: ns  $p > 0,05$ ; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Na vyhodnotenie výsledkov sme použili štatistický program GraphPad Prism verzia 9.0.2 (GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

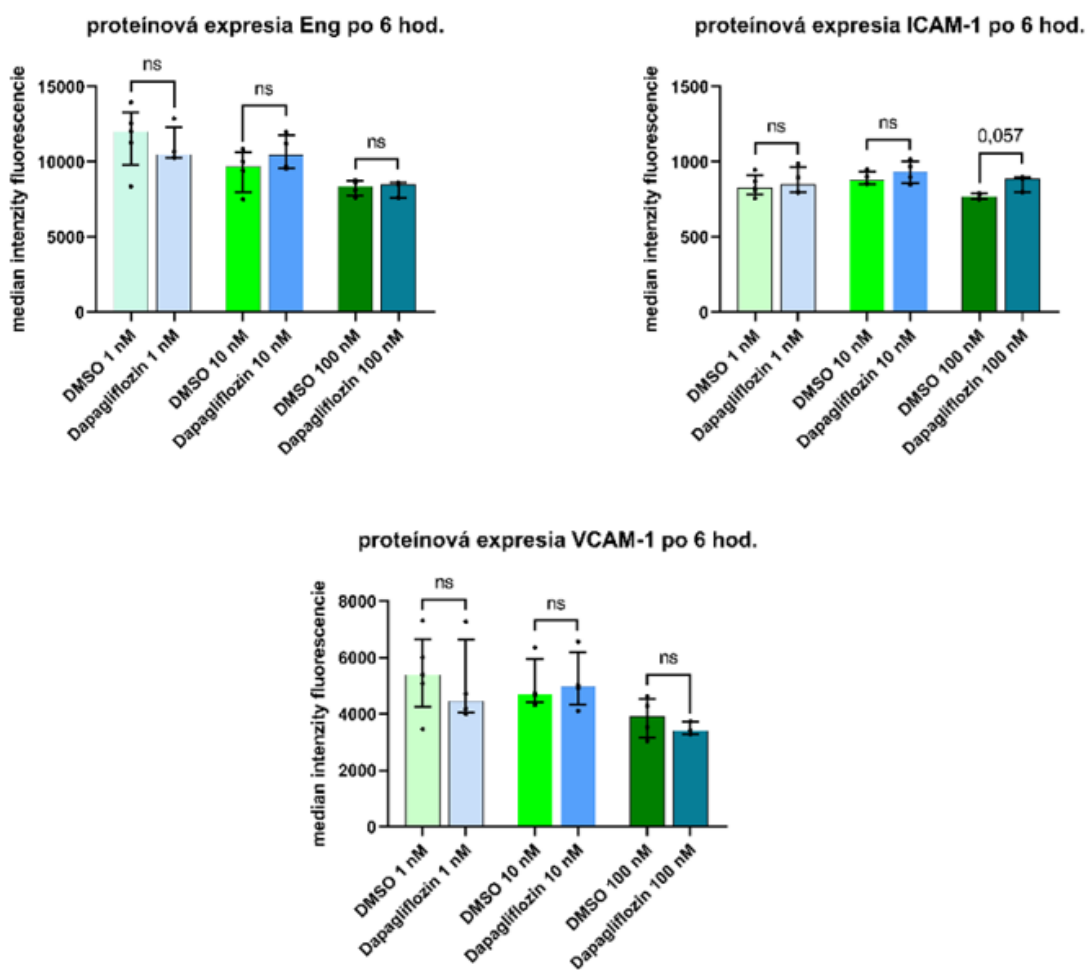
### 5.1 Počiatočné nastavenie koncentrácií a časov dapagliflozínu

Na začiatok sme si stanovili koncentrácie a časy, pri ktorých sme očakávali významné zmeny v hladinách proteínov. Použili sme logaritmickú radu koncentrácií 1nM, 10nM a 100nM a merania sme vykonali po 6, 12 a 24 hodinách.

U proteínovej expresie Eng a VCAM-1 po 6 hodinách, sme nezaznamenali v žiadnych koncentráciách signifikantnú zmenu.

U proteínovej expresie ICAM-1 sme v koncentráciách 1nM a 10nM nedetekovali žiadnú signifikantnú zmenu. Pri **100nM** koncentrácií sme však namerali hraničnú hodnotu  $p=0,057$ , ktorá sa **blížila signifikancii**. Pri tejto hodnote sme pozorovali **mierne stúpajúce hladiny expresie ICAM-1** oproti kontrole (Graf č.1).

**Graf 1: Expresia proteínov po 6 hodinách**



Pomocou FC sme zmerali hladiny proteínov Eng, ICAM-1 a VCAM-1. Tieto proteínové hladiny sme porovnávali u diabetických koronárnych endotelových buniek medzi dvomi skupinami, a to DMSO (kontrola) a dapagliflozín (liečivo). Meranie sme vykonávali po 6 hodinovej premedikácii buniek pri koncentráciách 1nM, 10nM a 100nM. Proteínová expresia Eng, ICAM-1 a VCAM-1 je vyjadrená ako medián intenzity fluorescencie, pričom platí, že ns  $p > 0,05$ .

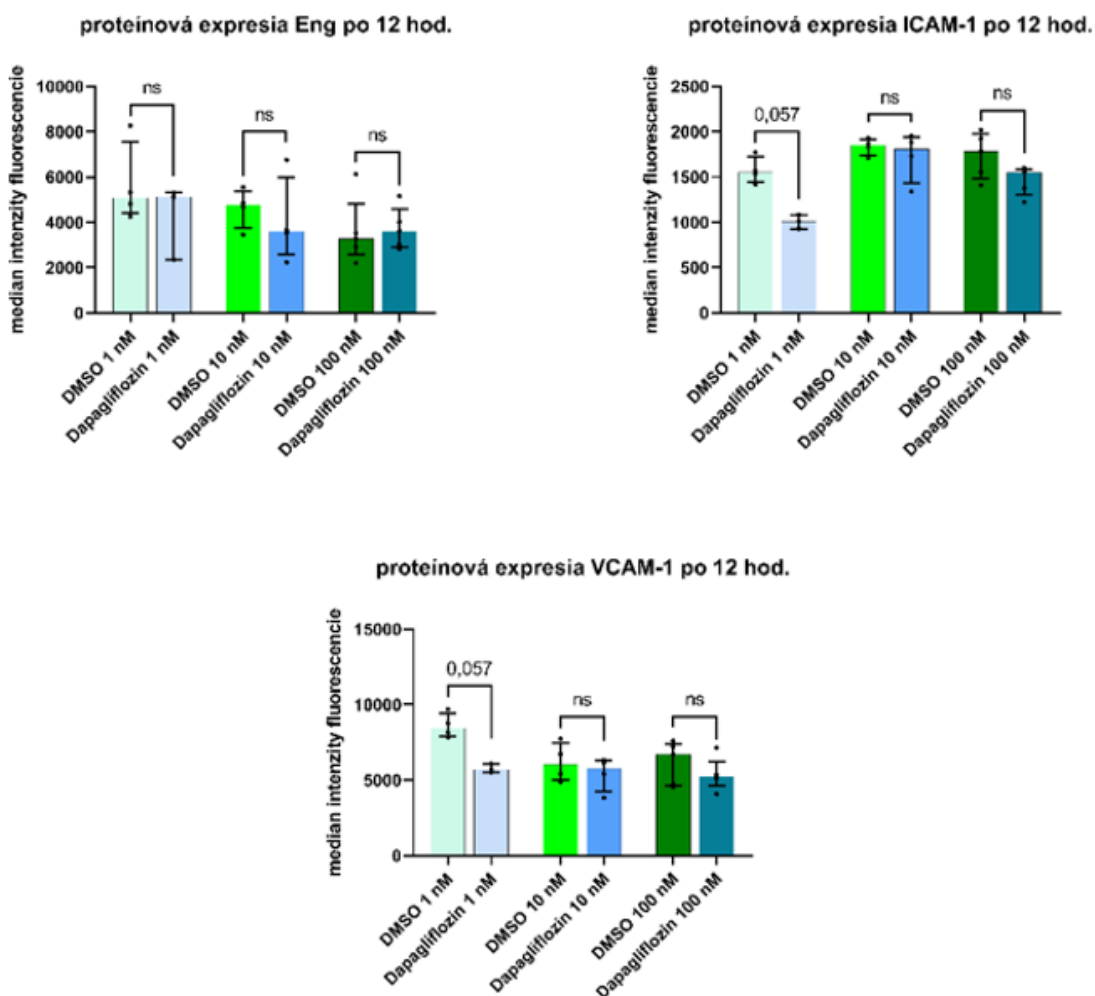
DMSO – dimethylsulfoxid, Eng – endoglin, ICAM-1 – intercelulárna bunková adhézna molekula -1, VCAM-1 – vaskulárna bunková adhézna molekula - 1

