

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Vplyv blokácie endoglínu na zápalom indukovanú
endotelovú dysfunkciu u ľudských aortálnych
endotelových buniek**

Andrea Škubová

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa rada pod'akovala PharmDr. Kataríne Tripskej, Ph.D. za jej odborné vedenie, cenné poznatky, rady, pripomienky, priateľský prístup a v neposlednom rade za jej trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala pri experimentálnej časti, pri písaní diplomovej práce a zodpovedaní odborných aj praktických otázok. Ďalej by som chcela pod'akovať prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za jeho odbornú konzultáciu. Pod'akovanie patrí aj mojej rodine a priateľovi za ich neustálu morálnu podporu a pomoc.

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

V Hradci Králové, 2023

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Názov diplomovej práce: Vplyv blokácie endoglinu na zápalom indukovanú endotelovú dysfunkciu u ľudských aortálnych endotelových buniek

Autor: Andrea Škubová

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

Cieľ práce: Cieľom tejto diplomovej práce bolo popísať vplyv zápalu indukovaného prostredníctvom TNF- α a LPS na expresiu endoglinu a jeho transkripčných faktorov, expresiu biomarkerov endotelovej dysfunkcie, hladinu solubilného endoglinu a adhéziu a transmigráciu monocytov cez ľudské aortálne endotelové bunky. Ďalej sme chceli objasniť vplyv blokácie endoglinu prostredníctvom monoklonálnej protilátky TRC105 (carotuximab) na tieto procesy.

Metódy: V tejto diplomovej práci boli použité ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC), ktoré boli vystavené po dobu 16 hodín pôsobeniu TNF- α (10 ng/ml) a LPS (100 ng/ml) a po dobu 12 hodín pôsobeniu TRC105 (300 μ g/ml). Metódou real-time qRT-PCR sme merali mRNA expresiu endoglinu a jeho transkripčných faktorov (KLF6, RelA, NR1H3), mRNA expresiu zápalových adhézných molekúl (ICAM-1, VCAM-1, SELE) a mRNA expresiu enzýmu MMP-14. Pomocou prietokovej cytometrie sme detekovali proteínové hladiny endoglinu, proteínové hladiny zápalových adhézných molekúl (ICAM-1, VCAM-1), počet adherovaných THP-1 monocytov a počet transmigrovaných THP-1 monocytov cez bunky. Pre meranie hladiny solubilného endoglinu sme použili metódu ELISA.

Výsledky: Samotné TRC105 nemalo signifikantný vplyv na mRNA expresiu endoglinu a jeho transkripčných faktorov, no v prípade proteínovej expresie endoglinu viedlo k signifikantnému zníženiu hladín. TRC105 zásadne neovplyvnilo proteínovú expresiu adhézných molekúl ani transmigráciu, avšak bolo schopné znížiť adhéziu monocytov k endotelovým bunkám. Stimulácia buniek prostredníctvom TNF- α a LPS spôsobila

signifikantné zníženie proteínovej expresie endoglínu, zvýšenie hladín solubilného endoglínu a proteínovej expresie zápalových adhézných molekúl a zvýšenie adhézie monocytov, no nemala vplyv na transendotelovú migráciu monocytov. Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α a LPS viedlo k signifikantnému zníženiu proteínovej expresie endoglínu, no nemalo zásadný vplyv na expresiu adhézných molekúl. Len v prípade TNF- α indukovaného zápalu viedla prítomnosť TRC105 k zníženiu adhézie monocytov. TRC105 signifikantne neovplyvnil ani TNF- α , ani LPS stimulovanú transmigráciu.

Záver: Výsledky preukázali, že pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α viedlo k výraznému zníženiu proteínovej expresie endoglínu, čo môže predchádzať TNF- α indukovanej adhézií monocytov. Tieto výsledky naznačujú, že endoglín sa podieľa na rozvoji endotelovej dysfunkcie navodenej TNF- α , a teda že endoglín by potencióálne mohol byť zaujímavým farmakologickým cieľom u ochorení so zápalovou etiológiou.

Kľúčové slová: TRC105, endoglín, endotelová dysfunkcia, zápal

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Effect of endoglin blockage on inflammation-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells

Author: Andrea Škubová

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

Aim: The aim of this thesis was to describe the effect of TNF- α and LPS-induced inflammation on the expression of endoglin and its transcription factors, the expression of biomarkers of endothelial dysfunction, the levels of soluble endoglin, and the adhesion and transmigration of monocytes through human aortic endothelial cells. We further investigated the effect of endoglin blockage by the monoclonal antibody TRC105 (carotuximab) on these processes.

Methods: In this thesis, human aortic endothelial cells (HAEC) were used, and they were exposed for 16 hours to TNF- α (10 ng/ml) and LPS (100 ng/ml) and for 12 hours to TRC105 (300 μ g/ml). The mRNA expression of endoglin and its transcription factors (KLF6, RelA, NR1H3), mRNA expression of inflammatory adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, SELE) and mRNA expression of MMP-14 enzyme were measured by real time qRT-PCR. Using flow cytometry, we detected protein levels of endoglin, protein levels of inflammatory adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1), the number of adherent THP-1 monocytes, and the number of transmigrated THP-1 monocytes. We used the ELISA method to measure soluble endoglin levels.

Results: TRC105 alone had no significant effect on mRNA expression of endoglin and its transcription factors but led to a significant decrease in endoglin protein expression levels. TRC105 did not significantly affect protein expression of adhesion molecules or transmigration but was able to reduce monocyte adhesion to endothelial cells. Stimulation of cells by TNF- α and LPS led to a significant decrease in protein expression of endoglin, an

increase in soluble endoglin levels and protein expression of inflammatory adhesion molecules, and an increase in monocyte adhesion, but had no effect on monocyte transendothelial migration. Addition of TRC105 to TNF- α - and LPS-stimulated cells resulted in a significant decrease in protein expression of endoglin but had no significant effect on the expression of adhesion molecules. Only in the case of TNF- α -induced inflammation did the presence of TRC105 led to a decrease in monocyte adhesion. TRC105 did not significantly affect either TNF- α - or LPS-stimulated transmigration.

Conclusion: The results demonstrated that the addition of TRC105 to TNF- α -stimulated cells led to a significant reduction in endoglin protein expression, which may prevent TNF- α -induced monocyte adhesion. These results suggest that endoglin is involved in the development of TNF- α -induced endothelial dysfunction, and thus endoglin could potentially be an interesting pharmacological target in diseases with inflammatory etiology.

Key words: TRC105, endoglin, endothelial dysfunction, inflammation

OBSAH

1.	ÚVOD	11
2.	TEORETICKÁ ČASŤ	13
2.1	Endogln	13
2.1.1	Štruktúra a expresia endoglnu.....	13
2.1.2	Regulácia endoglnu.....	15
2.1.3	Signalizácia a funkcia endoglnu	16
2.1.4	Solubilný endogln	18
2.2	Endotel	19
2.2.1	Fyziologická funkcia endotelu	21
2.2.2	Endotelová dysfunkcia – definícia, prejavy, biomarkery	22
2.2.3	Úloha endoglnu v endotelovej dysfunkcii	27
2.2.4	Typy endotelových buniek používaných vo výskume kardiovaskulárneho systému	28
2.3	Zápal.....	30
2.3.1	Definícia, klinické prejavy, fázy zápalu.....	30
2.3.2	Úloha endoglnu u zápalu	32
2.4	TRC105	34
2.4.1	Mechanizmus účinku	34
2.4.2	Klinické použitie	35
2.5	Metódy používané na detekciu endoglnu.....	36
2.5.1	PCR – základné princípy.....	36
2.5.2	Prietoková cytometria – základné princípy.....	39

2.5.3	ELISA	42
2.5.4	Adhézia monocytov k endotelovým bunkám.....	45
2.5.5	Transmigrácia monocytov cez endotel	47
3.	ZADANIE – CIEĽ PRÁCE	49
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	50
4.1	Príprava vzoriek	50
4.1.1	Rozmrazovanie buniek.....	50
4.1.2	Pasážovanie.....	51
4.1.3	Experimentálny dizajn buniek na PCR/FC	55
4.2	PCR	58
4.3	Prietoková cytometria	64
4.4	ELISA	66
4.5	Adhézia	72
4.6	Transmigrácia.....	74
5.	VÝSLEDKY	78
5.1	mRNA expresia endoglínu a jeho transkripčných faktorov	79
5.2	mRNA expresia zápalových molekúl	81
5.3	Proteínová expresia endoglínu a zápalových molekúl	83
5.4	Vznik solubilného endoglínu	85
5.5	Funkčná analýza.....	87
6.	DISKUSIA	89
7.	ZÁVER	93

8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	94
9.	ZOZNAM TABULIEK.....	98
10.	ZOZNAM OBRÁZKOV	99
11.	ZOZNAM GRAFOV	100
12.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	101

2. ÚVOD

Endoglin je transmembránový glykoproteín, ktorý je členom superrodiny transformujúceho rastového faktoru beta (1, 2) a zohráva rozhodujúcu úlohu pri udržiavaní kardiovaskulárnej homeostázy (3). Je exprimovaný na endotelových bunkách a jeho expresia je regulovaná rôznymi transkripčnými faktormi ako KLF6, NF- κ B, LXR a iné (4). Endoglin sa zúčastňuje zápalom indukovanej adhézie a transmigrácie leukocytov (5), a taktiež bol identifikovaný pri ateroskleróze, kardiovaskulárnych ochoreniach (6) a endotelovej dysfunkcii (7).

Endotel je tvorený monovrstvou endotelových buniek, ktoré vystielajú vnútorný povrch všetkých ciev (8). Endotel vytvára selektívne priepustnú bariéru medzi extravaskulárnym a intravaskulárnym prostredím (9). K jeho hlavným funkciám patrí regulácia transendotelovej migrácie leukocytov cez endotelové bunky. Kľúčovú úlohu zohráva aj pri udržiavaní vaskulárnej (10) a metabolickej homeostázy (11), pri udržiavaní hemostázy a optimálneho prietoku krvi (12), pri prenose rozpustných látok a makromolekúl do krvi a v neposlednom rade sa zúčastňuje procesu angiogenézy (13).

Endotelová dysfunkcia je charakteristická narušenou funkciou endotelu, ktorá spôsobuje prechod endotelu z pokojového do prozápalového stavu. Prozápalový stav je charakteristický zvýšenou vaskulárnou permeabilitou, produkciou prozápalových cytokínov a adhézných molekúl, zvýšenou produkciou chemokínov, adhézou leukocytov k endotelu a agregáciou krvných doštičiek (14, 15). Narušenie vaskulárnej homeostázy zápalovými procesmi a kardiovaskulárnymi faktormi vedie k rozvoju aterosklerózy a kardiovaskulárnych ochorení (16).

Zápal je súbor meniacich sa reakcií reagujúcich na poškodenie tkaniva (17). Predstavuje obranný mechanizmus, ktorým sa organizmus dokáže ochrániť pred infekciou a poranením. Niektoré reakcie môžeme považovať za prospešné (hojenie rán, kontrola infekcií), no pri chronických chorobných stavoch sa zápal prejavuje vo forme patologických reakcií. Odpoveď organizmu spočíva v zmenách prietoku krvi, zvýšení priepustnosti krvných ciev a migrácii tekutiny, bielkovín a leukocytov z krvného obehu do miesta poškodenia (18).

Ku klinickým prejavom zápalu patrí začervenanie, teplo, opuch, bolesť a porucha funkcie tkaniva (19). Podľa dĺžky trvania delíme zápal na akútny, subakútny a chronický (20).

TRC105 (carotuximab) je monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na endoglin a pôsobí viacerými mechanizmami účinkov. Pôvodne bol vyvinutý pre onkologickú terapiu so zameraním na proliferujúci endotel v cievach nádorov (21-23). Samostatne podávaný TRC105 nemal lepší klinický prínos ako súčasná liečba, a preto sa v súčasných klinických štúdiách kombinuje s inými liečivami (24, 25). V jednej zo štúdií bol TRC105 použitý ako model farmakologickej látky, ktorá je schopná modulovať endoglin a jeho signalizáciu počas rozvoja endotelovej dysfunkcie (26).

V tejto diplomovej práci sa budeme zaoberať vplyvom zápalu indukovaného prostredníctvom TNF- α a LPS na expresiu endoglinu a jeho transkripčných faktorov, expresiu biomarkerov endotelovej dysfunkcie, hladinu solubilného endoglinu a adhéziu a transmigráciu monocytov cez ľudské aortálne endotelové bunky. Ďalej sa pokúsime objasniť vplyv blokácie endoglinu prostredníctvom monoklonálnej protilátky TRC105 (carotuximab) na spomínané procesy.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Endoglin

Endoglin (Eng), známy tiež ako CD105, je transmembránový glykoproteín, ktorý je členom superrodiny transformujúceho rastového faktoru beta (TGF- β) (1, 2).

2.1.1 Štruktúra a expresia endoglinu

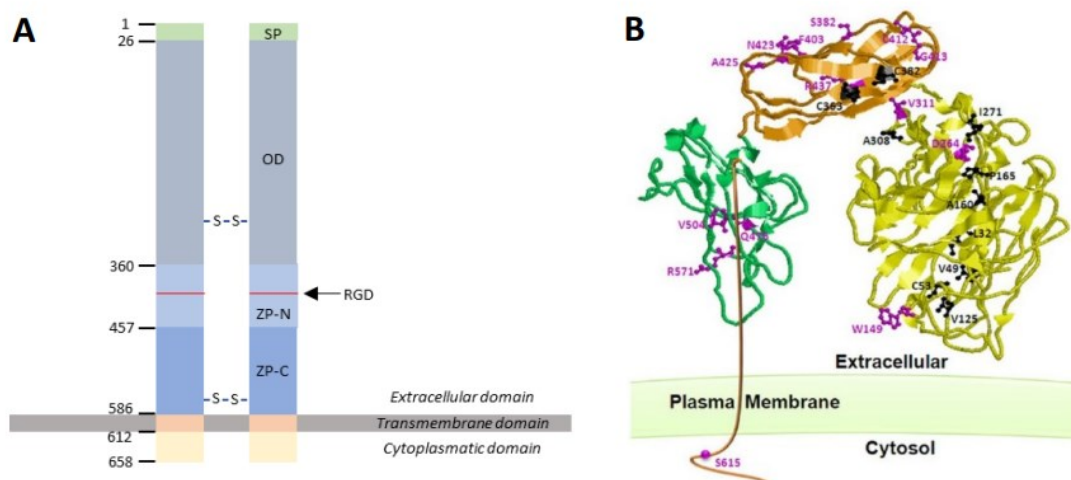
Eng je prevažne exprimovaný na endotelových bunkách (EC), no jeho prítomnosť bola zaznamenaná aj v bunkách hladkého svalstva ciev (27), fibroblastoch (28), stelárnych bunkách pečene (29) a v aktivovaných monocytoch a makrofágoch (30).

Eng je 180-kDa homodimérny integrálny membránový glykoproteín (3) viazaný disulfidickými väzbami (31). Obsahuje veľkú extracelulárnu časť zloženú z 561 aminokyselín, hydrofóbnu membránovú časť tvorenú 26 aminokyselinami a krátku cytoplazmatickú časť bohatú na serín/treonín (32).

Extracelulárna časť Eng obsahuje tzv. sirotskú doménu (OD) a doménu nazývanú zóna pellucida (ZP) (33). OD nevykazuje významnú podobnosť so žiadnou inou rodinou proteínov a je zodpovedná za väzbu ligandov TGF- β (konkrétne TGF- β 1, TGF- β 3), kostných morfogenetických proteínov (BMPs) a aktínu-A. ZP pozostáva približne z 226 aminokyselín, pričom zvyšky aminokyselín cysteínu sa nachádzajú v blízkosti transmembránovej oblasti (34). ZP môžeme ďalej rozdeliť na ZP-N (bližšie k N-koncovej oblasti Eng) a ZP-C (bližšie k C-koncovej oblasti Eng). Súčasťou aminokyselinovej sekvencie ZP-N domény je arginyl-glycyl-aspartát (RGD) v polohe Arg399-Asp401, ktorý je základnou rozpoznávacou štruktúrou pre väzbu s integrínmi a inými RGD receptormi (32, 33).

Existujú dve rozdielne formy Eng: membránový Eng (Obr. 1) a solubilný endoglin (sEng) cirkulujúci v plazme alebo kultivačnom médiu buniek (35).