U proteínovej expresie Eng po 12 hodinách, sme nezaznamenali u žiadnej z meraných koncentrácií signifikantnú zmenu.

U proteínovej expresie ICAM-1 sme nezaznamenali signifikantnú zmenu v koncentráciách 10nM a 100nM, ale pri **1nM** koncentrácií sme namerali hraničnú hodnotu  $p=0,057$ . Pri tejto hodnote sme pozorovali **klesajúce hladiny expresie ICAM-1** oproti kontrole.

U expresie VCAM-1 sme nezaznamenali signifikantnú zmenu v koncentráciách 10nM a 100nM, ale pri koncentrácií **1nM** vykazovala hraničnú hodnotu  $p=0,057$ . Pri tejto hodnote sme pozorovali **pokles expresie VCAM-1** oproti kontrole (Graf č.2).

**Graf 2: Expresia proteínov po 12 hodinách**



Pomocou FC sme zmerali hladiny proteínov Eng, ICAM-1 a VCAM-1 u diabetických koronárnych endotelových buniek medzi dvomi skupinami, a to DMSO (kontrola) a dapagliflozín (liečivo). Meranie sme vykonávali po 12 hodinovej premedikácii buniek pri koncentráciách 1nM, 10nM a 100nM. Proteínová expresia Eng, ICAM-1 a VCAM-1 je vyjadrená ako medián intenzity fluorescence, pričom platí, že  $ns p > 0,05$ .

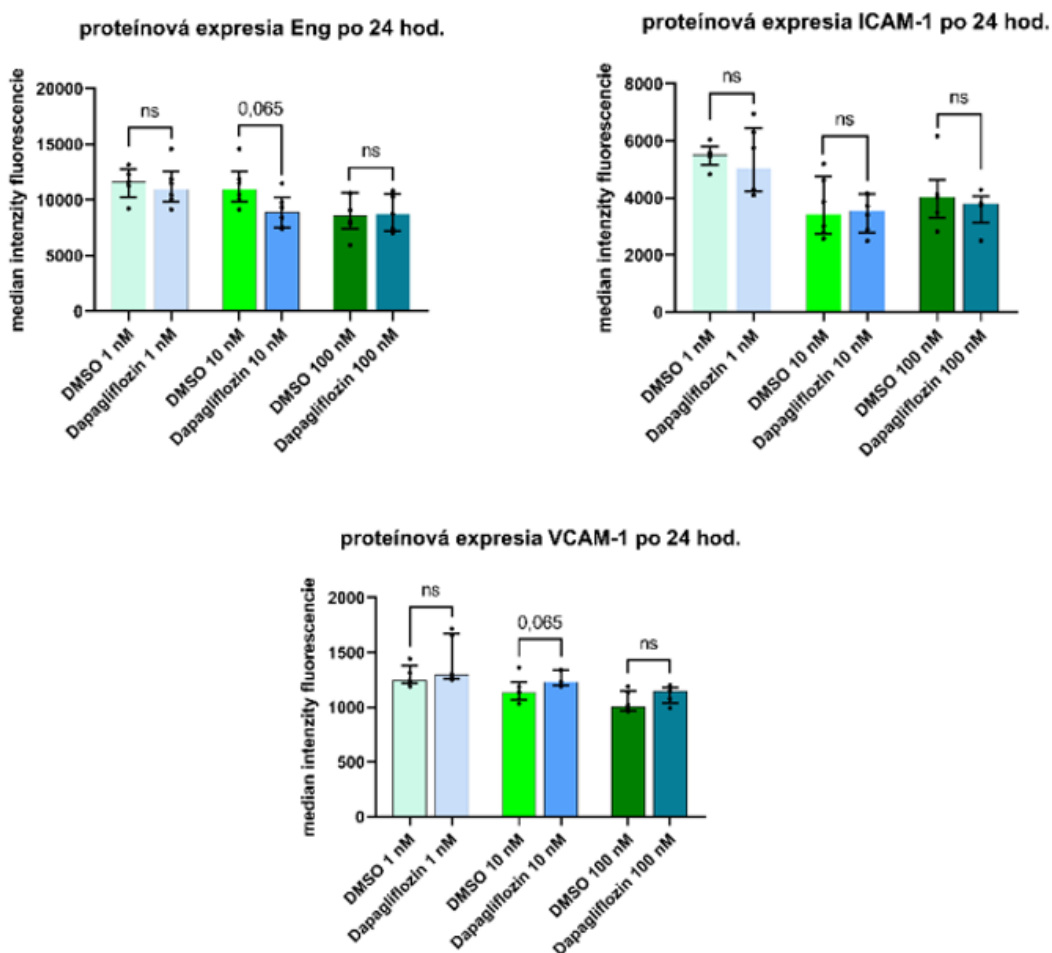
DMSO – dimethylsulfoxid, Eng – endoglin, ICAM-1 – intercelulárna bunková adhézna molekula -1, VCAM-1 – vaskulárna bunková adhézna molekula - 1

U proteínovej expresie Eng po 24 hodinách sme pri koncentráciách 1nM a 100nM nezaznamenali žiadnu významnú zmenu. **Pri 10nM** koncentrácií sme namerali hraničnú hodnotu  $p=0,065$ . Pri tejto hodnote sme pozorovali **klesajúce hladiny expresie Eng** oproti kontrole.

U proteínovej expresie ICAM-1 sme nezaznamenali žiadnu významnú zmenu u žiadnej z našich vybraných koncentrácií.

U proteínovej expresie VCAM-1 sme nezaznamenali žiadnu významnú zmenu pri koncentráciách 1nM a 100nM, ale koncentrácia **10nM** vykazovala hraničnú hodnotu  $p=0,065$ . Pri tejto hodnote sme pozorovali **mierny nárast expresie VCAM-1** oproti kontrole (Graf č.3).

**Graf 3: Expresia proteínov po 24 hodinách**



Zmerané hladiny proteínov Eng, ICAM-1 a VCAM-1 pomocou FC sme porovnávali u diabetických koronárnych endotelových buniek medzi dvomi skupinami, a to DMSO (kontrola) a dapagliflozín (liečivo). Meranie sme vykonávali po 24 hodinovej premedikácii buniek pri koncentráciách 1nM, 10nM a 100nM. Proteínová expresia Eng, ICAM-1 a VCAM-1 je vyjadrená ako medián intenzity fluorescence, pričom platí, že ns  $p > 0,05$ .

DMSO – dimethylsulfoxid, Eng – endoglin, ICAM-1 – intercelulárna bunková adhézna molekula -1, VCAM-1 – vaskulárna bunková adhézna molekula - 1

## 5.2 Optimalizácia experimentálnych podmienok

Na základe predchádzajúceho experimentu a jeho výsledkov sme si následne zvolili optimálnejšie koncentrácie a časy. Cieľom bolo zopakovať meranie s väčším počtom vzoriek u vybraných koncentrácií a časov, aby sme buď potvrdili alebo vyvrátili predchádzajúce výsledky.

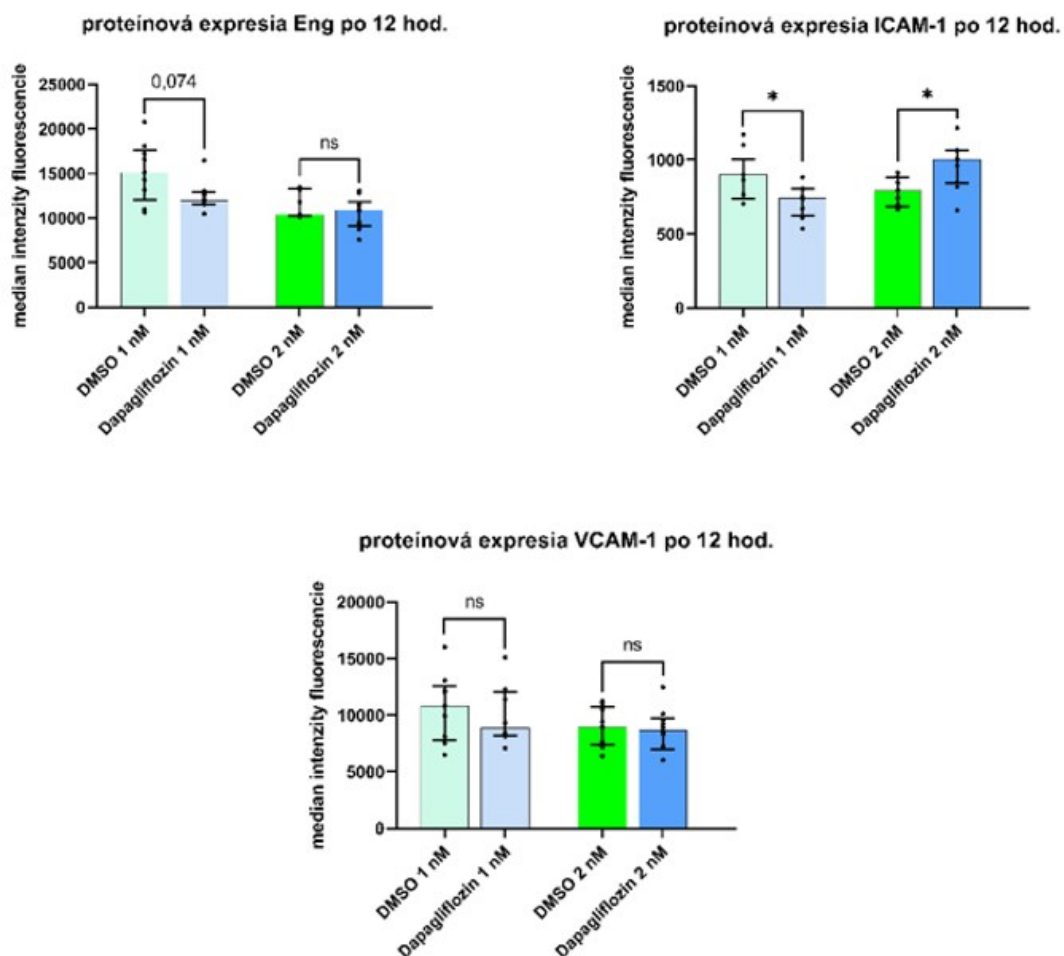
Vybrali sme koncentrácie 1nM a 2nM v čase 12 hodín, pretože z predchádzajúcich experimentov sa zdal byť tento čas najslubnejší. Ďalší testovaný čas bol 16 hodín, ktorý sa z hľadiska efektivity experimentu zdal najvhodnejší.

Po 12 hodinách sme u proteínovej expresie Eng nedetekovali žiadnu signifikantnú zmenu pri 2nM koncentrácií, ale **pri 1nM** koncentrácií sme namerali hraničnú hodnotu  $p=0,074$ . Pri tejto hodnote sme pozorovali **klesajúce hladiny expresie Eng** oproti kontrole (Graf č.4).

U proteínovej expresie ICAM-1 sme namerali signifikantné zmeny pri oboch koncentráciách. Pri **1nM** koncentrácií signifikantne **poklesla expresia ICAM-1** a pri **2nM** koncentrácií naopak signifikantne **stúpila expresia ICAM-1** oproti kontrole (Graf č.4).

U proteínovej expresie VCAM-1 sme v týchto časoch a koncentráciách nedetekovali žiadnu signifikantnú zmenu (Graf č.4).

**Graf 4: Expresia proteínov po 12 hodinách**



Zmerané hladiny proteínov Eng, ICAM-1 a VCAM-1 pomocou FC sme porovnávali u diabetických koronárnych endotelových buniek medzi dvomi skupinami, a to DMSO (kontrola) a dapagliflozín (liečivo). Meranie sme vykonávali po 12 hodinovej premedikácii buniek pri koncentráciách 1nM a 2nM. Proteínová expresia Eng, ICAM-1 a VCAM-1 je vyjadrená ako medián intenzity fluorescence, pričom platí, že ns  $p > 0,05$ ; \*  $p \leq 0,05$ .

DMSO – dimethylsulfoxid, Eng – endoglin, ICAM-1 – intercelulárna bunková adhézna molekula -1, VCAM-1 – vaskulárna bunková adhézna molekula - 1