Ďalej rozlišujeme dve rôzne izoformy Eng v závislosti od stavu fosforylácie, počtu aminokyselín v cytoplazmatickej doméne (36) a afinity k receptorom (37). Prevažne exprimovaný je dlhý endoglín (L-Eng) so 47 aminokyselinami, ktorý stimuluje migráciu, proliferáciu a angiogénezu EC. Krátky endoglín (S-Eng) je minoritná izoforma Eng so 14 aminokyselinami, ktorý inhibuje migráciu a proliferáciu EC, čo vedie k ich starnutiu. S-Eng má skráteneý C-koniec, na ktorom chýbajú miesta fosforylácie a interakcie s proteínmi, čo vedie k funkčným rozdielom v porovnaní s L-Eng (38). Presná úloha S-Eng zatiaľ nebola úplne objasnená, a preto sa v tejto práci budeme zaoberať L-Eng (36, 37, 39, 40).



Obrázok 1: Štruktúra endoglínu

A) Schematické znázornenie štruktúry endoglínu (Eng). Eng pozostáva z extracelulárnej, transmembránovej a cytoplazmatickej domény. Extracelulárnu doménu tvorí zona pellucida (ZP) rozdelená na časti ZP-C (bližšie k C-koncovkej oblasti Eng) a ZP-N (bližšie k N-koncovkej oblasti Eng) s arginyl-glycyl-aspartátovým tripeptidom (RGD), sirotská doména (OD) a signálny peptid (SP) (Autor: Katarína Tripská, obrázok použitý so súhlasom autora). Eng je zložený z dvoch monomérnych jednotiek, ktoré sú viazané disulfidickými väzbami (S-S) (41). B) 3D štruktúra Eng monoméru znázorňuje umiestnenie malej C-terminálnej intracelulárnej domény a tri extracelulárne domény, ktoré zahŕňajú ZP-C (zelená), ZP-N (oranžová) a OD (žltá) (33).

2.1.2 Regulácia endoglínu

Gén pre Eng je lokalizovaný na ľudskom chromozóme 9 a obsahuje 15 exónov, z ktorých 13 kóduje extracelulárnu doménu. Taktiež obsahuje dve oblasti bohaté na guanín-cytosín (GC) (42).

Expresia membránového Eng je regulovaná rôznymi transkripčnými faktormi ako KLF6 (člen rodiny faktorov podobných Kruppelovi tzv. Kruppel-like factors, ktoré sú exprimované vo všetkých ľudských tkanivách), nukleárny faktor kappa B (NF- κ B), pečenný X receptor (LXR) (4), špecifický proteín 1 (Sp1), hypoxiou indukovateľný faktor 1 α (HIF-1 α – zápalový a oxidačný faktor dráhy stresu) (43-45) a prvky citlivé na TGF- β , glukokortikoidy, vitamín D a estrogén (42).

KLF6 je nukleárny proteín skladajúci sa z troch „zinkových prstov“, ktoré sú zodpovedné za väzbu na GC oblasti v promotoroch rôznych génov (46). Gén pre Eng obsahuje dve GC oblasti, a navyše je s KLF6 indukovaný počas vaskulárneho poškodenia. Na základe týchto faktov bolo preukázané, že KLF6 je schopný pozitívne regulovať expresiu génu pre Eng (47).

NF- κ B predstavuje rodinu dimérnych transkripčných faktorov, ktoré sú kľúčovým regulátorom imunitného systému a zúčastňujú sa zápalových reakcií, bunkovej diferenciácie, proliferácie a angiogenézy. Signalizácia NF- κ B je prísne regulovaná a jej nesprávna modulácia sa podieľa na širokom spektre chorôb, od zápalových a imunitných procesov po nádorové ochorenia (48).

LXR je nukleárny receptor, ktorý súvisí s metabolizmom cholesterolu. Viaže sa na oxysteroly (známe tiež ako prirodzene sa vyskytujúce oxidované formy cholesterolu) a aktivuje expresiu cieľového génu. Pri identifikácii nových cieľových génov LXR v placente sa poukázalo na to, že LXR je transkripčným faktorom Eng. LXR je schopný viazať sa na LXR responzívny element v Eng promotore, a tak sprostredkovať aktiváciu Eng expresie (49).

Mutácia v sekvencii kritického miesta Sp1 alebo prítomnosť inhibítora Sp1 viedla k eliminácii bazálnej transkripčnej aktivity a citlivosti promotora Eng na TGF- β (50).

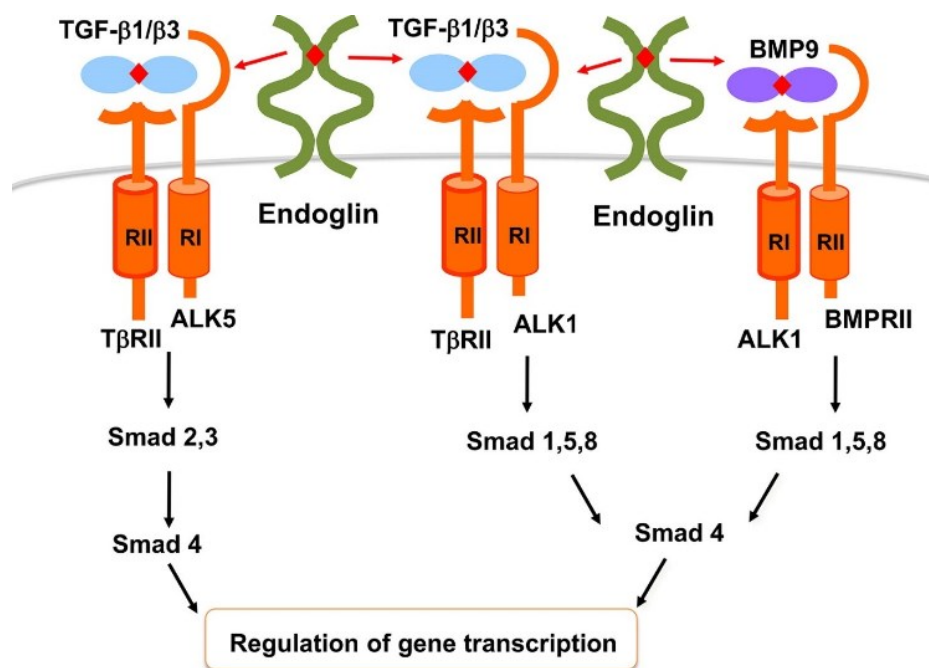
2.1.3 Signalizácia a funkcia endoglinu

Ako už bolo spomenuté, Eng je dôležitým regulátorom signalizácie TGF- β pri rôznych fyziologických aj patologických stavoch (51). Receptory TGF- β môžeme rozdeliť na tri odlišné podtypy: receptory typu I, nazývané aj ako kinázy podobné aktivínovému receptoru (ALK 1-7), receptory typu II (TGF- β RII, BMPRII) a receptory typu III (Eng, β -glykán) (52, 53).

TGF- β receptory typu I a II tvoria spolu s Eng funkčný receptorový komplex. Krátka časť cytoplazmatickej domény Eng sa zúčastňuje modulácie prenášaného signálu (54), ale nie je samotným spúšťačom signálnej kaskády.

Proces signalizácie začína, keď sa TGF- β alebo TGF- β 3 naviaže na receptorový komplex na bunkovom povrchu. Fosforyláciou sa aktivuje skupina príbuzných proteínov Smad (Smad1/5/8 a Smad2/3), ktoré boli identifikované ako mediátory transdukcie intracelulárneho signálu. Fosforylované proteíny Smad sa viažu na Smad4 a vytvárajú proteínový komplex, ktorý sa transportuje do bunkového jadra. V jadre sa proteínový komplex Smad viaže na špecifické oblasti DNA, kde riadi aktivitu konkrétnych génov a reguluje diferenciáciu a proliferáciu buniek (50). Eng moduluje túto signalizáciu prostredníctvom väzby s ALK1 (kináza 1 podobná aktivínovému receptoru) alebo s ALK5 (kináza 5 podobná aktivínovému receptoru) (40). Väzba Eng na ALK1 vedie k aktivácii signálnej dráhy Smad1/5/8, ktorá stimuluje proliferáciu a migráciu EC (55). Väzba Eng na ALK5 vedie k aktivácii signálnej dráhy Smad2/3, ktorá inhibuje proliferáciu a migráciu EC. Vďaka týmto mechanizmom udržiava Eng rovnováhu medzi spomínanými signálnymi dráhami a reguluje tak aktívny či pokojný stav EC (56).

Okrem TGF- β je Eng schopný viazať aj BMP9 a BMP10 priamo pomocou väzby s ALK1 (57, 58). ALK1 následne fosforyluje Smad1/5/8, ktorý potom vytvára komplex so Smad4. Proteínový komplex je transportovaný do jadra, kde zvyšuje proliferčné signály v EC (Obr. 2) (59).



Obrázok 2: Signálne dráhy endoglínu v endotelových bunkách

V ľavej časti obrázka vytvára endoglín (Eng) komplex s TGF- β receptormi typu II ($T\beta$ RII, BMPRII) a TGF- β receptormi typu I (ALK5, ALK1). Ak po naviazaní TGF- β 1 alebo TGF- β 3 Eng vytvorí komplex s ALK5, dochádza k iniciácii dráhy Smad2/3. V prípade, že Eng vytvorí komplex s ALK1, dochádza k aktivácii dráhy Smad1/5/8. Smad2/3 alebo Smad1/5/8 potom vytvoria komplex so Smad4, ktorý je zodpovedný za prenos komplexov Smad do jadra, kde prebieha regulácia génovej transkripcie (60). V pravej časti obrázka sa BMP9 viaže na komplex Eng, ALK1 a BMPRII. Dochádza k aktivácii signalizačnej dráhy Smad1/5/8 vytvorením komplexu so Smad4 a následnému prenosu do jadra, čo vedie k regulácii génovej transkripcie (61).

Viacere štúdie preukázali, že Eng hrá rozhodujúcu úlohu pri udržiavaní kardiovaskulárnej homeostázy (3). Podieľa sa na fyziologickej funkcii endotelu, no zmeny v jeho expresii a funkcii sú spojené aj s niekoľkými patologickými stavmi (35).

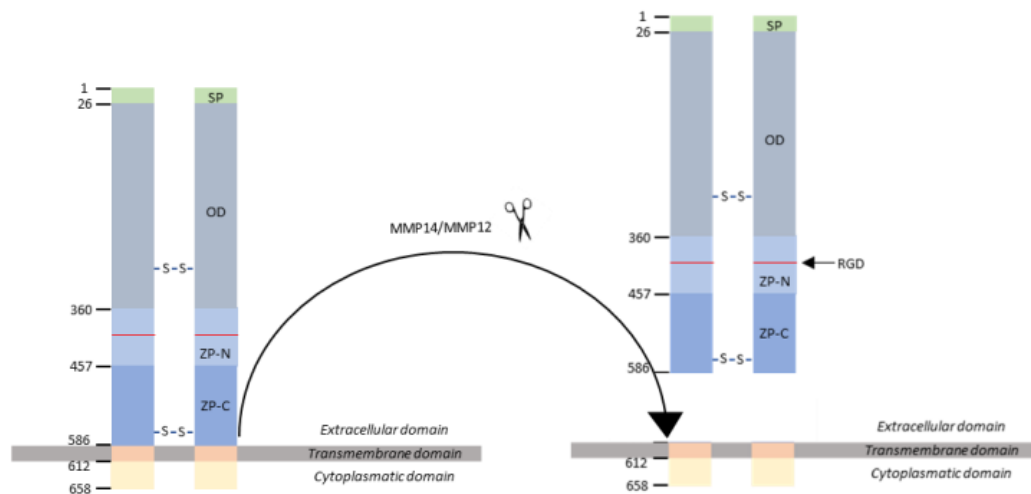
Hereditárna hemoragická teleangiektázia (HHT) je genetické ochorenie, ktoré je charakteristické mutáciami v génoch pre Eng (HHT-1) alebo ALK-1 (HHT-2). HHT-1 je spojená s vaskulárnymi abnormalitami v pľúcach, mozgu a pečeni (39).

Eng sa zúčastňuje aj zápalom indukovanej adhézie a transmigrácie leukocytov, ktorá je sprostredkovaná väzbou RGD tripeptidu v Eng s integrínmi nachádzajúcimi sa na povrchu leukocytov (5). Eng bol taktiež identifikovaný pri ateroskleróze (6), angiogenéze (62),

fibróze (63), srdcovej remodelácii (64), preeklampsii, pľúcnej hypertenzii či endotelovej dysfunkcii (ED) (7).

2.1.4 Solubilný endoglin

Extracelulárna doména Eng môže byť proteolyticky štiepená matrixovou metaloproteinázou (MMP12 a MMP14) v blízkosti bunkovej membrány a cirkulovať v krvnom obehu ako sEng (Obr. 3) (65).



Obrázok 3: Vznik solubilného endoglinu

Solubilný endoglin vzniká štiepením membránového endoglinu pôsobením matrixových metaloproteináz (MMPs). Matrixové metaloproteinázy 14 a 12 (MMP14 a MMP12) sú enzými, ktoré hydrolyzujú peptidovú väzbu medzi aminokyselinami glycín-leucín v pozícii 586-587 endoglinu v blízkosti jeho transmembránovej domény. Výsledkom je, že dlhá extracelulárna doména membránového endoglinu sa uvoľňuje do obehu ako rozpustná forma endoglinu (60).

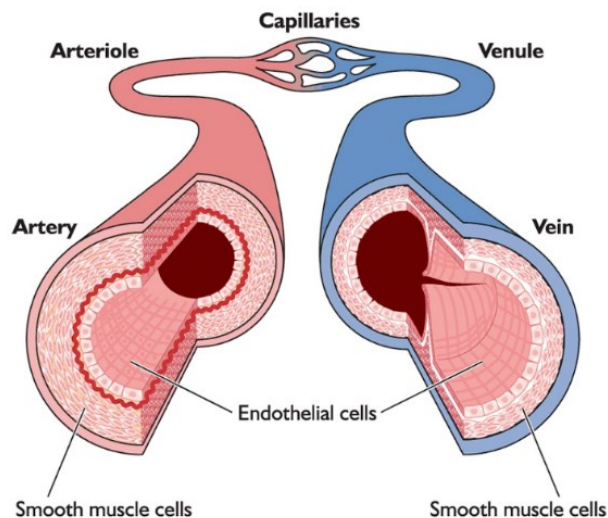
Zvýšené hladiny sEng boli detekované pri preeklampsii u tehotných žien (51), obezite, hypertenzii (66) a pri metabolických poruchách ako hypercholesterolémia a diabetes mellitus (DM) (7). Na druhej strane, sEng je schopný inhibovať adhéziu leukocytov na EC. sEng sa viaže na integríny leukocytov, čím blokuje ich väzbu na membránový Eng a následnú migráciu do miesta zápalu (5). Nedávne štúdie preukázali, že účinky sEng (aktivácia alebo inhibícia signalizácie) sú závislé od toho, či sEng cirkuluje v monomérskej alebo dimérskej

forme. To by mohlo poskytnúť nový pohľad na úlohu a mechanizmy sEng pri regulácii nielen signalizácie, ale aj angiogenézy (67).

2.2 Endotel

Cievny endotel tvorí monovrstva EC, ktoré vystielajú vnútorný povrch celého kardiovaskulárneho systému (8). EC sú charakteristické svojim pretiahnutým polygonálnym tvarom (68). Endotel dosahuje hmotnosť približne 1,5 kg a jeho celková plocha sa odhaduje na 700 - 1000 m². Na základe plošnej veľkosti môžeme endotel považovať za najväčší sekrečný orgán v ľudskom tele (69).

Vo väčších cievach, ako sú žily a tepny, sa cievna stena skladá z EC, buniek hladkého svalstva a elastických vlákien (Obr. 4). Stenu krvných kapilár tvoria len EC (11).



Obrázok 4: Cievny endotel

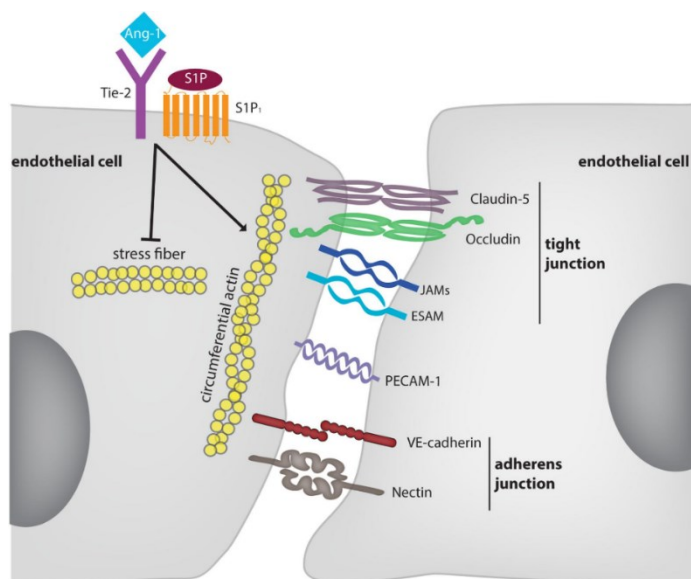
Endotel je tvorený monovrstvou endotelových buniek (EC), ktoré lemujú všetky krvné cievy - tepny, arterioly, venuly, žily a kapiláry. Bunky hladkého svalstva sú uložené pod vrstvou EC, ktorá je oddelená od okolitých vonkajších vrstiev bazálnou laminou (70).

Medzi EC sa nachádzajú medzibunkové spojenia, alebo rôzne adhézne štruktúry. Adhézne štruktúry sú tvorené transmembránovými adhéznymi molekulami, ktoré sú prepojené so sieťou cytoplazmatických alebo cytoskeletárnych proteínov (71, 72). Adhézne štruktúry sa podieľajú na komunikácii medzi bunkami a na riadení vaskulárnej permeability buniek (73).

Medzi EC boli na základe morfológických a funkčných charakterizácií popísané tri typy spojení (Obr. 5):

- tesné spoje (tight junctions)
- adhézne spoje (adherens junctions)
- medzerové spoje (gap junctions) (71, 72)

Zistené rozdiely v medzibunkových spojeniach viedli ku klasifikácii endotelu na kontinuálny, fenestrováný a diskontinuálny (74).



Obrázok 5: Medzibunkové spojenia medzi endotelovými bunkami

Obrázok znázorňuje adhézne molekuly, ktoré prispievajú k bariérovej funkcii endotelu a vytvárajú kontakt medzi endotelovými bunkami. VE-kadherín a nektín vytvárajú medzi bunkami adhézne spoje. Centrálnymi zložkami tesných spojov sú kladíny (kladín-5) a okludín. Integritu endotelového spojenia podporuje aj adhézna molekula krvných doštičiek a endotelových buniek-1 (PECAM-1), endotelová selektívna adhézna molekula (ESAM) a spojovacie adhézne molekuly JAM (junctional adhesion molecule) (75).

EC sa morfológicky, fyziologicky a fenotypovo líšia nie len medzi rôznymi orgánmi v tele (76, 77), ale aj medzi tepnami a žilami, arteriolami a venulami, a navyše aj medzi kapilármi rovnakých cievnych riečísk (78). Tieto rozdiely sa prejavujú vo variabilnej permeabilite, citlivosti a biosyntéze (79). Génovú expresiu ovplyvňuje tiež vek, pohlavie a druh (80). Potenciálne medzidruhové rozdiely, dokonca aj medzi cicavcami, sú obzvlášť dôležité, pretože mnohé zo štúdií boli vykonané na myšiach alebo iných hlodavcoch a príslušné zistenia sa nemusia nevyhnutne prenášať na ľudské bunky (81).

2.2.1 Fyziologická funkcia endotelu

Endotel je dynamický orgán, ktorý vytvára selektívne priepustnú bariéru medzi extravaskulárnym a intravaskulárnym prostredím. Predstavuje niekoľko jedinečných funkcií a produkuje rôzne hormóny, neurotransmitery a vazoaktívne faktory (9).

Jednou z hlavných funkcií endotelu je regulácia transendotelovej migrácie leukocytov cez spojenia medzi EC. Interakcia medzi leukocytmi a vaskulárnym endotelom prebieha počas akútneho a chronického zápalu a prispieva k imunitnej odpovedi. Leukocyty sledujú signály chemoatraktantov a migrujú z krvného obehu do miesta zápalu (82).

Endotel zohráva kľúčovú úlohu aj pri udržiavaní vaskulárnej homeostázy. EC sú schopné udržiavať rovnováhu medzi vazodilatáciou a vazokonstrikciou endotelu (10). Medzi molekuly podieľajúce sa na vazodilatácii patria oxid dusnatý (NO), hyperpolarizujúci faktor odvodený od endotelu a prostacyklíny. Vazokonstrikčný stav je sprostredkovaný endotelínom 1, angiotenzínom II a prostaglandínom H2 (83, 84).

Ďalšou funkciou endotelu je kontrola prenosu rozpustných látok a makromolekúl do krvi. Vaskulárny endotel riadi výmenu plynov, tekutín, elektrolytov a makromolekúl medzi krvným obehom a okolitým tkanivom orgánovo špecifickým spôsobom (79, 85, 86). Permeabilitu endotelu vieme rozdeliť na bazálnu, ktorá sa vyskytuje na úrovni kapilár (hlavné miesto výmeny vo vaskulárnom riečisku) a indukovanú permeabilitu spojenú so zápalom, ktorá sa vyskytuje predovšetkým na úrovni postkapilárnych venúl (87, 88).

EC môžu ďalej produkovať faktory, ktoré pôsobia ako parakrinné alebo endokrinné regulátory pre bunky a aktívne sa podieľajú na udržiavaní metabolickej homeostázy. K týmto

sekrečným endotelovým faktorom radíme inzulinotropné faktory, rastové faktory a enzýmy (11).

Medzi ďalšie významné vlastnosti a funkcie endotelu patrí schopnosť udržiavať správnu hemostázu, a tým aj optimálny prietok krvi. EC regulujú hemostázu syntézou prokoagulačných a antikoagulačných molekúl, a taktiež syntézou protrombotických a antitrombotických molekúl (12).

V neposlednom rade je dôležitou funkciou EC angiogenéza – proces tvorby nových ciev z predchádzajúceho endotelu (13). EC sa za normálnych okolností vyskytujú v pokojovom stave a patria medzi geneticky najstabilnejšie bunky tela, pretože ich doba premeny trvá stovky dní. Počas angiogenézy však môžu EC rýchlo proliferovať s dobou obratu kratšou ako 5 dní (89). Angiogenéza je sprostredkovaná rastovými faktormi s angiogénnymi vlastnosťami, ako sú vaskulárny endotelový rastový faktor, TGF- β a doštičkový rastový faktor (90).

2.2.2 Endotelová dysfunkcia – definícia, prejavy, biomarkery

ED je stav charakterizovaný narušenou funkciou endotelu, ktorá vedie k prechodu endotelu z pokojového stavu do prozápalového stavu. Prozápalový stav je definovaný zvýšenou vaskulárnou permeabilitou, produkciou prozápalových cytokínov a adhéznymi molekulami, zvýšenou produkciou chemokínov, adhéziou leukocytov k endotelu a agregáciou krvných doštičiek (14, 15).

Narušením vaskulárnej homeostázy zápalovými procesmi a kardiovaskulárnymi rizikovými faktormi sa endotel stáva náchylný na rozvoj aterosklerózy (ATS). Zápalové mediátory hrajú zásadnú úlohu pri iniciácii, progresii a prípadnej ruptúre aterosklerotických plátov. Štúdie, ktoré skúmajú zápalové procesy a ED s aterogenézou nám môžu poskytnúť informácie o riziku rozvoja kardiovaskulárnych ochorení (KVO) a nových cieľoch a možnostiach liečby (16).

Medzi KVO, ktoré súvisia s rozvojom ATS patrí arteriálna hypertenzia (AH), chronické srdcové zlyhanie, DM typu II, ischemická choroba dolných končatín, cievná mozgová príhoda, chronické zlyhanie obličiek a iné (91, 92). Hypercholesterolémia

a inzulínová rezistencia tiež prispievajú k vzniku zápalu v cievnej stene a k zvýšenej oxidácii lipoproteínov, proliferácii buniek hladkého svalstva, bunkovej adhézii a tvorbe trombov v cievach (93).

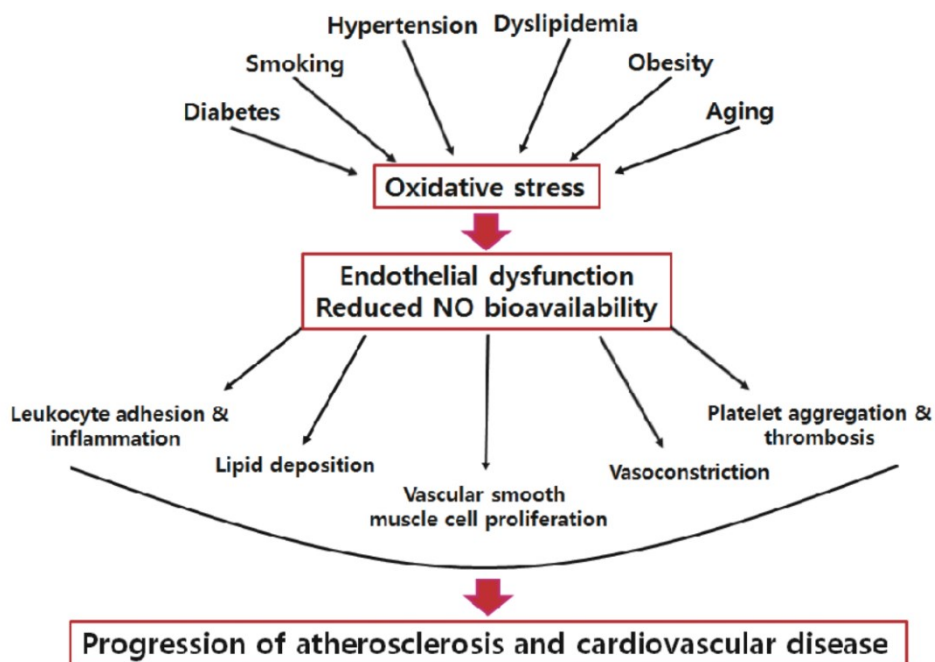
Medzi faktory, ktoré môžu viesť k ED patrí obezita, fajčenie, nedostatok spánku, akútna mikrobiálna infekcia, vysoký príjem glukózy, zvýšené hladiny C-reaktívneho proteínu (CRP) alebo vystavenie kovom a látkam znečisťujúcim ovzdušie (91).

DM je charakteristický zvýšeným sklonom k oxidačnému stresu z dôvodu prítomnosti vysokých hladín oxidovaných lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL). Hyperglykémia a vysoké hladiny mastných kyselín prispievajú k oxidácii fosfolipidov a proteínov, čo vedie k protrombickým stavom a zvýšenej agregácii krvných doštičiek. V EC, ktoré boli vystavené hyperglykémii, bola zaznamenaná znížená schopnosť endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS) produkovať NO. Na základe štúdií sa tiež potvrdilo, že ED je úzko spojená s ATS u diabetických pacientov (91).

Na ED sa podieľajú aj reaktívne formy kyslíka (ROS), ktoré stimulujú viaceré signálne dráhy zapojené do zápalového procesu, bunkového rastu a vaskulárnej remodelácie. Pri vyšších koncentráciách môžu spôsobiť nie len poškodenie buniek, ale aj ich smrť (92). Hlavným zdrojom produkcie ROS je nikotínamid adenín dinukleotid fosfát oxidáza, ktorej expresia je zvýšená pri hypertenzných stavoch niekoľkými stimulmi vrátane stresu, renín-angiotenzínového systému a aktivácie endotelínu. Zmeny vnútrobunkovej homeostázy vápnika taktiež prispievajú k zápalu a vazokonstrikcii, čo vedie k rozvoju hypertenzie a následnému poškodeniu orgánov (94-96).

V prítomnosti ED bola zaznamenaná znížená biologická dostupnosť NO, ktorý je základným vazodilatačným a antiagregačným mediátorom endotelu. Príčinou nedostatku NO môže byť znížená aktivita enzýmu eNOS alebo znížená dostupnosť jeho substrátu L-arginínu (14). CRP taktiež destabilizuje eNOS mediátorovú RNA (mRNA) a znižuje tak transkripciu eNOS, čo vedie k poklesu NO (97). Syntézu NO znižujú aj ROS tvorbou cytotoxického oxidantu peroxydusitanu (98), ktorý ovplyvňuje nitráciou proteínov ich funkciu, a tým aj funkciu endotelu. Peroxydusitan je dôležitým mediátorom oxidácie LDL, čo zdôrazňuje jeho

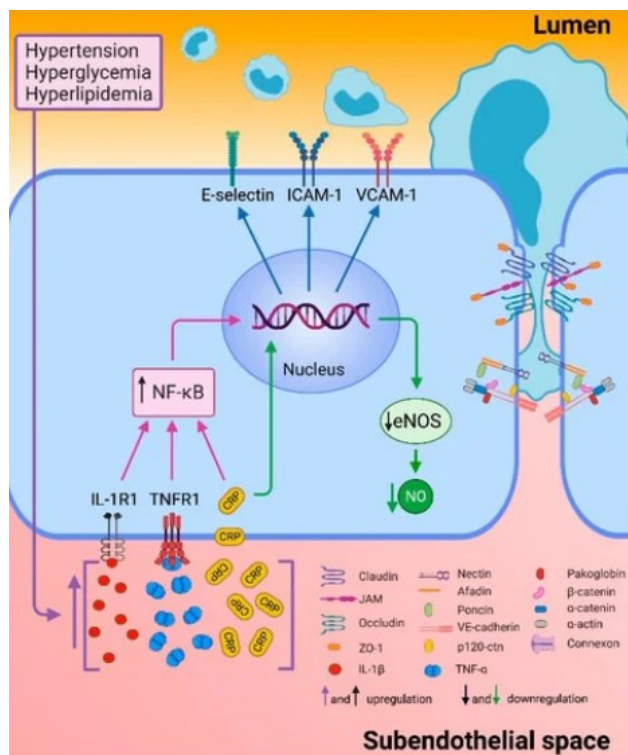
proaterogénnu úlohu. Z týchto poznatkov vyplýva, že oxidačný stres svojimi komplexnými mechanizmami vedie k rozvoju ED (Obr. 6) (99).



Obrázok 6: Kardiovaskulárne rizikové faktory

Progresia od rizikových faktorov k ateroskleróze a iným kardiovaskulárnym ochoreniam je sprostredkovaná oxidačným stresom, ktorý vzniká prostredníctvom diabetes mellitus, fajčenia, arteriálnej hypertenzie, dyslipidémie, obezity a starnutia. Oxidačný stres vedie k endotelovej dysfunkcii, ktorá je charakterizovaná znížením dostupnosti oxidu dusnatého (NO), čo vedie k adhézii leukocytov k endotelovým bunkám počas zápalu, ukladaniu lipidov, proliferácii buniek hladkého svalstva ciev, vazokonstrikcii ciev, agregácii krvných doštičiek a trombóze (100).

Kardiovaskulárne rizikové faktory vedú k zvýšenej produkcii zápalových mediátorov, ako je tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF- α), interleukín-1 (IL-1) a CRP (9, 101). Tieto prozápalové cytokíny sa viažu na ich príslušné receptory, čo vedie k aktivácii NF- κ B, po ktorej nasleduje stimulácia transkripcie adhézných molekúl E-selektínu, medzibunkovej adhéznej molekuly-1 (ICAM-1) a vaskulárnej bunkovej adhéznej molekuly-1 (VCAM-1) (15, 102). Integrita cievneho endotelu je v priebehu zápalových procesov znížená. Tento jav vedie k oslabeniu medzibunkových spojov, čo umožňuje leukocytom migrovať do subendotelového priestoru (Obr. 7) (103).