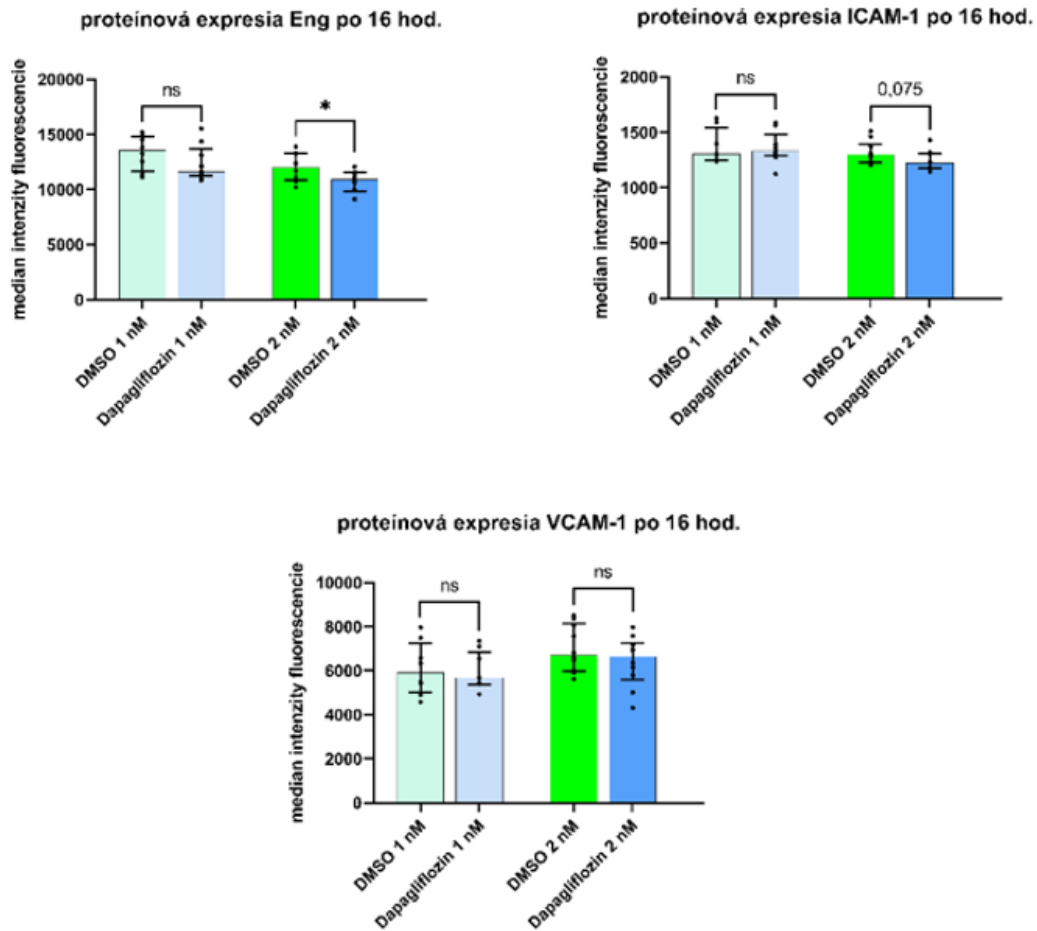


Po 16 hodinách sme nezaznamenali signifikantnú zmenu v proteínovej expresii Eng pri 1nM koncentrácií. **Pri 2nM koncentrácií bola expresia Eng signifikantne znížená oproti kontrole** (Graf č.5).

U proteínovej expresie ICAM-1 sme nezaznamenali signifikantnú zmenu pri 1nM koncentrácií. Pri **2nM** koncentrácií sme namerali hraničnú hodnotu  $p=0,075$ , ktorá **bola znížená oproti kontrole** (Graf č.5).

U proteínovej expresie VCAM-1 sme v týchto časoch a koncentráciách nedetekovali žiadnu signifikantnú zmenu (Graf č.5).

**Graf 5: Expresia proteínov po 16 hodinách**



Zmerané hladiny proteínov Eng, ICAM-1 a VCAM-1 pomocou FC sme porovnávali u diabetických koronárnych endotelových buniek medzi dvomi skupinami, a to DMSO (kontrola) a dapagliflozín (liečivo). Meranie sme vykonávali po 16 hodinovej premedikácii buniek pri koncentráciách 1 nM a 2 nM. Proteínová expresia Eng, ICAM-1 a VCAM-1 je vyjadrená ako medián intenzity fluorescencie, pričom platí, že ns  $p > 0,05$ ; \*  $p \leq 0,05$ .

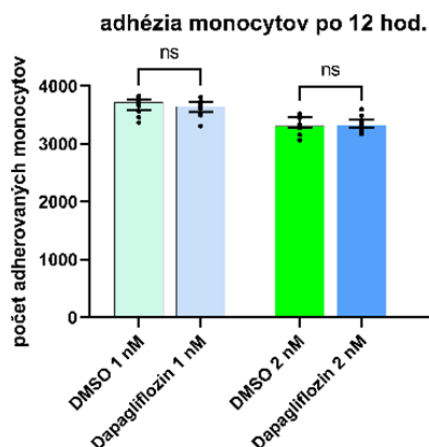
DMSO – dimethylsulfoxid, Eng – endogln, ICAM-1 – intercelulárna bunková adhézna molekula -1, VCAM-1 – vaskulárna bunková adhézna molekula - 1

### 5.3 Funkčná analýza

Pomocou FC sme tiež sledovali adhéziu THP-1 k EC. Pracovali sme s koncentráciami 1nM a 2nM DMSO a *dapagliflozínu* v čase 12 hodín. Tieto koncentrácie a čas sme vybrali na základe predchádzajúcich výsledkov, ktoré boli najslubnejšie (Graf č.6).

Zistili sme, že v tomto čase a v týchto koncentráciách nemal dapagliflozín signifikantný vplyv na adhéziu THP-1 k EC.

**Graf 6: Adhézia THP-1 k EC po 12 hodinách**



Graf ukazuje mieru adhézie THP-1 k EC po 12 hodinovej premedikácii buniek pri 1nM a 2nM koncentrácií DMSO/dapagliflozín. Adhézia THP-1 k EC je vyjadrená ako počet adherovaných monocytov, pričom platí, že  $ns p > 0,05$ .

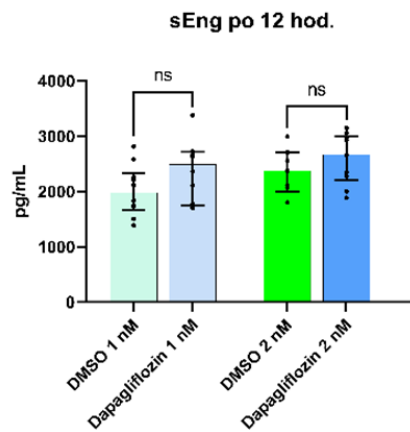
DMSO – dimethylsulfoxid

### 5.4 Analýza sEng

Pomocou metódy ELISA sme merali hladinu sEng po 12 hodinovej premedikácii v koncentráciách 1nM a 2nM (Graf č.7).

Zistili sme, že v tomto čase a v týchto koncentráciách nemal dapagliflozín signifikantný vplyv na hladinu sEng.

**Graf 7: Hladina sEng po 12 hodinovej premedikácii**



Graf zobrazuje hladinu sEng po 12 hodinovej premedikácii pomocou 1nM a 2nM DMSO/ dapagliflozín. Hladina sEng je vyjadrená v pg/ml, pričom platí, že  $ns p > 0,05$ .

DMSO – dimethylsulfoxid

## 6 DISKUSIA

Ľudský Eng je homodimérny transmembránový glykoproteín (18), ktorý je ko-receptor pre členov superrodiny transformujúceho rastového faktora  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Je exprimovaný v endotelových bunkách, aktivovaných monocytoch, makrofágoch a ďalších. Je spojený s pozitívnou reguláciou endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS) v endotelových bunkách, a preto ho možno považovať za vazoprotektívnu látku (48, 49). Predpokladá sa však, že Eng sa podieľa aj na zápalovej infiltrácii leukocytov cez endotel, a teda zohráva negatívnu úlohu pri dysfunkcii endotelu (7).

Bolo publikované, že plazmatická koncentrácia sEng by mohla slúžiť ako indikátor patológií spojených s diabetes mellitus, ako je hypertenzia, ED či ateroskleróza (59). Na druhej strane bolo ukázané, že aj sEng môže prostredníctvom RGD peptidu interagovať s integrínmi na leukocytoch a teda zohrávať protektívnu úlohu u transendotelovej migrácie leukocytov (7).

Napriek tomu, že úloha Eng pri hyperglykémii a DM nie je úplne preskúmaná, existuje niekoľko štúdií, ktoré sa zaoberajú touto problematikou (128). Zistilo sa, že sEng je zvýšený u pacientov s pokročilým DM a jeho koncentrácia koreluje so závažnosťou diabetickej nefropatie (63, 131), diabetickej retinopatie (59) a diabetickej neuropatie (61). Okrem toho Cawyer a kol. preukázali, že vysoké hladiny glukózy tiež významne zvýšili hladiny sEng (133).

Dapagliflozín, ktorý patrí medzi inhibítory SGLT-2, je antidiabetikum, ktoré sa používa predovšetkým na liečbu DM2 (14-16). Inhibítory SGLT-2 znižujú reabsorpciu glukózy v obličkách a podporujú jej vylučovanie močom, čím znižujú hladinu glukózy nezávisle od pôsobenia inzulínu (14, 15).