Obrázok 7: Biomarkery endotelovej dysfunkcie

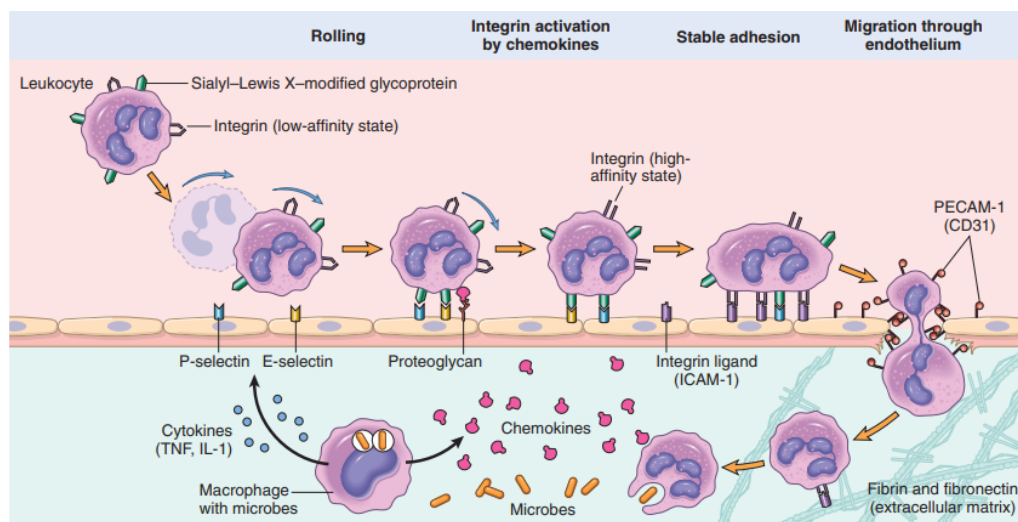
Kardiovaskulárne rizikové faktory (hypertenzia, hyperglykémia, hyperlipidémia) spôsobujú endotelovú dysfunkciu, ktorá vedie k zvýšenej produkcii interleukínu-1 (IL-1), tumor nekrotizujúceho faktoru alfa (TNF- α) a C-reaktívneho proteínu (CRP). Prozápalové cytokíny sa viažu na ich receptory a vedú k aktivácii nukleárneho faktoru kappa B (NF- κ B), ktorý stimuluje transkripciu E-selektínu, medzibunkovej adhézneho molekuly-1 (ICAM-1) a vaskulárnej bunkovej adhézneho molekuly-1 (VECAM-1). CRP znižuje transkripciu endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS) a destabilizuje mediátorovu RNA (mRNA) eNOS, čo vedie k zníženiu oxidu dusnatého (NO) (104).

Prechod leukocytov z krvného obehu do okolitého tkaniva prebieha v niekoľkých krokoch. Prvá fáza zahŕňa adhéziu leukocytov k povrchu EC, ktorá pozostáva zo zachytávania (capture), rolovania (rolling) a zadržania (arrest) leukocytov. Za počiatočné zachytávanie a rolovanie leukocytov sú zodpovedné selektíny (105, 106).

E-selektín je exprimovaný iba na povrchu EC, ktoré sú aktivované zápalovými cytokínmi. Na povrchu EC v pokojovom stave sa zvyčajne nenachádza. P-selektín sa síce nachádza v granulách neaktivovaných EC a krvných doštičiek, no nie je exprimovaný na ich povrchu za pokojového stavu. Po stimulácii EC zápalovými mediátormi sa môže P-selektín rýchlo transportovať na ich povrch. Jeho expresia bola preukázaná aj v poškodenom endoteli

aterosklerotického plátu, čo naznačuje, že zvýšená expresia P-seletínu sa môže považovať za indikátor ED (82, 105, 107).

Ďalšími adhéznymi molekulami, ktoré sa zúčastňujú adhézie leukocytov na povrchu EC sú VCAM-1 a ICAM-1. VCAM-1 je prevažne exprimovaný na EC aktivovaných prozápalovými cytokínmi alebo ROS. Jeho zvýšená expresia bola zaznamenaná aj na povrchu endotelu s prejavom ATS. ICAM-1 je síce konštantne exprimovaný v nízkych hladinách na povrchu EC, no aktivácia endotelu zápalovými mediátormi a ROS vedie taktiež k významnému zvýšeniu jeho expresie, podobne ako u VCAM-1. ICAM-1 sa nachádza aj v aterosklerotických plátoch, kde sa podieľa na ich progresii. Na základe týchto informácií môžeme adhézne molekuly VCAM-1 a ICAM-1 považovať za dôležité biomarkery ED a ATS (108, 109). Adhézna molekula krvných doštičiek a endotelových buniek-1 (PECAM-1) sa zúčastňuje fázy diapedézy leukocytov (105, 107). Fázy endotelovej transmigrácie leukocytov sú znázornené na Obr. 8.



Obrázok 8: Mechanizmus transendotelovej migrácie leukocytov

Leukocyty sa najprv kotúľajú, a potom sa aktivujú a priľnú k endotelu. Tento proces väčšinou závisí od expresie adhézných molekúl selektínov na endotelových bunkách (EC) a integrínov na leukocytoch. Po adhézii leukocyty transmigrujú medzi EC a prenikajú cez bazálnu membránu (110). Leukocyty migrujú smerom k chemoatraktantom, ktoré vychádzajú zo zdroja poranenia. Pri tomto procese sú prítomné rôzne molekuly, ktoré zohrávajú svoju úlohu pri jednotlivých krokoch: selektíny pri kotúľaní, chemokíny pri regulácii migrácie, integrínové ligandy (medzibunková adhézna molekula-1; ICAM-1) v pevnej adhézii a adhézna molekula krvných doštičiek a endotelových buniek-1 (PECAM-1) pri transmigrácii (111).

2.2.3 Úloha endoglinu v endotelovej dysfunkcii

Niekoľko *in vivo* a *in vitro* štúdií poukázalo na rozdielne úlohy Eng v ED. Eng sa podieľa na prevencii rozvoja ED aktiváciou signalizačnej dráhy ALK5/Smad2/3, čo môže predstavovať ochranný mechanizmus proti ATS v stenách ciev. Prítomnosť Eng vedie k zvýšeniu produkcie eNOS, čo vedie k zvýšenej tvorbe NO (6, 112). Expressia a aktivita NO je veľmi dôležitá z hľadiska ochrany endotelu, z čoho vyplýva, že jeho znížená expresia súvisí s rozvojom ED a následnou aterogenezou (6). Znížená expresia eNOS viedla k zníženej vazodilatácii endotelu v *in vivo* štúdií na Eng heterozygotných myšiach (Eng^{+/-}) (113). Taktiež *in vitro* zníženie expresie Eng u endotelových buniek ľudskej pupočníkovej žily (HUVEC) stimulovaných prostredníctvom TNF- α , viedlo k indukcií zápalových procesov a súčasnému poklesu eNOS (114).

Na druhej strane, niekoľko štúdií *in vitro* ukázalo, že zvýšená expresia Eng pri zápalových stavoch vedie k zvýšenej adhézii a transendotelovej migrácii leukocytov (115). Uvádza sa, že rôzne stimuly súvisiace s ED, ako je vaskulárny stres či prítomnosť oxysterolov, zvyšujú transkripciu Eng prostredníctvom transkripčných faktorov KLF6, LXR (NR1H3) a NF- κ B (RelA) (7). *In vivo* štúdiá na Eng^{+/-} a Eng^{+/+} myšiach stimulovaných prostredníctvom lipopolysacharidu (LPS) a karagenanu (induktory zápalu) ukázala, že transendotelová migrácia leukocytov bola významne nižšia u myší Eng^{+/-}, z čoho vyplýva, že Eng sa podieľa na transendotelovej migrácii leukocytov (5). Zvýšené hladiny Eng boli zaznamenané aj pri hyperglykémii a zvýšenom systolickom krvnom tlaku u pacientov s AH a DM (47).

Úloha sEng v ED je rovnako protichodná ako úloha membránového Eng. Niektoré publikácie sa zaoberali interakciou Eng s leukocytmi a krvnými doštičkami prostredníctvom jeho RGD oblasti. Ukázalo sa, že zvýšená adhézia a transmigrácia leukocytov k povrchu EC môže byť blokována pridaním sEng. Keďže sEng pozostáva z extracelulárnej domény membránového Eng, obsahuje vo svojej štruktúre aj RGD oblasť. Vďaka tomu je sEng schopný interagovať s integrínmi leukocytov a krvných doštičiek, čo vedie k zníženiu adhézie a transmigrácie leukocytov cez endotel. Ak sú integríny obsadené väzbou so sEng, nebudú už dostupné pre interakciu s membránovým Eng a nebudú sa tak podieľať na adhézii a transmigrácii leukocytov (5).

Avšak, vysoké hladiny sEng boli zaznamenané aj pri niekoľkých patologických stavoch súvisiacich s ED. Napríklad, zvýšené plazmatické hladiny sEng sa preukázali u tehotných žien s preeklampsiou a u pacientov s pokročilým DM, hypercholesterolémiou a AH (66, 115, 116). Ukázalo sa, že stimulácia HUVEC prostredníctvom sEng viedla k zvýšeným hladinám NF- κ B a interleukínu-6, čo naznačuje, že sEng má tiež prozápalový potenciál. Na základe týchto štúdií môžeme predpokladať, že sEng podporuje rozvoj ED, čo môže prispieť k rozvoju zápalových procesov a metabolického syndrómu (115, 117).

2.2.4 Typy endotelových buniek používaných vo výskume kardiovaskulárneho systému

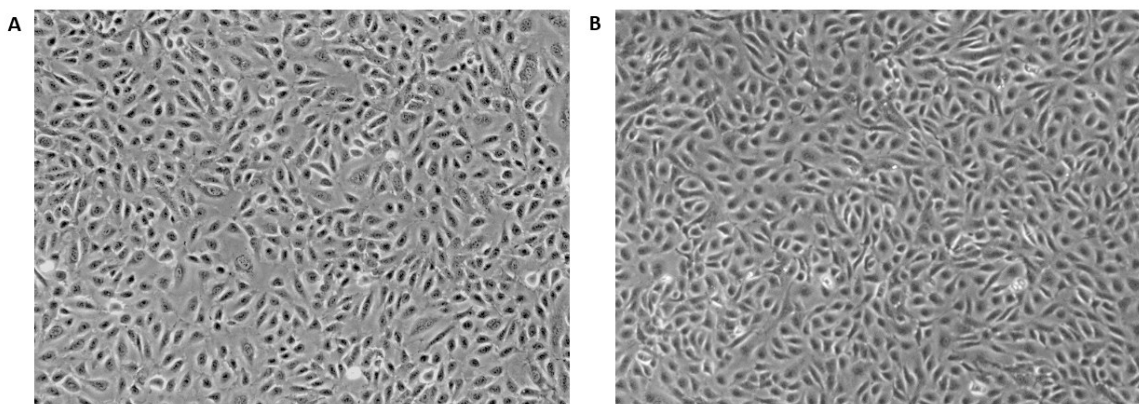
Do patogenézy KVO zasahuje množstvo genetických a environmentálnych faktorov, vrátane štrukturálnych a metabolických zmien, zápalových procesov, fibrózy a prestavby tkaniva. Pochopenie molekulárnych mechanizmov je kľúčom k terapeutickému pokroku. Pre skúmanie molekulárneho základu KVO sú potrebné spoľahlivé *in vitro* a *in vivo* modely chorôb, aby bolo možné modelovať, čo sa deje v ľudskom organizme (118).

Kardiovaskulárny systém (KVS) tvoria početné typy buniek, ktoré spolu prispievajú k správnej funkcii celého aparátu. Súhra všetkých typov buniek KVS je dôležitá pre správnu fyziológiu srdca. Príkladom sú EC a bunky hladkého svalstva, ktoré síce majú odlišné úlohy v KVS, no aj napriek tomu je prítomnosť oboch typov buniek kľúčová pre správne fungovanie systému ako celku. Dysfunkcia čo len jedného typu môže viesť k rozvoju rôznych patológií. Najintuitívnejšou metódou na charakterizáciu patológie je priama analýza ľudských buniek postihnutého orgánu. Primárnu kultúru tvoria bunky priamo izolované z natívneho tkaniva, ktoré najpresnejšie simulujú fyziologické procesy prebiehajúce v organizme. Primárne bunky KVS sú ťažko dostupné a získavajú sa, napríklad, počas operácie alebo transplantácie orgánov. Pre vytvorenie neobmedzeného zdroja srdcových buniek vyvinuli výskumníci immortalizované postmitotické línie kardiomyocytov, avšak simulácia fyziologických procesov za ich využitia nie je tak presná, keďže počas ich subkultivácie môže dôjsť k rôznym mutáciám alebo genetickým zmenám (119) (120).

Vaskulárne EC hrajú dôležitú úlohu v koagulačnej regulácii, pri regulácii vaskulárneho tonu, pri aterogenéze či u nádorovej angiogenézy. EC sa často používajú na štúdium patofyziológie ATS, DM a adhézie leukocytov pri zápalových ochoreniach. Väčšina štúdií bola vykonaná na primárnych arteriálnych a venózných endoteliálnych bunkových kultúrach (121). EC boli izolované z rôznych zdrojov, napríklad z pupočníkovej šnúry, aorty, koronárnych artérií a iných (122).

HUVEC patria medzi najpoužívanejšie bunky v KVS výskume (122). Sú považované za užitočný model pre výskum ľudského endotelu a hlavných biologických dráh zapojených do funkcie endotelu (123). Keďže arteriálne a venózne EC majú odlišný embryonálny pôvod a vykazujú odlišnú molekulárnu a funkčnú identitu, je dôležité vybrať správny endotelový podtyp buniek pre modelovanie KVO (124). Na základe štúdií vieme, že arteriálne bunky sú lepším modelom pre výskum ATS než venózne bunky, keďže ATS typicky postihuje hlavne steny artérií (125).

Príkladom buniek použitých vo výskume ATS sú ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC), ktoré lemujú cievnu stenu aorty a zachovávajú si svoje diferencované vlastnosti *in vitro*. Keďže sú HAEC v organizme neustále vystavené vysokým hemodynamickým silám, produkujú vazoaktívne látky ako endotelín a NO (126). Okrem toho, produkujú antitrombotické a trombotické faktory a reagujú na TNF- α produkciou cytokínov a moduláciou expresie bunkových adhézných molekúl. Tieto fyziologické vlastnosti umožňujú, aby sa kultúry HAEC využívali pri štúdiu mechanizmov dysfunkcie endotelu, patogenézy vaskulárnych ochorení, zápalových procesov, ATS a pri vývoji nových liečebných postupov (121, 124). Na základe týchto vlastností a predchádzajúcich štúdií sme si HAEC zvolili pre naše experimenty (Obr. 9) (26, 115).



Obrázok 9: Typy endotelových buniek často používaných vo výskume KVS

A) HUVEC (endotelové bunky ľudskej pupočníkovej žily) B) HAEC (ľudské aortálne endotelové bunky)(127, 128).

2.3 Zápal

2.3.1 Definícia, klinické prejavy, fázy zápalu

V súčasnosti sa zápal považuje za komplexný súbor reakcií na poškodenie tkaniva, ktoré je primárne spôsobené toxickými chemikáliami, mikroorganizmami, imunologickými reakciami, traumou alebo infekciou (17). Infekčné agens, ako sú vírusy a baktérie, sú jedny z najbežnejších stimulov zápalu (19).

Niektoré z týchto reakcií môžu byť prospešné (hojenie rán, kontrola infekcií), alebo patologické, ako pri mnohých chronických chorobných stavoch. Zápalová odpoveď je obranný mechanizmus, ktorý sa vyvinul vo vyšších organizmoch, aby ich chránil pred infekciou a poranením. Jeho cieľom je lokalizovať a eliminovať škodlivého pôvodcu a odstrániť poškodené zložky tkaniva, aby sa telo mohlo začať hojiť. Odpoveď spočíva v zmenách prietoku krvi, zvýšení priepustnosti krvných ciev a migrácii tekutiny, bielkovín a leukocytov z krvného obehu do miesta poškodenia tkaniva (18).

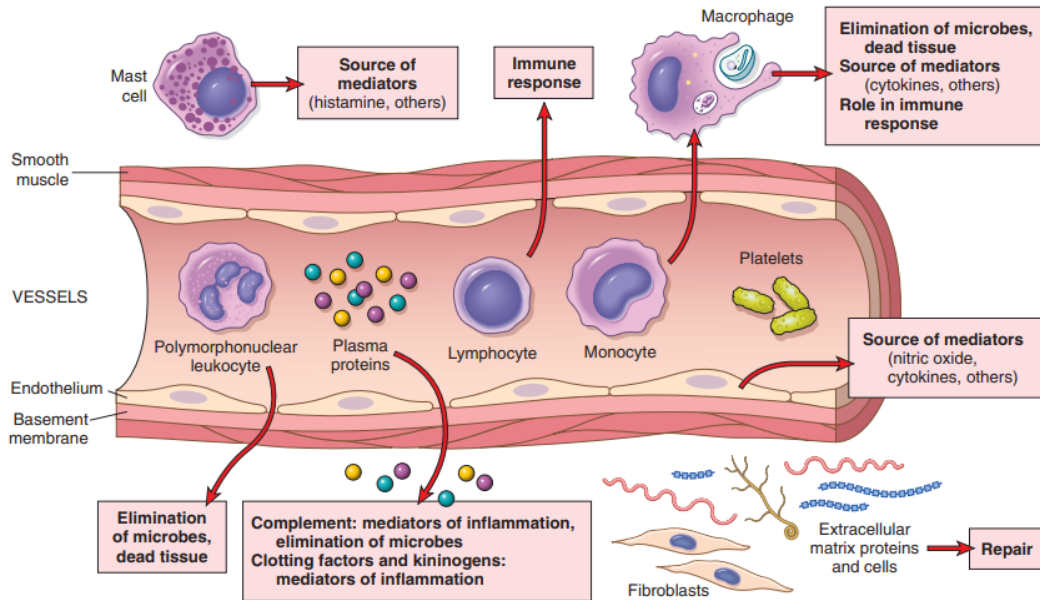
Ku klinickým prejavom zápalu radíme 5 hlavných znakov: začervenanie (*rubor*), teplo (*calor*), opuch (*tumor*), bolesť (*dolor*) a porucha funkcie (*functio laesa*) (19).

Začervenanie sa prejavuje hyperémiou zápalového ložiska a je spôsobené rozšírením malých krvných ciev v oblasti poranenia. Teplo vzniká v dôsledku zvýšeného prietoku krvi danou oblasťou. Prejavuje sa zvýšenou intenzitou katabolických procesov, vznikom pyrogénnych látok a je lokalizované len v periférnych častiach tela, ako je koža. Horúčku spôsobujú chemické mediátory zápalu, ktoré prispievajú k zvýšeniu teploty pri poranení. Opuch, nazývaný aj ako edém, súvisí so zvýšeným prietokom krvi v ložisku a následným výstupom tekutiny a krvných buniek mimo krvný obeh do tkanív. Tento proces sa taktiež nazýva ako exsudácia a infiltrácia. Bolesť spojená so zápalom je čiastočne výsledkom deformácie tkanív spôsobenej edémom. Taktiež je vyvolaná určitými mediátormi zápalu ako cytokíny, histamín, bradykinín, prostaglandíny a leukotrieny (18, 129). Porucha funkcie je spôsobená poškodením tkaniva, poruchami krvného a lymfatického obehu a reflexným útlmom aktivity postihnutého orgánu (18).

Podľa dĺžky trvania delíme zápal na akútny, subakútny a chronický. Jednotlivé zložky a funkcie akútnej a chronickej zápalovej reakcie sú popísané na Obr. 10 (20).

Akútny zápal má rýchly nástup v priebehu minút alebo hodín. Prejavuje sa klasickými znakmi a symptómami zápalu a zvyčajne vymizne do niekoľkých dní. Je charakteristický erytémom, exsudáciou tekutín a plazmatických proteínov, a taktiež akumuláciou leukocytov (20). Subakútny zápal je obdobie medzi akútnym a chronickým zápalom a môže trvať niekoľko dní až týždňov (18).

Chronický zápal má pomalý nástup v priebehu dní a môže pretrvávať niekoľko týždňov až rokov. Nemá tak výrazné klasické znaky a symptómy. Bunkový infiltrát je primárne zložený z monocytov alebo makrofágov a lymfocytov. Typickým znakom je vaskulárna proliferácia a fibróza tkaniva (18).



Obrázok 10: Zložky akútnej a chronickej zápalovej reakcie a ich hlavné funkcie

Na obrázku sa nachádzajú rôzne typy buniek, ktoré sa podieľajú na zápalovom procese. Mastocyty, známe tiež ako žirné bunky, produkujú histamín – mediátor zápalu. Polymorfonukleárne leukocyty sa podieľajú na eliminácii mikróbov a odumretého tkaniva. Plazmatické proteíny (komplement, zrážacie faktory a kininogény) sa podieľajú na regulácii zápalu a na eliminácii mikróbov. Lymfocyty sprostredkovávajú imunitnú odpoveď prostredníctvom lymfokínov a protilátok - imunoglobulínov. Makrofágy, ktoré sa hromadia v mieste poškodenia pochádzajú z cirkulujúcich monocytov. Okrem stimulácie imunitného systému a zvyšovania zápalu môžu makrofágy uvoľňovať cytokíny a podieľať sa na eliminácii mikróbov a odumretého tkaniva. Na obnove poškodeného tkaniva a produkcii stavebných zložiek medzibunkovej hmoty sa zúčastňujú fibroblasty a extracelulárne proteíny (111).

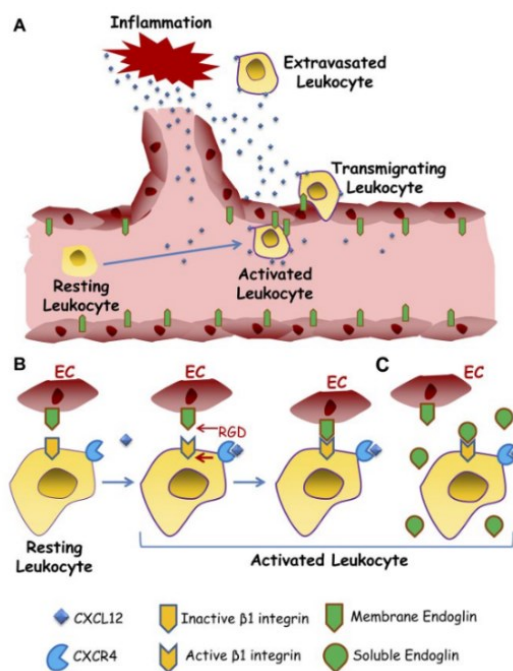
2.3.2 Úloha endoglinu u zápalu

Cievny endotel riadi pohyb leukocytov z krvného obehu do okolitých tkanív a naopak. Migrácia leukocytov zahŕňa adhéziu interakciu bunkových povrchových receptorov s ligandami, ktoré sú exprimované na povrchu EC v zápalovom procese. Faktor 1 alfa odvodený zo stromálnych buniek (SDF1 α), tiež známy ako chemokínový ligand 12 s motívom C-X-C (CXCL12) je silným chemoatraktantom pre rôzne bunky vrátane lymfocytov, monocytov, dendritických buniek a hematopoetických kmeňových buniek. CXCL12 a jeho receptor CXCR4 sú dôležitou súčasťou imunitných a zápalových odpovedí, ktoré zahŕňajú adhéziu a transendotelovú migráciu leukocytov (130). Proces migrácie

leukocytov cez endotelovú monovrstvu zahŕňa interakciu medzi integrínmi leukocytov a receptormi EC (131). *In vitro* štúdia preukázala, že leukocyty stimulované CXCL12 výrazne adherovali na Eng potiahnuté kultivačné dosky a na EC exprimujúce Eng (5).

Štúdie *in vivo* a *in vitro* ukázali, že Eng sa dokáže viazať na integríny leukocytov prostredníctvom RGD tripeptidu, ktorý je umiestnený v jeho extracelulárnej doméne, čo umožňuje leukocytom migrovať cez cievnú stenu do príslušného tkaniva (5, 32).

Zaujímavým pozorovaním je vlastnosť sEng inhibovať adhéziu a transmigráciu leukocytov cez monovrstvu EC. sEng sa viaže na integríny leukocytov, čím blokuje ich možnosť naviazať sa na Eng nachádzajúci sa na EC a následne prechádzať cievnou stenou (Obr. 11) (5).



Obrázok 11: Úloha endoglínu pri extravazácii leukocytov

Obrázok znázorňuje hypotetický model transmigrácie leukocytov cez endotel cievy. A) Pri zápalových stimuloch sa uvoľňujú rôzne rozpustné faktory vrátane chemokínového ligandu 12 s motívom C-X-C (CXCL12), čo vedie k aktivácii a extravazácii leukocytov závislej od endoglínu. B) Proces transmigrácie leukocytov zahŕňa väzbu CXCL12 na jeho receptor CXCR4, ktorý následne aktivuje $\beta 1$ integríny. Po aktivácii sa $\beta 1$ integrín viaže na RGD (tripeptidová sekvencia arginín-glycín-aspartát) oblasť endoglínu, ktorý sa nachádza na povrchu endotelových buniek. C) Solubilný endoglín súťaží s membránovým endoglínom o väzbu na integríny leukocytu $\beta 1$, čím interferuje s adhéziou a transmigráciou leukocytov (5).

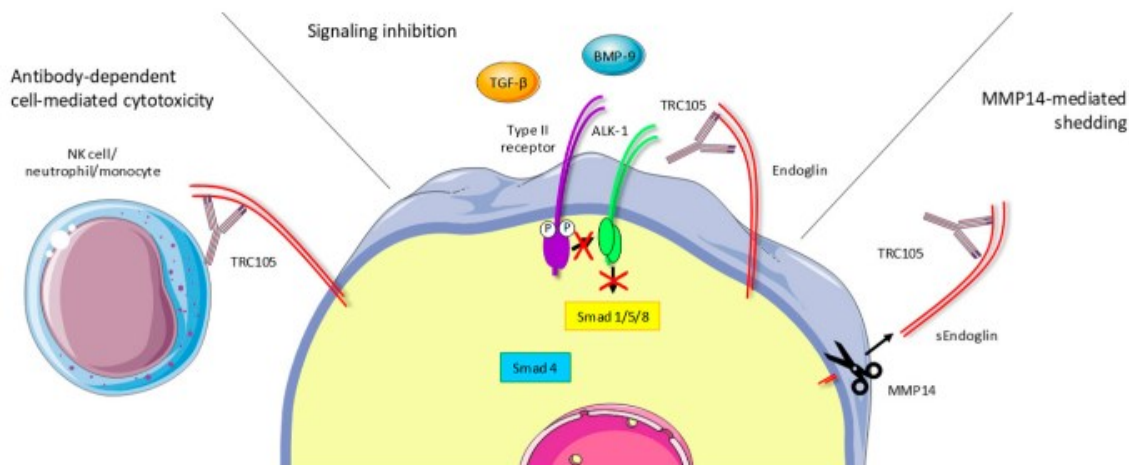
2.4 TRC105

2.4.1 Mechanizmus účinku

TRC105 (carotuximab) je chimerická monoklonálna protilátka (IgG1), ktorá sa viaže na Eng. Eng sa okrem bunkových typov spomínaných v úvode, vyskytuje aj u nádorových buniek, čo viedlo k vzniku tejto monoklonálnej protilátky pre Eng (21, 22).

TRC105 pôsobí viacerými mechanizmami účinkov. Po prvé, väzba TRC105 na Eng indukuje bunkami sprostredkovanú cytotoxicitu závislú od protilátok (ADCC) prostredníctvom NK buniek (prirodzení zabíjači), neutrofilov a monocytov, čo vedie k usmrteniu cieľových buniek. Po druhé, TRC105 sa viaže na Eng a zabraňuje tak molekule BMP9 interagovať s hydrofóbnym povrchom na OD Eng (23), čo má za následok inhibíciu Eng signalizácie prostredníctvom ALK1/Smad1/5 signalizačnej dráhy. Po tretie, TRC105 indukuje štiepenie Eng prostredníctvom MMP14, čím dochádza k tvorbe sEng. Jednotlivé mechanizmy sú schematicky znázornené na Obr. 12 (21, 132).

Úloha TRC105 nie je zatiaľ dostatočne objasnená. Na základe niektorých štúdií inhibuje TRC105 len ALK5/Smad2/3 fosforyláciu (133, 134), zatiaľ čo iné štúdie ukázali, že TRC105 je schopný blokovat' obe signalizačné kaskády (ALK5/Smad2/3 a ALK1/Smad1/5/8) (26, 135).



Obrázok 12: Mechanizmus účinku TRC105

V prvej časti obrázku indukuje väzba TRC105 na endoglin bunkami sprostredkovanú cytotoxicitu prostredníctvom NK buniek (prirodzení zabijáči), neutrofilov a monocytov. V druhej časti sa TRC105 viaže na endoglin a bráni väzbe BMP9 na receptor. V poslednej časti obrázku TRC105 indukuje štiepenie endoglinu prostredníctvom enzýmu matrixovej metaloproteinázy 14 (MMP14) a vzniká solubilný endoglin (sEng) (21).

2.4.2 Klinické použitie

TRC105 bolo pôvodne vyvinuté ako monoklonálna protilátka pre onkologickú terapiu so zameraním na proliferujúci endotel v cievach nádorov. V klinických štúdiách bolo testované aj na liečbu vekom podmienenej makulárnej degenerácie (21, 22). TRC105 bolo dobre tolerované v klinicky relevantných dávkach, no ukázalo sa, že samostatne nemá klinický prínos v porovnaní so súčasnou liečbou. Momentálne prebieha klinická štúdia, ktorá testuje TRC105 v kombinácii s osimertinibom pri nemalobunečnom karcinóme pľúc (24, 25).

V kontexte vývoja ED a súvisiacich rizikových faktorov nie je veľa dostupných štúdií o potenciálnej úlohe liečby TRC105 na expresiu, signalizáciu a funkciu Eng. Preto sa nová vetva výskumu zaoberá využitím TRC105 v stavoch, ktoré nesúvisia s nádorovými ochoreniami, ale s rozvojom ED (26).

V jednej zo štúdií bol TRC105 použitý ako model farmakologickej látky, ktorá je schopná priamo modulovať Eng a jeho signalizáciu počas rozvoja ED. Hypercholesterolémia

a hyperglykémia stimulujú proteínovú expresiu Eng, proteínov Smad, VCAM-1 a P-selektínu v EC a stimulujú tiež adhéziu a transmigráciu monocytov cez monovrstvy EC. Po premedikácii EC TRC105, ktoré boli vystavené vysokým hladinám glukózy a cholesterolu sa zistilo, že prítomnosť TRC105 znižuje expresiu Eng a proteínov Smad, ale zvyšuje expresiu adhézných molekúl VCAM-1 a P-selektínu. Stimulácia buniek prostredníctvom TRC105 znižuje adhéziu a transmigráciu monocytov cez endotel, bez ohľadu na zvýšenú expresiu molekúl bunkovej adhézie. Tieto výsledky naznačujú, že znížená expresia Eng pomocou TRC105 vedie k zníženej bunkovej adhézii a transmigrácii spojenej s hyperglykémiou a hypercholesterolémiou, čo značí že Eng by mohol byť potenciálny farmakologický cieľ u ochorení charakteristických zvýšenou glukózou a cholesterolom (26).

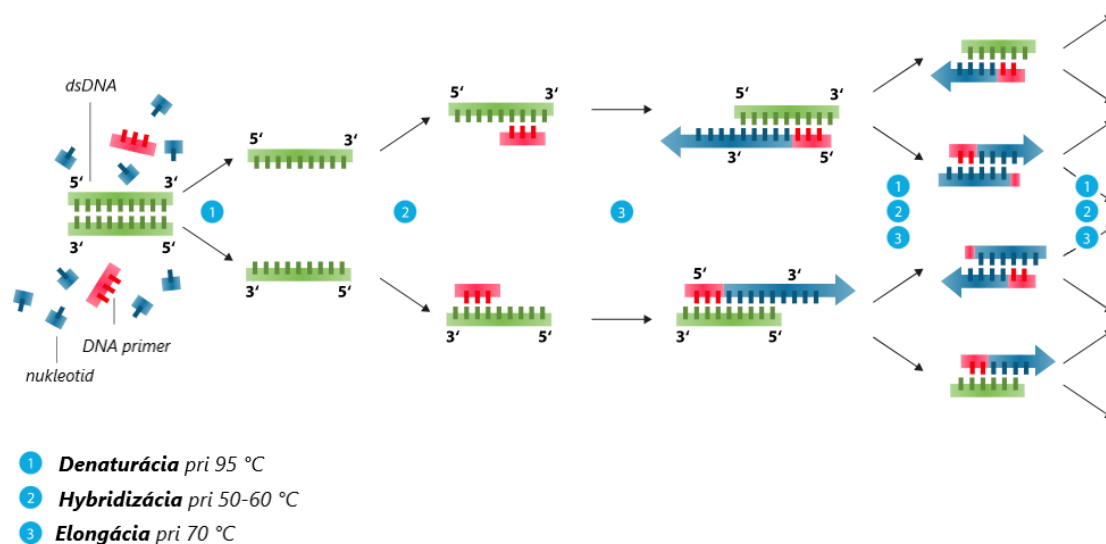
2.5 Metódy používané na detekciu endoglnu

2.5.1 PCR – základné princípy

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je základná metóda molekulárnej biológie, ktorá nám umožňuje amplifikovať špecifický fragment deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) z komplexnej DNA (136). PCR test prvýkrát použil Dr. Kary Mullis, ktorý uviedol, že nám PCR dovoľuje vybrať si akýkoľvek kúsok DNA, ktorý nás zaujíma a mať ho v takom množstve, v akom chceme (137). Ako zdroj DNA môžeme použiť rôzne tkanivá organizmov, vrátane periférnej krvi, kože, vlasov, slín a mikróbov. PCR je citlivý test, pre ktorý sú dostačujúce len stopové množstvá DNA, aby sa dokázal vytvoriť dostatočný počet kópií pre analýzu (136).