V tejto diplomovej práci bolo naším cieľom zistiť, ako vplyva dapagliflozín na expresiu a funkciu Eng a s ním súvisiacich biomarkerov ED, u ľudských diabetickej koronárnych buniek.

Preukázali sme, že 1nM koncentrácia dapagliflozínu počas 12-hodinovej premedikácie viedla k signifikantnému zníženiu proteínovej expresie ICAM-1 a k

hraničnému zníženiu expresie proteínu VCAM-1 ( $p=0,057$ ), čo súhlasí s publikovanými štúdiami týkajúcimi sa pleiotropných účinkov dapagliflozínu (173). Teraz sme prvýkrát ukázali, že aj proteínová expresia Eng sa významne znižuje počas premedikácie nízkymi koncentráciami dapagliflozínu počas 12 alebo 16 hodín.

Rossi a kol. ukázali, že Eng zohráva dôležitú úlohu pri transendotelovej migrácii leukocytov pri zápalových podmienkach (7). Je to spôsobené tým, že Eng obsahuje v extracelulárnej doméne peptid RGD, ktorý sa môže viazať na inegríny na povrchu leukocytov. V tejto práci sme skúmali, či dapagliflozín môže modulovať adhéziu THP-1 monocytov k EC znížením proteínovej expresie Eng. Ukázali sme, že v daných koncentráciách a časoch dapagliflozín nemal signifikantný vplyv na adhéziu monocytov. Toto môže byť vysvetlené napríklad tým, že proteínové hladiny Eng neboli znížené dostatočne na to, aby sa to prejavilo na procese adhézie monocytov na EC.

Bolo publikované, že hyperglykémia a diabetes mellitus sú asociované so zvýšenými hladinami sEng (132). Na základe tohto tvrdenia a nášho predchádzajúceho zistenia, že proteínová expresia Eng bola znížená, sme sa rozhodli preskúmať či dapagliflozín môže modulovať aj hladiny sEng. Zistili sme, že v daných koncentráciách a časoch nemal dapagliflozín žiadny významný vplyv na hladiny sEng. Podobne ako v prípade adhézie monocytov, to možno potenciálne vysvetliť tým, že proteínové hladiny membránového Eng neboli znížené dostatočne na to, aby sa to prejavilo na hladinách sEng.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či dapagliflozín môže mať vplyv na expresiu a funkciu Eng a biomarkery endotelovej dysfunkcie ICAM-1 a VCAM-1, vo vybraných časoch a koncentráciách u diabetických buniek. Zistili sme, že dapagliflozín v nízkych koncentráciách môže znižovať proteínovú expresiu Eng a bunkových adhézných molekúl ICAM-1 a VCAM-1. Zníženie proteínovej expresie týchto molekúl však pravdepodobne nebolo dostatočné na to, aby sa to prejavilo na procese adhézie monocytov k endotelu či na štiepení membránového Eng na jeho solubilnú formu. Avšak ďalšie štúdie sú potrebné na to, aby sme mohli s istotou povedať, že dapagliflozín má signifikantný vplyv na expresiu a funkciu Eng u diabetických koronárnych endotelových buniek.

## 7 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, ako dapagliflozín ovplyvňuje expresiu a funkciu endogénu a súvisiacich biomarkerov endotelovej dysfunkcie (ICAM-1, VCAM-1), v rôznych časoch a koncentráciách u ľudských diabetických koronárnych endotelových buniek.

Preukázali sme, že nízke koncentrácie dapagliflozínu môžu viesť k hranične zníženej proteínovej expresii Eng a VCAM-1 a k významnej zníženej proteínovej expresii ICAM-1. Proteínová expresia Eng však pravdepodobne nebola znížená dostatočne na to, aby to malo významný vplyv na adhéziu monocytov k endotelovým bunkám, ani na tvorbu sEng, ktorý vzniká enzymatickým štiepením membránového Eng.

Na to, aby sme mohli potvrdiť, že dapagliflozín má významný vplyv na expresiu a funkciu Eng sú potrebné ďalšie *in vitro* a *in vivo* štúdie.

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

Skratka	Význam skratky	Slovenský význam skratky
<b>ALK 1-7</b>	activin receptor like kinase 1-7	kináza 1-7 podobná aktivínovému receptoru
<b>AMK</b>	amino acid	aminokyselina
<b>BMP9</b>	bone morphogenetic protein 9	kostný morfogenetický proteín 9
<b>CKD</b>	chronic kidney disease	chronická choroba obličiek
<b>CRP</b>	c-reactive protein	C-reaktívny proteín
<b>CVD</b>	cardiovascular disease	kardiovaskulárne ochorenie
<b>DAPA</b>	dapagliflozin	dapagliflozín
<b>DM</b>	diabetes mellitus	diabetes mellitus
<b>DM1</b>	diabetes mellitus type 1	diabetes mellitus typu 1
<b>DM2</b>	diabetes mellitus type 2	diabetes mellitus typu 2
<b>DM-HCAEC</b>	diabetic human coronary artery endothelial cells	ľudské diabetické koronárne endotelové bunky
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide	dimetylsulfoxid
<b>EC</b>	endothelial cells	endotelové bunky
<b>ED</b>	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkcia
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay	enzýmovo značený imunosorbentný test
<b>Eng</b>	endoglin	endoglin
<b>eNOS</b>	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
<b>FBS</b>	fetal bovine serum	fetálne hovädzie sérum
<b>FC</b>	flow cytometry	prietoková cytometria
<b>FCS</b>	forward scatter	priamy rozptyl
<b>GC</b>	guanylate cyclase	guanylátcykláza
<b>HAEC</b>	human aortic endothelial cells	ľudské endotelové bunky aorty
<b>HCAEC</b>	human coronary artery endothelial cells	ľudské endotelové bunky koronárnych artérií
<b>HF</b>	heart failure	srdcové zlyhanie
<b>HHT</b>	hereditary hemorrhagic telangiectasia	hereditárna hemoragická teleangiektázia
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	hypoxia-inducible factor 1 alpha	hypoxiou indukovaný faktor 1 alfa
<b>HMVEC</b>	human microvascular endothelial cells	ľudské mikrovaskulárne endotelové bunky
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase	chrenová peroxidáza
<b>HUVEC</b>	human umbilical vein endothelial cells	endotelové bunky ľudskej pupočníkovej žily
<b>ICAM-1</b>	intercellular adhesion molecule 1	intercelulárna bunková adhézna molekula-1
<b>IL1<math>\beta</math></b>	interleukin 1 beta	interleukín 1 beta



<b>IL6</b>	interleukin 6	interleukín 6
<b>KLF6</b>	Kruppel-like factor 6	faktor 6 podobný Krueppelovi
<b>L-Eng</b>	long-endoglin	dlhý endoglin
<b>LXR</b>	liver X nuclear receptor	pečnový X jadrový receptor
<b>MMP</b>	matrix metalloproteinase	matricová metaloproteináza
<b>MMP 12</b>	matrix metalloproteinase 12	matricová metaloproteináza 12
<b>MMP 14</b>	matrix metalloproteinase 14	matricová metaloproteináza 14
<b>NF-κB</b>	nuclear factor kappa B	nukleárny faktor kappa B
<b>NO</b>	nitric oxide	oxid dusnatý
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline	fosfátový tlmivý roztok
<b>RGD</b>	arginyl-glycyl-aspartic acid	arginin-glycin-asparágová kyselina
<b>ROS</b>	reactive oxygen species	reaktívne formy kyslíku
<b>sEng</b>	soluble endoglin	solubilný endoglin
<b>S-Eng</b>	short-endoglin	krátky endoglin
<b>SGLT-2</b>	sodium-glucose cotransporter-2	sodno-glukózový kotransportér-2
<b>Sp1</b>	specificity protein 1	špecifický proteín 1
<b>SSC</b>	side scatter	bočný rozptyl
<b>TGFβ</b>	transforming growth factor beta	transformujúci rastový faktor beta
<b>THP-1</b>	human leukemia monocytic cell line	ľudská monocytárna leukemická bunková línia
<b>TNFα</b>	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrotizujúci faktor alfa
<b>VCAM-1</b>	vascular cell adhesion molecule-1	vaskulárna bunková adhézna molekula-1
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor	vaskulárny endotelový rastový faktor
<b>ZP</b>	zona pellucida	zóna pellucida