Každý PCR test si vyžaduje prítomnosť templátovej DNA, primerov, nukleotidov a DNA polymerázy. DNA polymeráza je kľúčovým enzýmom, ktorý spája jednotlivé nukleotidy a na základe komplementarity primerov k templátovej DNA vytvára produkt PCR. Nukleotidy zahŕňajú štyri bázy – adenín, tymín, cytozín a guanín. Primery sú krátke fragmenty DNA s definovanou sekvenciou a slúžia ako predĺžovací bod pre DNA polymerázu (136).

Vyššie uvedené zložky sa zmiešajú v skúmavke alebo 96-jamkovej doske, a potom sa umiestnia do termocykléra, ktorý umožňuje opakované cykly amplifikácie DNA v troch základných krokoch. Zariadenie zvyšuje a znižuje teplotu bloku v presných a vopred naprogramovaných krokoch, ktoré zahŕňajú denaturáciu, hybridizáciu a elongáciu (138). Jednotlivé kroky sú znázornené na Obr. 13.



Obrázok 13: Schematické znázornenie polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)

Na obrázku sú znázornené 3 základne kroky opakujúcich sa cyklov PCR metódy. Prvým krokom je proces denaturácie dvojreťazcovej deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), ktorý prebieha približne pri 95 °C. Druhý krok predstavuje proces hybridizácie medzi primermi a cieľovou DNA, ktorý prebieha pri teplote medzi 50-60 °C. Posledný krok sa nazýva elognácia, v ktorom enzým DNA polymeráza predlžuje primery pomocou nukleotidov, ktoré vkladá do nového vlákna DNAna základe komplementarity (139).

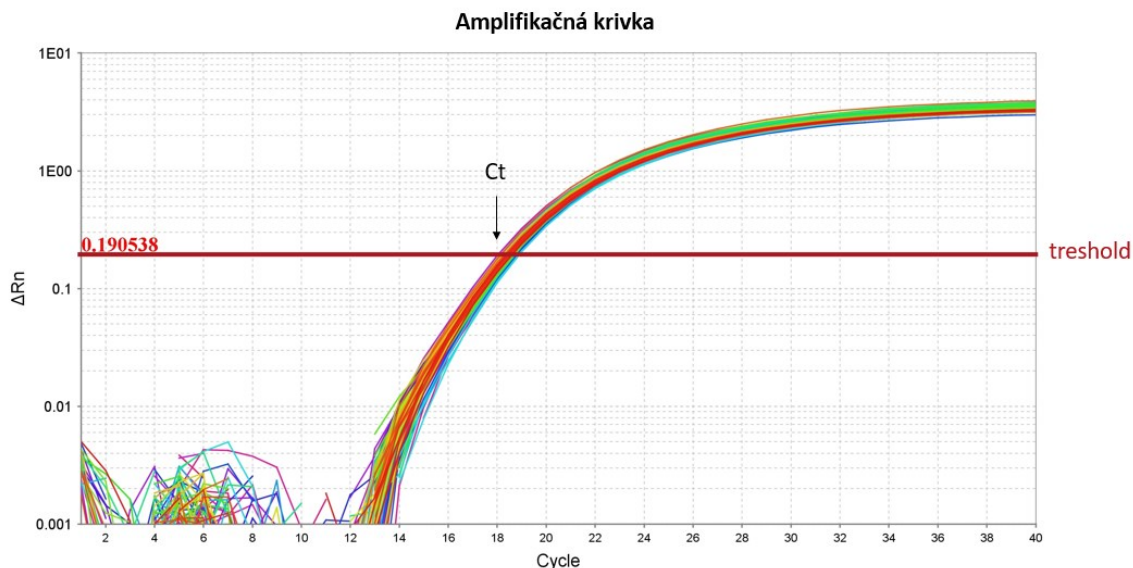
V procese denaturácie sa zahriatím DNA na teplotu okolo 95 °C rozpadnú vodíkové mostíky medzi vláknami DNA, čo vedie k rozdeleniu reťazcov a z dvojvláknovej DNA sa stáva jednovláknová DNA. Potom sa teplota zníži približne na 50-60 °C, čo má za následok väzbu špecifických primerov na segmenty templátovej DNA. Tento proces je známy ako hybridizácia alebo anelácia. K úspešnej hybridizácii medzi primermi a cieľovou DNA dochádza len na komplementárnych miestach v sekvencii. Následne sa teplota opäť zvýši na

približne 70 °C, pri ktorých je DNA polymeráza schopná predĺžiť primery zabudovaním nukleotidov do vyvíjajúceho sa vlákna DNA. Tento proces nazývame ako elongácia alebo syntetická fáza. Kvôli vysokým teplotám v denaturačnej fáze sa dnes používa špeciálna termostabilná DNA polymeráza, tzv. Taq polymeráza. Tieto tri kroky predstavujú jeden cyklus PCR a s každým opakovaním sa počet skopírovaných molekúl DNA zdvojnásobí (140, 141).

PCR môže prechádzať reverzná transkripcia, pokiaľ je potrebné namiesto DNA amplifikovať mRNA. V prvom kroku prebieha izolácia celkovej ribonukleovej kyseliny (RNA) alebo mRNA zo vzorku tkaniva. V ďalšom kroku nasleduje prevedenie mRNA na komplementárnu DNA (cDNA) pomocou reverznej transkriptázy (RT) (142).

Kvantitatívna reverzná transkripcia s následnou PCR (qRT-PCR) sa využíva na presnú analýzu génovej expresie. qRT-PCR udáva, koľko konkrétnej sekvencie DNA je prítomnej vo vzorke a umožňuje detekciu a kvantifikáciu produktu PCR v reálnom čase počas jeho syntézy (143). Využíva fluorescenčne značené oligonukleotidy, tzv. sondy (probes) modifikované fluorofórom a zhášačom. Sondy produkujú fluorescenčný signál, ktorý odráža množstvo vytvoreného produktu počas každého cyklu PCR. Týmto spôsobom sa spájajú kroky amplifikácie a detekcie nukleových kyselín do jedného testu (144, 145).

Počas počiatočných cyklov je signál slabý a nedá sa odlíšiť od pozadia. So zvyšujúcim sa množstvom cyklov sa produkt hromadí a vzniká signál, ktorý sa spočiatku zvyšuje exponenciálne a neskôr sa vyrovná a saturuje. Meranie PCR v koncovom bode nám teda nehovorí nič o počiatočných množstvách cieľových molekúl, ktoré boli prítomné vo vzorkách. Rozlišuje iba pozitívnu vzorku od negatívnej. Na druhej strane, krivky odozvy, ktoré popisujú, ako sa hromadí produkt, sú v rastovej fáze reakcie oddelené, vďaka čomu môžeme merať množstvo templátových molekúl. Rozdiel sa kvantifikuje porovnaním počtu amplifikačných cyklov potrebných na to, aby krivky odozvy vzoriek dosiahli určitú prahovú úroveň fluorescenčného signálu. Počet cyklov potrebných na dosiahnutie prahovej hodnoty sa nazýva hodnota CT, viz Obr. 14 (145, 146).



Obrázok 14: Amplifikačná krivka

Prahová úroveň (threshold) je nastavená dostatočne nad pozadím. Prístroj zaznamenáva počet cyklov potrebných na dosiahnutie prahovej hodnoty, Ct (vlastné výsledky).

Na kvantifikáciu výsledkov získaných PCR metódou sa používa tzv. konštitutívny gén (housekeeping gen), ktorý sa konštantne prepisuje vo všetkých typoch a vývojových štádiách buniek. Produkty kódované konštitutívnymi génmi sú nevyhnutné pre základné funkcie bunky. V našom prípade sme použili glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (GAPDH), ktorý sa často používa pre qRT-PCR analýzu. Expresia génu GAPDH sa medzi jednotlivými bunkami nemení a je konzistentná v rôznych časových bodoch a experimentálnych podmienkach (147).

2.5.2 Prietoková cytometria – základné princípy

Prietoková cytometria (FC) je metóda, ktorá je schopná merať a detekovať optické a fluorescenčné vlastnosti jednej bunky v rámci heterogénnej populácie. Dokáže analyzovať veľkosť buniek, granularitu buniek a taktiež fluorescenciu, ktorá môže byť daná naviazaním fluorescenčnej protilátky na určité proteíny na/v bunke (148, 149).

Základný princíp FC spočíva v tom, že laserový lúč prechádza pohybujúcou sa bunkou a dochádza k rozptylu svetla, ktoré dopadá na detektor. Rozptýlené svetlo sa

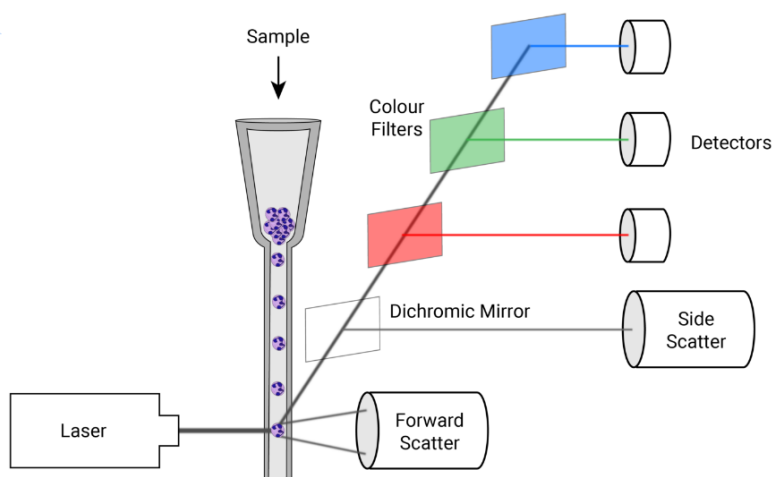
premieňa na napätový impulz, ktorý je analyzovaný pomocou špecifických softvérových programov. Tie sa najčastejšie zobrazujú ako bodové grafy (každá bodka predstavuje jednu bunku) alebo v podobe histogramu. Rozptyl svetla priamo súvisí so štrukturálnymi a morfológickými vlastnosťami bunky, zatiaľ čo emisia fluorescencie vyžarovaná z fluorescenčnej protilátky je úmerná množstvu protilátky naviazanej na bunku alebo bunkovú zložku (148, 149).

FC rozdeľujeme na triediaci a netriediaci typ. Netriediaca FC môže merať rozptyl svetla a fluorescenčnú emisiu, zatiaľ čo triediaca FC má schopnosť aj špecificky roztriediť jednotlivé častice na základe požadovaného parametru. Fluorescenčne aktivované bunkové triediče majú schopnosť triediť fluorescenčne značené bunky zo zmiešanej bunkovej populácie (149).

Prietokový cytometer pozostáva z niekoľkých kľúčových komponentov – fluidiky, optiky a elektroniky. Po umiestnení vzorky do prietokového cytometra prístroj krátko premieša a nasaje vzorku, ktorá sa vnesie do prúdu fosfátom pufrovaného fyziologického roztoku. Tlak tekutiny v prístroji je vždy väčší ako tlak vzorky, čo umožní bunkám prechádzajúcim cez zužujúci sa kanál vytvoriť jednu líniu (149, 150).

Každá bunka prechádza cez laserový lúč jednotlivo, čo umožňuje individuálnu analýzu všetkých buniek vo vzorke. Keď bunka prejde laserovým lúčom, lúč sa rozptýli do viacerých smerov. Prietokový cytometer detekuje dva typy rozptýleného svetla: svetlo rozptýlené v priamom smere, nazývané ako predný rozptyl (FSC – forward scatter) a svetlo rozptýlené do strán, nazývané ako bočný rozptyl (SSC – side scatter), viz Obr. 15 (149).

Svetlo rozptýlené v priamom smere dopadá na detektor, ktorý sa nachádza pozdĺž rovnakej osi ako laserový lúč. Detektor premieňa rozptýlené svetlo na napätový impulz, ktorý je priamo úmerný množstvu predného rozptýleného svetla. Z toho vyplýva, že čím je FSC väčší, tým je väčšia aj veľkosť bunky. Množstvo bočného rozptýleného svetla dopadá na detektor, ktorý je umiestnený kolmo na dráhu laserového lúča. Na základe získaných údajov z FSC a SSC môžeme bunky rozdeliť na jednotlivé populácie s rôznou veľkosťou, tvarom a štruktúrou (149, 151).



Obrázok 15: Schéma prietokového cytometru

Bunky prechádzajú laserovým lúčom jednotlivo, čo umožňuje analýzu všetkých buniek vo vzorke. Po prechode laserového lúča bunkou dochádza k rozptylu svetla, ktoré dopadá na detektor. Prietokový cytometer detekuje dva typy rozptýleného svetla: predný rozptyl (*forward scatter*) a bočný rozptyl (*side scatter*). Fluorescenčné svetlo sa odráža pod rovnakým uhlom ako bočný rozptyl svetla. Detektory sú schopné zachytávať emitované žiarenie o určitej vlnovej dĺžke podľa toho, aké filtre sú pred nimi umiestnené (152).

Prietokový cytometer dokáže detekovať aj emitované svetlo z excitovaných fluorescenčných molekúl ako sú fluorescenčne značené protilátky, fluorescenčné farbivá a iné. Fluorescenčné svetlo sa detekuje pod rovnakým uhlom ako SSC. Po excitácii laserom je svetlo vyžarované fluorofórom nasmerované k emisným filtrom. Prietokový cytometer môže detekovať prítomnosť fluorofórov, a taktiež kvantifikovať ich relatívne množstvo v bunke. Na základe fluorescencie môžeme medzi sebou rozlíšiť rozdielne populácie buniek, a taktiež zmenu expresie proteínov na/v bunke (149, 151).

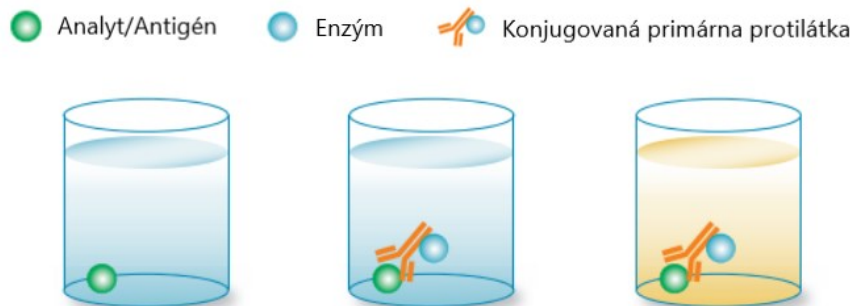
Detektor dokáže zachytávať emitované žiarenie o určitej vlnovej dĺžke tak, že sa pred neho umiestni vhodný filter, ktorý môže byť dlhopriepustný, krátkopriepustný alebo pásmový. Pásmové filtre absorbujú alebo odrážajú nežiadúce vlnové dĺžky a prepúšťajú len požadované časti spektra viditeľného svetla. Krátkopriepustné filtre prepúšťajú vlnové dĺžky svetla rovné alebo kratšie, ako je špecifikovaná vlnová dĺžka, zatiaľ čo dlhopriepustné filtre prepúšťajú vlnové dĺžky svetla rovné alebo dlhšie ako špecifikovaná vlnová dĺžka (151).