## 9 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Štruktúra endoglínu.....	11
Obrázok 2: Úloha endoglínu v TGF $\beta$ signalizácií .....	14
Obrázok 3: Štiepenie endoglínu.....	16
Obrázok 4: Štruktúra arteriálnej steny .....	17
Obrázok 5: Biomarkery endotelovej dysfunkcie .....	20
Obrázok 6: Typy endotelových buniek.....	25
Obrázok 7: Klinické príznaky diabetes mellitus .....	26
Obrázok 8: Zdravý pankreas verzus pankreas u pacientov s DM1 a DM2 .....	28
Obrázok 9: Porovnanie glukózovej homeostázy v obličkách.....	32
Obrázok 10: Znázornenie prietokovej cytometrie .....	36
Obrázok 11: Priama ELISA .....	38
Obrázok 12: Nepriama ELISA.....	39
Obrázok 13: Sendvičová ELISA .....	40
Obrázok 14: Kompetetívna ELISA .....	41
Obrázok 15: Tvorba gatov .....	55
Obrázok 16: Stratégia tvorenia oblastí okolo buniek.....	56
Obrázok 17: Histogramy protilátok je popis .....	57
Obrázok 18: Graf kontroly pre EC.....	61
Obrázok 19: Graf kontroly pre značené THP-1 .....	62
Obrázok 20: Grafy pre 1nM DMSO.....	63
Obrázok 21: Príprava vzoriek na kalibračnú krivku .....	66
Obrázok 22: Zmena farby po pridaní roztoku na zastavenie reakcie.....	69

## 10 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Experimentálny dizajn premedikácie – 6,12 a 24 hodín .....	47
Tabuľka 2: Kontrolné skupiny pre experiment 6,12 a 24 hodín .....	47
Tabuľka 3: Experimentálny dizajn premedikácie - 12 a 16 hodín.....	49
Tabuľka 4: Kontrolné skupiny pre experiment 12 a 16 hodín .....	49
Tabuľka 5: Experimentálny dizajn premedikácie u metódy adhézie .....	50
Tabuľka 6: Príprava jednofarebných kontrol (1.experimentálny dizajn) ...	52
Tabuľka 7: Príprava mastermixu (1.experimentálny dizajn) .....	52
Tabuľka 8: Príprava jednofarebných kontrol (2.experimentálny dizajn) ...	53
Tabuľka 9: Príprava mastermixu (2.experimentálny dizajn) .....	53
Tabuľka 10: Šablóna dosky u ELISA .....	67
Tabuľka 11: Výsledné hodnoty rozdielu absorbancií 540nm a 450 nm .....	70
Tabuľka 12: Hodnoty po odčítaní slepej vzorky .....	70
Tabuľka 13: Spriemerované hodnoty koncentrácií .....	71
Tabuľka 14: Výsledné hodnoty koncentrácií .....	72

## 11 ZOZNAM GRAFOV

<b>Graf 1: Expresia proteínov po 6 hodinách .....</b>	<b>74</b>
<b>Graf 2: Expresia proteínov po 12 hodinách .....</b>	<b>76</b>
<b>Graf 3: Expresia proteínov po 24 hodinách .....</b>	<b>78</b>
<b>Graf 4: Expresia proteínov po 12 hodinách .....</b>	<b>80</b>
<b>Graf 5: Expresia proteínov po 16 hodinách .....</b>	<b>82</b>
<b>Graf 6: Adhézia THP-1 k EC po 12 hodinách .....</b>	<b>83</b>
<b>Graf 7: Hladina sEng po 12 hodinovej premedikácii .....</b>	<b>84</b>

## 12 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;224(1):4-11.
2. Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, Bernabeu C, Marceau G, Saru JP, et al. Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod*. 2008;78(6):968-75.
3. Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2010;70(10):4141-50.
4. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*. 2008;11(1):79-89.
5. Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E, Goumans MJ, Heldin CH, et al. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;392(3):283-8.
6. Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des*. 2003;9(29):2385-402.
7. Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, et al. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood*. 2013;121(2):403-15.
8. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93(1):105-13.
9. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
10. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.

11. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2006;29 Suppl 1:S43-8.
12. Diagnosis TECot, Mellitus CoD. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20(7):1183-97.
13. Meng W, Ellsworth BA, Nirschl AA, McCann PJ, Patel M, Girotra RN, et al. Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem*. 2008;51(5):1145-9.
14. Hsia DS, Grove O, Cefalu WT. An update on sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017;24(1):73-9.
15. Wilding J, Fernando K, Milne N, Evans M, Ali A, Bain S, et al. SGLT2 Inhibitors in Type 2 Diabetes Management: Key Evidence and Implications for Clinical Practice. *Diabetes Ther*. 2018;9(5):1757-73.
16. Scheen AJ. Pharmacodynamics, efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2015;75(1):33-59.
17. Oujo B, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Curr Mol Med*. 2013;13(8):1345-57.
18. Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol*. 1988;141(6):1925-33.
19. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(27):19027-30.
20. Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M, et al. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth

factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(12):2546-52.

21. Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, et al. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol.* 1992;22(2):393-7.

22. St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. 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.* 1994;134(6):2645-57.

23. Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem.* 2005;280(4):3078-87.

24. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1990;265(15):8361-4.

25. Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol.* 2007;365(3):694-705.

26. Velasco S, Alvarez-Munoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, et al. L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 6):913-9.

27. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, et al. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res.* 2008;103(12):1383-92.

28. Vicen M, Igreja Sa IC, Tripska K, Vitverova B, Najmanova I, Eissazadeh S, et al. Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(6):2405-18.

29. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, et al. Transcriptional activation of endoglin and transforming

growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood*. 2002;100(12):4001-10.

30. Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Gonzalez-Nunez M, Llano E, et al. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. 2012;126(22):2612-24.

31. Ollauri-Ibanez C, Lopez-Novoa JM, Pericacho M. Endoglin-based biological therapy in the treatment of angiogenesis-dependent pathologies. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17(9):1053-63.

32. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(46):43799-808.

33. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*. 2008;412(3):477-84.

34. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood*. 1998;92(12):4677-90.

35. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A, Bernabeu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34486-94.

36. Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, et al. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9500-5.

37. Suzuki T, Yamamoto T, Kurabayashi M, Nagai R, Yazaki Y, Horikoshi M. Isolation and initial characterization of GBF, a novel DNA-binding zinc finger protein that binds to the GC-rich binding sites of the HIV-1 promoter. *J Biochem*. 1998;124(2):389-95.



38. Zhang Y, Lei CQ, Hu YH, Xia T, Li M, Zhong B, et al. Kruppel-like factor 6 is a co-activator of NF-kappaB that mediates p65-dependent transcription of selected downstream genes. *J Biol Chem.* 2014;289(18):12876-85.
39. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 2006;12(6):642-9.
40. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(10):954-73.
41. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(7):1931-7.
42. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003;17(9):984-92.
43. Townson SA, Martinez-Hackert E, Greppi C, Lowden P, Sako D, Liu J, et al. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem.* 2012;287(33):27313-25.
44. Paauwe M, ten Dijke P, Hawinkels LJ. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(4):421-35.
45. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7(4):327-39.
46. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390(6659):465-71.
47. Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(6):233-51.
48. Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, et al. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res.* 2005;96(6):684-92.

49. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 2004;18(3):609-11.
50. Yamada Y, Yokoyama S-i, Wang X-D, Fukuda N, Takakura N. Cardiac stem cells in brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow nonhematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes. *Stem Cells.* 2007;25(5):1326-33.
51. Mercado-Pimentel ME, Hubbard AD, Runyan RB. Endoglin and Alk5 regulate epithelial–mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Developmental biology.* 2007;304(1):420-32.
52. Perlingeiro RC. Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. 2007.
53. van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, et al. Endoglin has a crucial role in blood cell–mediated vascular repair. *Circulation.* 2006;114(21):2288-97.
54. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science.* 1999;284(5419):1534-7.
55. Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The Journal of clinical investigation.* 1999;104(10):1343-51.
56. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, et al. Endoglin, an ancillary TGF $\beta$  receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Developmental biology.* 2000;217(1):42-53.
57. Guttmacher AE, Marchuk DA, White Jr RI. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *New England Journal of Medicine.* 1995;333(14):918-24.

58. Prigoda NL, Savas S, Abdalla SA, Piovesan B, Rushlow D, Vandezande K, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *Journal of medical genetics*. 2006;43(9):722-8.
59. Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med*. 2010;8:86.
60. Tual-Chalot S, Garcia-Collado M, Redgrave RE, Singh E, Davison B, Park C, et al. Loss of Endothelial Endoglin Promotes High-Output Heart Failure Through Peripheral Arteriovenous Shunting Driven by VEGF Signaling. *Circ Res*. 2020;126(2):243-57.
61. Bilir B, Ekiz Bilir B, Yilmaz I, Soysal Atilen N, Yildirim T, Kara SP, et al. Association of apelin, endoglin and endocan with diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(5):892-8.
62. Igreja Sa IC, Tripska K, Hroch M, Hyspler R, Ticha A, Lastuvkova H, et al. Soluble Endoglin as a Potential Biomarker of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Development, Participating in Aggravation of NASH-Related Changes in Mouse Liver. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
63. Ekiz-Bilir B, Bilir B, Aydin M, Soysal-Atilen N. Evaluation of endocan and endoglin levels in chronic kidney disease due to diabetes mellitus. *Arch Med Sci*. 2019;15(1):86-91.
64. Florey. The endothelial cell. *Br Med J*. 1966;2(5512):487-90.
65. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003;196(3):430-43.
66. Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994;343(1304):225-46.
67. Konukoglu D, Uzun H. Hypertension: from basic research to clinical practice. Springer; 2016.

68. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J*. 2010;4:302-12.
69. Kruger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
70. Medina-Leyte DJ, Zepeda-Garcia O, Dominguez-Perez M, Gonzalez-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8).
71. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(2):325-33.
72. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990;323(1):27-36.
73. Nakayama T. Prostacyclin analogues: prevention of cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2006;4(4):351-9.
74. Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*. 2011;164(3):839-52.
75. Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol*. 1998;82(10A):3S-4S.
76. McCarron RM, Wang L, Stanimirovic DB, Spatz M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett*. 1993;156(1-2):31-4.
77. Stern DM, Esposito C, Gerlach H, Gerlach M, Ryan J, Handley D, et al. Endothelium and regulation of coagulation. *Diabetes Care*. 1991;14(2):160-6.
78. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057-69.

79. Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu MR, Montagnani M. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2009;16(1):94-112.
80. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986;250(5 Pt 2):H822-7.
81. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003;108(16):1917-23.
82. Wautier JL, Wautier MP. Endothelial Cell Participation in Inflammatory Reaction. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12).
83. Osman R, L'Allier PL, Elgharib N, Tardif JC. Critical appraisal of C-reactive protein throughout the spectrum of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(3):221-37.
84. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):803-15.
85. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
86. Zhang J, Defelice AF, Hanig JP, Colatsky T. Biomarkers of endothelial cell activation serve as potential surrogate markers for drug-induced vascular injury. *Toxicol Pathol.* 2010;38(6):856-71.
87. Zhang J, Hanig JP, De Felice AF. Biomarkers of endothelial cell activation: candidate markers for drug-induced vasculitis in patients or drug-induced vascular injury in animals. *Vascul Pharmacol.* 2012;56(1-2):14-25.
88. Auvinen K, Jalkanen S, Salmi M. Expression and function of endothelial selectins during human development. *Immunology.* 2014;143(3):406-15.
89. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994;144(5):952-61.

90. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(6):1607-38.
91. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 1989;59(6):1203-11.
92. Garin G, Berk BC. Flow-mediated signaling modulates endothelial cell phenotype. *Endothelium*. 2006;13(6):375-84.
93. Cerutti C, Ridley AJ. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res*. 2017;358(1):31-8.
94. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(9):1379-86.
95. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 2009;61(1):22-32.
96. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;96(12):4219-25.
97. Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet*. 2001;358(9286):971-6.
98. Rossi E, Pericacho M, Bachelot-Loza C, Pidard D, Gaussem P, Poirault-Chassac S, et al. Human endoglin as a potential new partner involved in platelet-endothelium interactions. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(7):1269-84.
99. Sommariva E, Stadiotti I, Perrucci GL, Tondo C, Pompilio G. Cell models of arrhythmogenic cardiomyopathy: advances and opportunities. *Dis Model Mech*. 2017;10(7):823-35.

100. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
101. Wistuba, II, Behrens C, Milchgrub S, Syed S, Ahmadian M, Virmani AK, et al. Comparison of features of human breast cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res*. 1998;4(12):2931-8.
102. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*. 2000;24(3):227-35.
103. Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(6):1110-22.
104. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(3):443-50.
105. Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res*. 2006;5(4):862-78.
106. Lippi M, Stadiotti I, Pompilio G, Sommariva E. Human Cell Modeling for Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):6388.
107. Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Applied Sciences*. 2020;10(3):938.
108. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdoille M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*. 2007;2(3):481-5.

109. Torres-Vazquez J, Kamei M, Weinstein BM. Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):43-59.
110. Deng DX, Tsalenko A, Vailaya A, Ben-Dor A, Kundu R, Estay I, et al. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ Res.* 2006;98(2):200-8.
111. Donnini D, Perrella G, Stel G, Ambesi-Impiombato FS, Curcio F. A new model of human aortic endothelial cells in vitro. *Biochimie.* 2000;82(12):1107-14.
112. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 1992;99(6):683-90.
113. Jackson CJ, Nguyen M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(10):1167-77.
114. Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Unger RE, Peters K, Lehr HA, Kirkpatrick CJ. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest.* 2001;81(12):1717-27.
115. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Current Pharmaceutical Design.* 2003;9(7):521-30.
116. Weis M, Schlichting CL, Engleman EG, Cooke JP. Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(11):1817-23.
117. Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological Reviews.* 2003;83(1):183-252.
118. Van Nieuw Amerongen GP, Van Hinsbergh VWM. Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vascular Pharmacology.* 2002;39(4-5):257-72.
119. Iwasaki T, Kanda T, Mizusawa H. Effects of pericytes and various cytokines on integrity of endothelial monolayer originated from blood-nerve



barrier: An in vitro study. Journal of Medical and Dental Sciences. 1999;46(1):31-40.