2.5.3 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je metóda, ktorá sa využíva ku kvantitatívnemu stanoveniu rôznych antigénov a na identifikáciu prítomnosti a koncentrácie molekúl v biologických tekutinách. Molekuly s veľmi nízkou koncentráciou, ako sú peptidy/proteíny, hormóny, vitamíny a liečivá, vykazujú vysokú úroveň špecificity voči protilátkam, ktoré boli pre ne vyvinuté. Na základe toho je možné ELISA metódu použiť aj na meranie látok vo veľmi nízkych koncentráciách (153-155).

Základný princíp je založený na vysoko špecifickej interakcii antigénu a protilátky, pričom na jednom z nich je kovalentne naviazaný enzým. Enzým katalyzuje chemickú premenu substrátu, pridaného do reakčnej zmesi na farebný produkt. Výsledný signál môžeme stanoviť spektrofotometricky alebo na základe fluorescencie. K meraniu sa najčastejšie využívajú 96-jamkové mikrotitračné polystyrénové dosky (153). V závislosti od typu ELISA metódy sa vyžaduje prítomnosť primárnej a/alebo sekundárnej detekčnej protilátky. Metódu ELISA môžeme využiť v niekoľkých rôznych usporiadaniach (154, 156, 157).

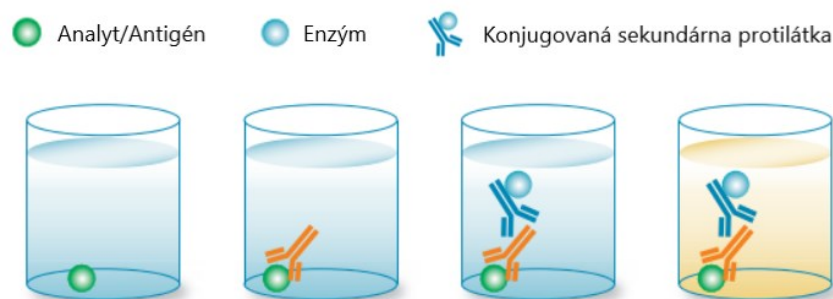
Priama ELISA je vhodná pre detekciu antigénu s vysokou molekulárnou hmotnosťou (153). Základným princípom je reakcia antigénu, prichyteného na pevnom povrchu, s primárnou detekčnou protilátkou značenou enzýmom, ktorý následne reaguje so substrátom za vzniku merateľnej farebnej zmeny (Obr. 16). Medzi výhody patrí eliminácia krížovej reaktivity sekundárnych protilátok. Vďaka menšiemu počtu krokov je priama ELISA rýchlejšia v porovnaní s nepriamou. Môžeme ju použiť pre kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie antigénu či protilátky vo vzorke, a taktiež k mapovaniu epitopov. Medzi nevýhody patrí nízka citlivosť v porovnaní s ostatnými typmi ELISA metód a vysoká cena (154, 157, 158).



Obrázok 16: Schematické znázornenie priamej ELISA metódy

Väzba antigénu na povrch jamky (vľavo), pridanie enzymaticky značenej protilátky (uprostred), pridanie substrátu (vpravo)(159).

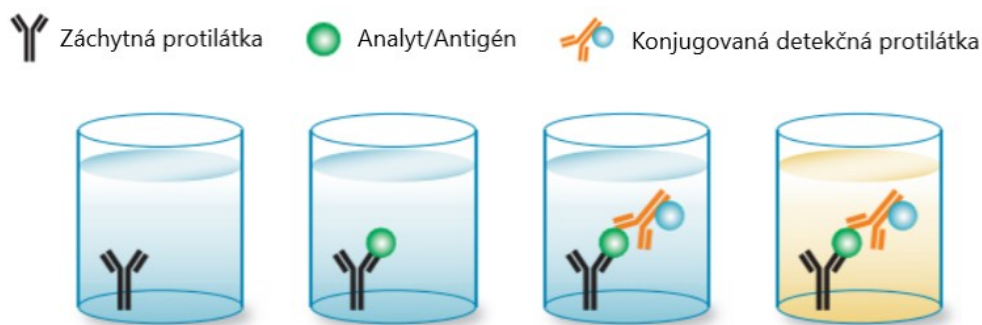
Nepriama ELISA si vyžaduje prítomnosť dvoch protilátok. Primárna detekčná protilátka sa naviaže na antigén a sekundárna protilátka, ktorá je komplementárna k primárnej protilátke, je spojená s enzýmom (Obr. 17). Nepriama ELISA má vyššiu citlivosť v porovnaní s priamou ELISA metódou a je vhodná pre stanovenie celkovej koncentrácie protilátok vo vzorke. Je tiež menej nákladná a flexibilnejšia vďaka mnohým rôznym primárnym protilátkam, ktoré je možné použiť s jednou značenou sekundárnou protilátkou. Nevýhodou nepriamej metódy je riziko skríženej reaktivity medzi sekundárnymi detekčnými protilátkami (154, 157, 158).



Obrázok 17: Schematické znázornenie nepriamej ELISA metódy

Väzba antigénu na povrch jamky (vľavo), pridanie primárnej protilátky (oranžová) a enzymaticky značenej sekundárnej protilátky (modrá), aplikácia substrátu (vpravo) (160).

Sendvičová ELISA sa nazýva ako „sendvič“ preto, že antigén je vložený medzi dve protilátky (záchytnú a detekčnú protilátku). Protilátky sú špecifické pre rôzne epitopy jedného antigénu. Záchytná protilátka je naviazaná na povrch jamky dosky a vycytáva antigén zo vzorky. Detekčná protilátka značená enzýmom slúži k detekcii prítomného antigénu. Ak pri sendvičovom usporiadaní použijeme len jednu značenú detekčnú protilátku, jedná sa o priame sendvičové usporiadanie (Obr. 18). V prípade nepriamej sendvičovej metódy je značená až sekundárna protilátka proti primárnej detekčnej protilátke. Sendvičová ELISA má 2 až 5-krát vyššiu citlivosť v porovnaní s ostatnými typmi ELISA. Vykazuje vysokú špecifickosť, pretože k detekcii jedného antigénu sa používajú dve protilátky. Hlavnými nevýhodami sú čas a náklady (154, 157, 161).



Obrázok 18: Schematické znázornenie priamej sendvičovej ELISA metódy

Väzba protilátky na povrch jamky (vľavo), väzba antigénu na protilátku a prídavok enzymaticky značenej protilátky (uprostred), prídavok substrátu (vpravo) (162).

Kompetitívna ELISA využíva k meraniu koncentrácie antigénu interferenciu signálov. Akákoľvek z vyššie spomenutých ELISA metód môže byť prevedená na kompetitívne usporiadanie. Pri prevedení nepriameho usporiadania metódy ELISA na kompetitívne usporiadanie môže antigén zo vzorky súťažiť s referenčným antigénom o väzbové miesta na primárnej protilátke. Referenčný antigén je imobilizovaný na povrchu jamiek a antigén vo vzorke je najprv zmiešaný s protilátkou, a potom pridaný do jamky. Po ustálení rovnováhy sa nenaviazaná analyzovaná vzorka z dosky premyje a následne sa pridá sekundárna protilátka značená enzýmom. Čím viac primárnej protilátky sa vyviaže

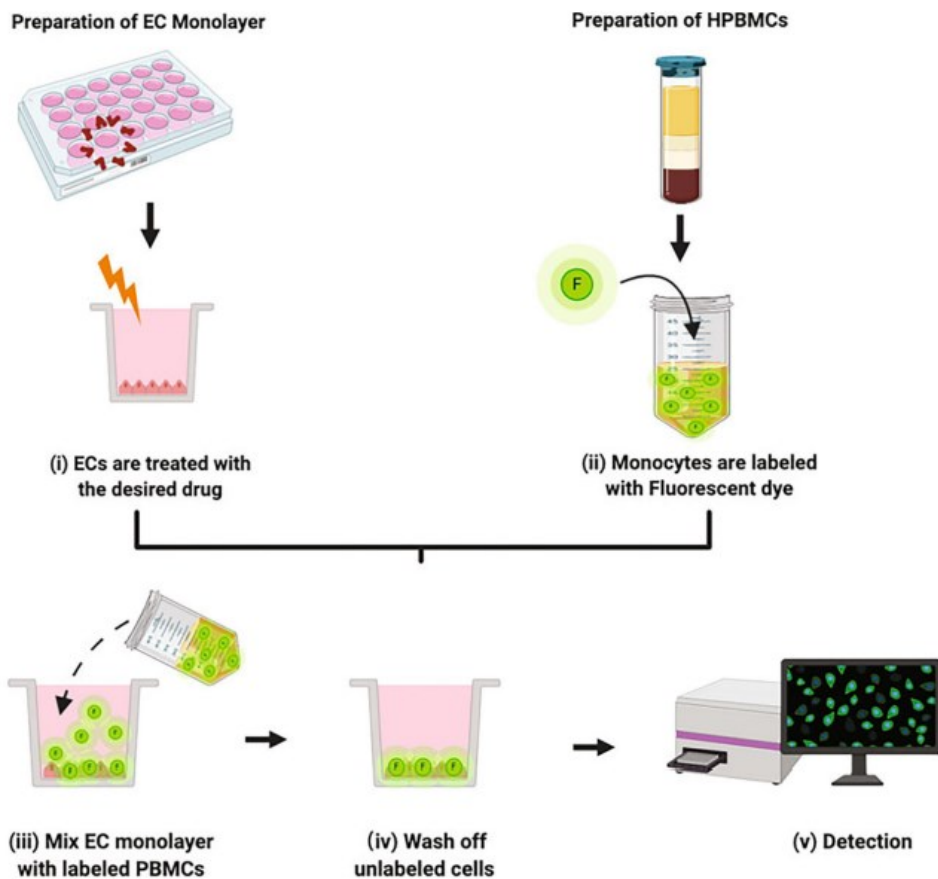
antigénom zo vzorky, tým slabší bude detekovaný signál (163). Výhodou tejto metódy je, že toto usporiadanie nie je tak citlivé na riedenie vzoriek a opakovane merané výsledky vykazujú menšiu variabilitu. Kompetitívne usporiadania sú užitočné pre meranie koncentrácie antigénu v komplexných zmesiach, kedy sú neznáme vzorky obsahujúce antigén porovnávané s podobnými vzorkami, ktoré obsahujú známe množstvo antigénu (154, 158, 163).

2.5.4 Adhézia monocytov k endotelovým bunkám

Aktivácia a dysfunkcia EC vedie k vzniku patologických procesov. Na základe mnohých stimulov sa cirkulujúce prozápalové cytokíny viažu na svoje receptory na povrchu EC, čo vedie k zvýšenej regulácii bunkových adhézných molekúl a chemokínov. Akumulácia monocytov a makrofágov v stene ciev vedie k chronickému zápalu a k rozvoju a progresii ATS (164).

Počas iniciácie vzniku aterosklerotického plátu sú adhézia a následná diapedéza monocytov do subendotelovej vrstvy kľúčovými udalosťami (93). Celkový proces adhézie monocytov k stene ciev zahŕňa prechodné adhezívne interakcie a rolovanie monocytov. Zatiaľ čo proces rolovania je sprostredkovaný rôznymi selektínmi, následná pevná adhézia je regulovaná adhéznymi molekulami (VCAM-1 a ICAM-1) lokalizovanými na povrchu EC (165). Monocyty sa po prechode do subendotelovej vrstvy diferencujú na makrofágy a vychytávajú oxidované LDL častice za vzniku penových buniek, ktoré tvoria tukové pruhy, čo vedie k pokročilejším aterosklerotickým léziám (164).

Adhézia monocytov umožňuje detekciu a kvantifikáciu monocytov, ktoré prilnú na monovrstvy EC *in vitro*. Tento experiment sa uskutočňuje buď priamym počítaním adherovaných monocytov alebo nepriamym meraním fluorescenčne značených adhézných monocytov. Metóda založená na fluorescencii je citlivejšia a flexibilnejšia. EC sa kultivujú a premedikujú požadovanými liečivami, cytokínmi alebo inými stimulmi, čo vedie k ich aktivácii a následne sa inkubujú s fluorescenčne značenými monocytmi. Stanovenie počtu fluorescenčne značených adhézných monocytov na monovrstve EC prebieha pomocou cytometra (Obr. 19) (166).



Obrázok 19: Adhézia monocytoŕ k endotelovým bunkám na báze fluorescence

Metóda zahŕňa prípravu a premedikáciu monovrstvy endotelových buniek (EC monolayer) a fluorescenčné značenie ľudských mononukleárných buniek periférnej krvi (HPBMCs). Zmes premedikovaných EC a značených priľnutých HPBMCs sa následne detekuje a kvantifikuje pomocou fluorescence (166).

2.5.5 Transmigrácia monocytov cez endotel

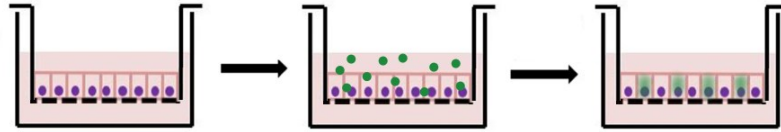
Interakcie medzi monocytmi a EC zahŕňajú okrem vyššie spomenutých procesov (rolovanie a adhézia) aj transendotelovú migráciu monocytov. Počas transmigrácie prenikajú monocyty prevažne cez medzibunkové spojenia EC (167). Predpokladá sa, že silné aktivačné stimuly patologických procesov ED narušujú adhézne spoje medzi bunkami, čo vedie k zníženiu bunkovej integrity a zvýšeniu transendotelovej migrácie monocytov (107, 168).

Podstatnou stabilizujúcou zložkou adhézných spojov je membránový vaskulárny endotelový glykoproteín kadherín (VE-kadherín), ktorý je spojený s aktínovým cytoskeletom prostredníctvom α -katenínu. Procesy, ktoré narúšajú túto interakciu zvyšujú vaskulárnu permeabilitu. Na základe štúdií sa preukázalo, že znížením VE-kadherínovej expresie sa zvyšuje transmigračná aktivita monocytov (169, 170).

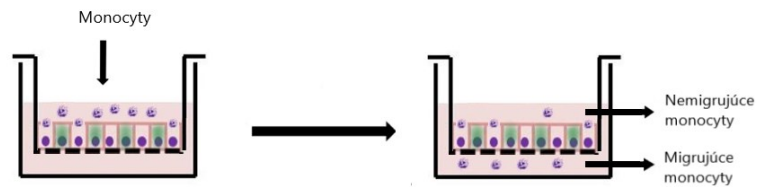
Ďalšou dôležitou skupinou adhézných spojovacích molekúl sú JAM proteíny, ktoré sú exprimované na leukocytoch, krvných doštičkách, epiteliálnych bunkách a EC (171). Membránový glykoproteín PECAM-1 je taktiež dôležitou súčasťou procesu transmigrácie monocytov, keďže monoklonálne protilátky proti PECAM-1 blokujú v niektorých modeloch transmigráciu monocytov až o 70 – 90 %. Protilátky namierené proti dvom ďalším membránovým proteínom, CD99 a CD99L2, zhoršujú influx monocytov do miesta zápalu vo väčšej miere v porovnaní s protilátkou anti-PECAM-1. Zatiaľ čo protilátky anti-PECAM-1 a anti-CD155 bránia migrácii monocytov už na povrchu EC, anti-CD99 a anti-CD99L2 inhibujú migráciu monocytov až v časti endotelového spojenia (172, 173). PECAM-1, CD155, CD99 a CD99L2 sa zúčastňujú procesu extravazácie, ale nie zachytávania alebo adhécie monocytov k stene ciev (174).

Najrozšírenejšou metódou bunkovej transmigrácie je Boyden Chamber test, ktorý pozostáva z dvoch kompartmentov oddelených polopriepustnou membránou. V hornom kompartimente sa vytvorí monovrstva EC, ktorá sa inkubuje v prítomnosti rôznych stimulov. Po premedikácii a inkubácii EC sa do horného kompartmentu umiestnia monocyty, ktoré migrujú z hornej časti kompartmentu do spodnej časti cez póry membrány a EC. Monocyty, ktoré migrovali na druhú stranu membrány môžeme označiť farbivami a spočítať (Obr. 20) (175, 176).