120. Clonetics™ Umbilical Vein Endothelial Cell Systems [https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/CH/en/document/31532](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/document/31532). Accessed 15.04.2023

121. Wilhelmsen K, Farrar K, Hellman J. Quantitative in vitro assay to measure neutrophil adhesion to activated primary human microvascular endothelial cells under static conditions. J Vis Exp. 2013(78):e50677.

122. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2006;29(1):S43.

123. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 1997;20(7):1183-97.

124. Pavkov ME, Collins AJ, Coresh J, Nelson RG. Kidney Disease in Diabetes. In: Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, Cissell MA, Eberhardt MS, Meigs JB, et al., editors. Diabetes in America. 3rd ed. Bethesda (MD)2018.

125. Type 2 diabetes. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/type-2-diabetes/>. Accessed 31.04.2023

126. International Expert C. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. Diabetes Care. 2009;32(7):1327-34.

127. Moghissi ES, Korytkowski MT, DiNardo M, Einhorn D, Hellman R, Hirsch IB, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American Diabetes Association consensus statement on inpatient glycemic control. Diabetes Care. 2009;32(6):1119-31.

128. Alvarez-Munoz P, Mauer M, Kim Y, Rich SS, Miller ME, Russell GB, et al. Cellular basis of diabetic nephropathy: V. Endoglin expression levels and diabetic nephropathy risk in patients with Type 1 diabetes. J Diabetes Complications. 2010;24(4):242-9.

129. La Sala L, Pujadas G, De Nigris V, Canivell S, Novials A, Genovese S, et al. Oscillating glucose and constant high glucose induce endoglin expression in endothelial cells: the role of oxidative stress. *Acta Diabetol.* 2015;52(3):505-12.
130. Tripska K, Igreja Sa IC, Vasinova M, Vicen M, Havelek R, Eissazadeh S, et al. Monoclonal anti-endoglin antibody TRC105 (carotuximab) prevents hypercholesterolemia and hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:845918.
131. Doghish AS, Bassyouni AA, Mahfouz MH, Abd El-Aziz HG, Zakaria RY. Plasma endoglin in Type2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(1):764-8.
132. Ceriello A, La Sala L, De Nigris V, Pujadas G, Testa R, Uccellatore A, et al. GLP-1 reduces metalloproteinase-14 and soluble endoglin induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes. *Endocrine.* 2015;50(2):508-11.
133. Cawyer CR, Horvat D, Leonard D, Allen SR, Jones RO, Zawieja DC, et al. Hyperglycemia impairs cytotrophoblast function via stress signaling. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(5):541 e1-8.
134. Obermeier M, Yao M, Khanna A, Koplowitz B, Zhu M, Li W, et al. In vitro characterization and pharmacokinetics of dapagliflozin (BMS-512148), a potent sodium-glucose cotransporter type II inhibitor, in animals and humans. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(3):405-14.
135. Kasichayanula S, Liu X, Lacreata F, Griffen SC, Boulton DW. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of dapagliflozin, a selective inhibitor of sodium-glucose co-transporter type 2. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(1):17-27.
136. Plosker GL. Dapagliflozin: a review of its use in type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 2012;72(17):2289-312.
137. Patel DK, Strong J. The Pleiotropic Effects of Sodium–Glucose Cotransporter-2 Inhibitors: Beyond the Glycemic Benefit. *Diabetes Therapy.* 2019;10(5):1771-92.

138. Halimi S, Vergès B. Adverse effects and safety of SGLT-2 inhibitors. *Diabetes & Metabolism*. 2014;40(6, Supplement 1):S28-S34.
139. Oliva RV, Bakris GL. Blood pressure effects of sodium–glucose co-transport 2 (SGLT2) inhibitors. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2014;8(5):330-9.
140. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Bonaca MP, et al. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *The Lancet*. 2019;393(10166):31-9.
141. McGuire DK, Shih WJ, Cosentino F, Charbonnel B, Cherney DZ, Dagogo-Jack S, et al. Association of SGLT2 inhibitors with cardiovascular and kidney outcomes in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *JAMA cardiology*. 2021;6(2):148-58.
142. Zelniker TA, Braunwald E. Mechanisms of cardiorenal effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: JACC state-of-the-art review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;75(4):422-34.
143. Heerspink HJ, Perkins BA, Fitchett DH, Husain M, Cherney DZ. Sodium glucose cotransporter 2 inhibitors in the treatment of diabetes mellitus: cardiovascular and kidney effects, potential mechanisms, and clinical applications. *Circulation*. 2016;134(10):752-72.
144. Lopaschuk GD, Verma S. Mechanisms of cardiovascular benefits of sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: a state-of-the-art review. *Basic to Translational Science*. 2020;5(6):632-44.
145. Cavaiola TS, Pettus J. Cardiovascular effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018;11:133-48.
146. Cowie MR, Fisher M. SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(12):761-72.
147. Vallon V, Verma S. Effects of SGLT2 Inhibitors on Kidney and Cardiovascular Function. *Annu Rev Physiol*. 2021;83:503-28.

148. Association AD. 9. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes-2020. *Diabetes care*. 2020;43(Suppl 1):S98-S110.
149. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes care*. 2018;41(12):2669-701.
150. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, et al. Consensus statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm—2019 executive summary. *Endocrine Practice*. 2019;25(1):69-101.
151. Verma S, McMurray JJ. SGLT2 inhibitors and mechanisms of cardiovascular benefit: a state-of-the-art review. *Diabetologia*. 2018;61:2108-17.
152. Wanner C. EMPA-REG OUTCOME: the nephrologist's point of view. *The American journal of cardiology*. 2017;120(1):S59-S67.
153. Heerspink HJ, Desai M, Jardine M, Balis D, Meininger G, Perkovic V. Canagliflozin slows progression of renal function decline independently of glycemic effects. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(1):368-75.
154. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5 1 -5 1 11.
155. Flow Cytometry - A Survey and the Basics. <https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>. Accessed 03.05.2023
156. Lowe DJ, Raj K. Quantitation of endothelial cell adhesiveness in vitro. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2015(100):e52924.

157. Vincent V, Thakkar H, Verma A, Sen A, Chandran N, Singh A. A novel flow cytometry-based quantitative monocyte adhesion assay to estimate endothelial cell activation in vitro. *BioTechniques*. 2020;68(6):325-33.
158. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015;72:4-15.
159. Engvall E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*. 2010;56(2):319-20.
160. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2016;77(7):C98-101.
161. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2017;1592:79-94.
162. Alhajj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2023.
163. Kohl TO, Ascoli CA. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc*. 2017;2017(7):pdb prot093740.
164. Boguszewska K, Szewczuk M, Urbaniak S, Karwowski B. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76.
165. Kohl TO, Ascoli CA. Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017;2017(5).
166. Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017;2017(6):pdb prot093724.
167. Kuo HT, Yeh JZ, Wu PH, Jiang CM, Wu MC. Application of immunomagnetic particles to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for improvement of detection sensitivity of HCG. *J Immunoassay Immunochem*. 2012;33(4):377-87.

168. Tiscione NB. The Validation of ELISA Screening According to SWGTOX Recommendations. *J Anal Toxicol*. 2018;42(3):e33-e4.
169. Mistrík E, Bláha V, Sulková SD, Sobotka L. Syndróm MIAC (malnutrition, inflammation, atherosclerosis, calcification).
170. van Furth R, Raeburn JA, van Zwet TL. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood*. 1979;54(2):485-500.
171. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*. 2014;23(1):37-45.
172. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26(2):171-6.
173. Gaspari T, Spizzo I, Liu H, Hu Y, Simpson RW, Widdop RE, et al. Dapagliflozin attenuates human vascular endothelial cell activation and induces vasorelaxation: A potential mechanism for inhibition of atherogenesis. *Diab Vasc Dis Res*. 2018;15(1):64-73.