A Príprava a premedikácia buniek



B Migrácia monocytov



Obrázok 20: Transmigrácia monocytov cez polopriepustnú membránu

*A) EC sa nanesú na poréznu membránu, premedikujú sa stimulmi a nechajú sa kultivovať.
B) K premedikovaným bunkám sa pridajú monocyty, ktoré migrujú na druhú stranu membrány do spodného kompartmentu. V hornom kompartmente sa nachádzajú monocyty, ktoré nemigrovali cez membránu. Monocyty, ktoré migrovali cez membránu a nachádzajú sa v spodnom kompartmente môžeme označiť farbivami a spočítať (177).*

3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či monoklonálna protilátka TRC105 (carotuximab) ovplyvňuje expresiu endoglínu a jeho transkripčných faktorov (KLF6, RelA a NR1H3), expresiu biomarkerov zápalom indukovanej endotelovej dysfunkcie (ICAM-1, VCAM-1, E-selektín), expresiu enzýmu MMP-14, hladinu solubilného endoglínu a adhéziu a transmigráciu monocytov cez ľudské aortálne endotelové bunky vystavené pôsobeniu prozápalových stimulov TNF- α (10 ng/ml) a LPS (100 ng/ml) po dobu 16 hodín.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 *Príprava vzoriek*

4.1.1 Rozmrazovanie buniek

V prvom kroku sme si nahriali želatínu a médium pre HAEC (PromoCell, kat.č.: C-12271) na 37°C vo vodnom kúpeli. Proces nahrievania trval vždy aspoň 20 minút.

Zloženie 0,1% želatíny:

- 76 ml sterilného PBS (*phosphate-buffered saline = fosfátový tlmivý roztok*)
- 4 ml 2% želatíny

Zloženie HAEC média:

- 200 ml EBM-2 (*endothelial cell growth basal medium = médium pre rast endotelových buniek*)
- 22 ml FBS (*fetal bovine serum = fetálne hovädzie sérum*)
- 800 µl FGF (*fibroblast growth factor = fibroblastový rastový faktor*)
- 80 µl hydrokortizónu
- 200 µl VEGF (*vascular endothelial growth factor = cievny endotelový rastový faktor*)
- 200 µl R₃-IGF (*recombinant insulin-like growth factor = rekombinantný rastový faktor podobný inzulínu*)
- 200 µl kyseliny askorbovej
- 200 µl hEGF (*human epidermal growth factor = ľudský epidermálny rastový faktor*)
- 200 µl GA-1000 (*gentamicin sulfát, amfotericin*)

Následne sme do každej kultivačnej nádoby (60 cm²) pridali 1,5 ml želatíny. Miernym poklepaním o dlaň sme dosiahli, že želatína pokryla celý povrch nádoby. Potom sme kultivačné nádoby vložili na 20 minút do inkubátora (teplota 37 °C, 5% CO₂), kde došlo k prichyteniu želatíny na dno kultivačnej nádoby. Po 20 minútach sme prebytočnú želatínu odsali a pridali 8 ml média do každej nádoby.

Bunky uchovávané v mrazničke pri -80°C sme rozmrazili vo vodnom kúpeli (37°C) tak, aby v kryoskúmavke zostala malá guľička ľadu. Celý obsah kryoskúmavky sme následne preniesli do kultivačných nádob s pripraveným médiom. Kultivačné nádoby s bunkami sme umiestnili do inkubátora a nechali ich inkubovať po dobu 2 dní.

4.1.2 Pasážovanie

Pred samotným pasážovaním sme si skontrolovali bunky pod mikroskopom. Bunky musia pokrývať minimálne 80% plochy kultivačnej nádoby, aby sme ich mohli pasážovať (Obr. 21).



Obrázok 21: Ľudské aortálne endotelové bunky po inkubácii

Na obrázku sa nachádzajú ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC; human aortic endothelial cells), ktoré majú pretiahnutý tvar a pokrývajú približne 90% povrchu kultivačnej nádoby (vlastné výsledky).

Ak boli bunky dostatočne narastené, vložili sme do vodného kúpeľa médium, PBS a enzým akutázu, aby sa nám nahrali.

Pripravili sme si potrebný počet kultivačných nádob na pasážovanie a do každej nádoby sme pridali želatínu, ktorú sme rozprestrelí po povrchu celej nádoby. Potrebné množstvo želatíny záviselo na type použitých kultivačných nádob. Pri metóde PCR sme použili 6-jamkové kultivačné nádoby, pri prietokovej cytometrii a adhézii 12-jamkové kultivačné nádoby a pri transmigrácii 24-jamkové kultivačné nádoby s inzertmi. Kultivačné nádoby sme následne vložili do inkubátora na 20 minút.

Z kultivačných nádob s HAEC bunkami sme odsali staré médium a pridali sme 3 ml PBS, ktorým sme preplachovali kultivačné nádoby. Všetky kultivačné nádoby sme preplachovali rovnakým spôsobom, aby sme zachovali totožné podmienky pre všetky bunky. Následne sme PBS odsali. Tento postup sme opakovali dvakrát. Týmto procesom sme odstránili mŕtve bunky a zvyšky média. V ďalšom kroku sme k bunkám pridali 1,5 ml enzýmu akutázy, ktorá slúži na oddelenie buniek z dna nádoby. Kultivačné nádoby sme vložili do inkubátora na 5 minút.

Medzičasom sme z novo-pripravených kultivačných nádob odsali želatínu a do každej jamky v 12-jamkovej kultivačnej nádobe sme pridali 400 μ l nahriateho média. V prípade 6-jamkovej nádoby sme pridali do každej jamky 900 μ l nahriateho média.

Po 5 minútach sme kultivačné nádoby s bunkami vytiahli z inkubátora a skontrolovali ich pod mikroskopom, či sa skutočne oddelili z dna nádoby. Ak sa bunky oddelili, boli suspendované v roztoku, čo pod mikroskopom pozorujeme ako zmenu tvaru, viz Obr. 22.

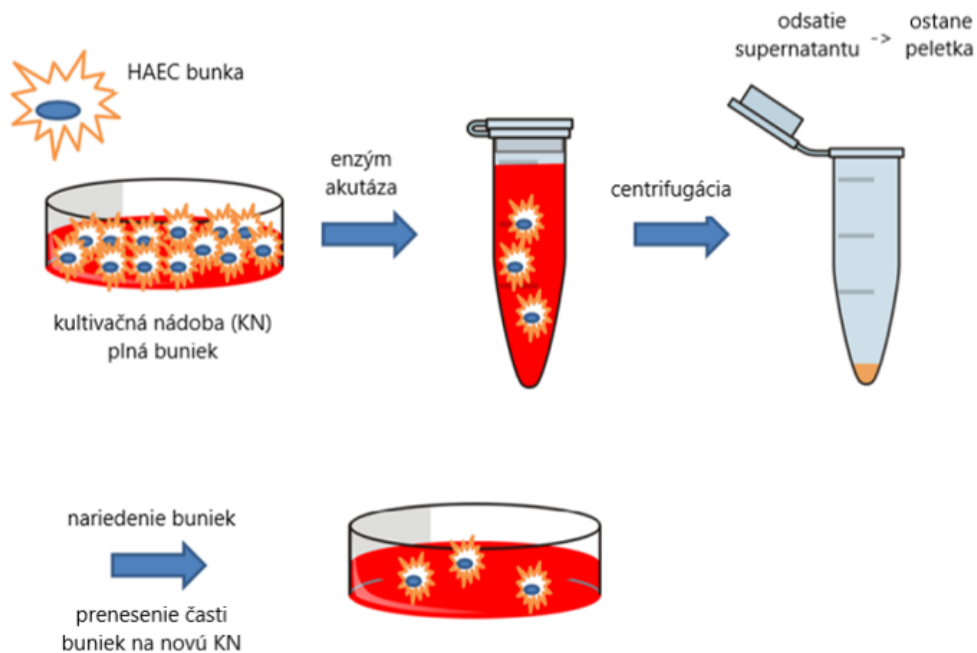


Obrázok 22: Ľudské aortálne endotelové bunky po pôsobení akútázy

Na obrázku sa nachádzajú ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC; human aortic endothelial cells), ktoré sa vplyvom enzýmu akútázy oddelili z dna kultivačnej nádoby, čo pozorujeme ako zmenu tvaru buniek (vlastné výsledky).

Ak boli bunky dostatočne oddelené, napipetovali sme k nim 3 ml PBS s 2% FBS, čím došlo k zriedeniu akútázy a jej inaktivácii. Kultivačnú nádobu sme následne prepláchli pipetou a obsah preniesli do 15 ml centrifugačnej skúmavky. Do kultivačných nádob sme znovu pridali 3 ml PBS s 2% FBS a obsah preniesli do rovnakej skúmavky. Skúmavku sme vložili do centrifúgy na 3 minúty pri 300 rcf.

Po centrifugácii sa bunky usadili na dne skúmavky a vytvorili tzv. peletku. Supernatant (PBS s akútázou nad bunkami) sme odsali pomocou vákuovej odsávačky. K bunkám sme pridali 2,4 ml nového média, resuspendovali sme ich a napipetovali 0,1 ml do každej jamky pripravenej kultivačnej nádoby. Každá jamka kultivačnej nádoby tak obsahovala 0,4 ml čistého média a 0,1 ml buniek. Postup pasážovania znázorňuje Obr. 23.



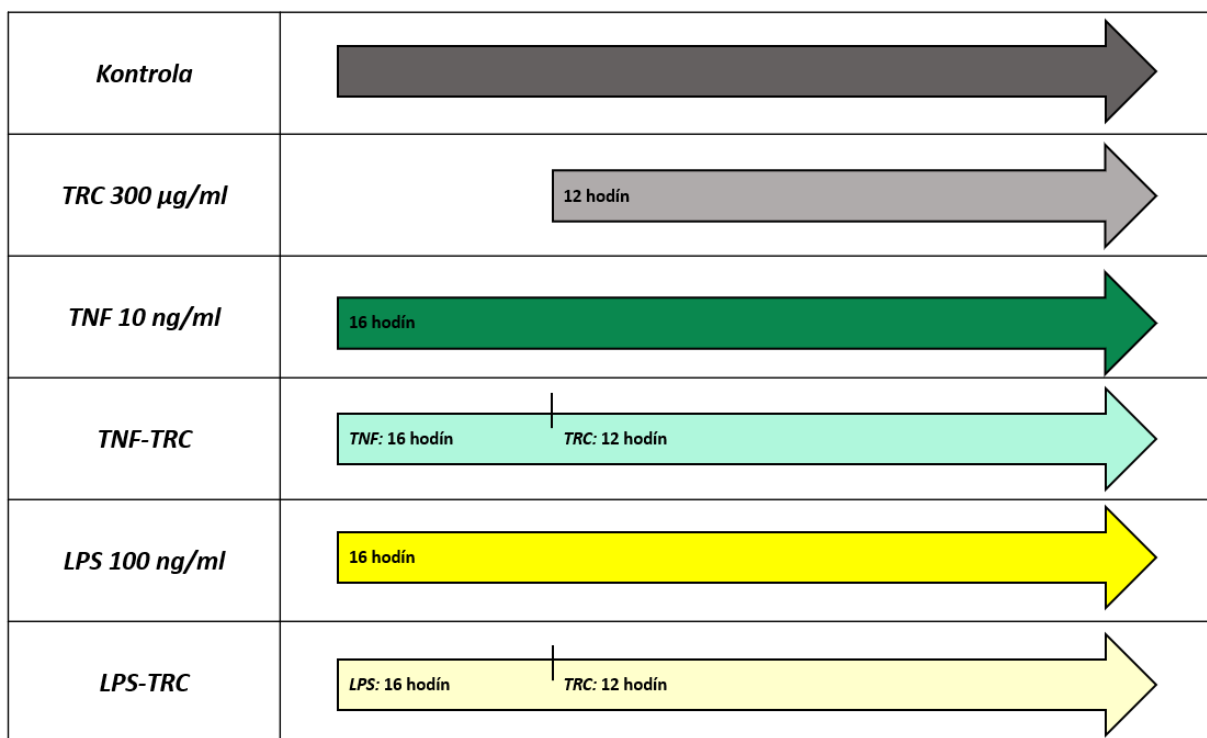
Obrázok 23: Schéma pasážovania buniek

Adherentné bunky narastené na kultivačnej nádobe v monovrstve sú rozvoľnené pomocou enzýmu akutáza. Po pridaní PBS s 2% FBS (k zastaveniu štiepiacej reakcie) je suspenzia buniek prenesená do skúmavky a scentrifugovaná. Následne sa odsaje supernatant a k peletke buniek sa pridá nové médium. Zo vzniknutej suspenzie je prenesená len určitá časť buniek do novej kultivačnej nádoby, poprípade do jednotlivých jamôk novej kultivačnej nádoby (178).

4.1.3 Experimentálny dizajn buniek na PCR/FC

1. **Kontrola** – obsahovala čisté EC
2. **TRC 300 µg/ml** – k EC sme pridali TRC105 o koncentrácii 300 µl/ml po dobu 12 hodín (koncentráciu sme zvolili na základe predošlých štúdií (26))
3. **TNF 10 ng/ml** – k EC sme pridali zápalový cytokín TNF-α o koncentrácii 10 ng/ml po dobu 16 hodín (koncentráciu sme zvolili na základe predošlých štúdií (179))
4. **TNF-TRC** – k EC sme pridali TNF-α o koncentrácii 10 ng/ml (po dobu 16 hodín) a TRC105 o koncentrácii 300 µg/ml (po dobu 12 hodín)
5. **LPS 100 ng/ml** – k EC sme pridali LPS o koncentrácii 100 ng/ml po dobu 16 hodín (koncentráciu sme zvolili na základe predošlých experimentov)
6. **LPS-TRC** – k EC sme pridali LPS o koncentrácii 100 ng/ml (po dobu 16 hodín) a TRC105 o koncentrácii 300 µg/ml (po dobu 12 hodín)

Tabuľka 1: Experimentálny dizajn buniek



Výpočet množstva TRC 105:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{500 \mu l * 300 \mu g/ml}{25\,000 \mu g/ml} = 6 \mu l$$

$$V_2 = \frac{1000 \mu l * 300 \mu g/ml}{25\,000 \mu g/ml} = 12 \mu l$$

Do 500 μ l média v 12-jamkovej kultivačnej nádobe sme pipetovali 6 μ l zásobného roztoku TRC105 (25 000 μ g/ml). Do 1000 μ l média v 6-jamkovej kultivačnej nádobe sme pipetovali 12 μ l zásobného roztoku TRC105 (25 000 μ g/ml).

Výpočet množstva TNF- α :

Keďže sme mali k dispozícii len roztok o koncentrácii 100 μ g/ml, museli sme si ho najprv nariediť na roztok o koncentrácii 1 μ g/ml (=1000 ng/ml).

Výpočet riedenia zásobného roztoku TNF- α o koncentrácii 100 μ g/ml (=100 000 ng/ml):

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{1000 \mu l * 1000 \text{ ng/ml}}{100\,000 \text{ ng/ml}} = 10 \mu l$$

Zo zásobného roztoku (100 000 ng/ml) sme si odobrali 10 μ l a doplnili 990 ml PBS.

Výpočet množstva pracovného roztoku TNF- α o koncentrácii 1000 ng/ml:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{500 \mu l * 10 \text{ ng/ml}}{1000 \text{ ng/ml}} = 5 \mu l$$

$$V_2 = \frac{1000 \mu l * 10 \text{ ng/ml}}{1000 \text{ ng/ml}} = 10 \mu l$$

Do 500 μl média v 12-jamkovej kultivačnej nádobe sme pipetovali 5 μl roztoku TNF- α o koncentrácii 1000 ng/ml. Do 1000 μl média v 6-jamkovej kultivačnej nádobe sme pipetovali 10 μl roztoku TNF- α o koncentrácii 1000 ng/ml.

Výpočet množstva LPS:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$V_2 = \frac{500 \mu\text{l} * 100 \text{ ng/ml}}{10\,000 \text{ ng/ml}} = 5 \mu\text{l}$$

$$V_2 = \frac{1000 \mu\text{l} * 100 \text{ ng/ml}}{10\,000 \text{ ng/ml}} = 10 \mu\text{l}$$

Do 500 μl média v 12-jamkovej kultivačnej nádobe sme pipetovali 5 μl zásobného roztoku LPS o koncentrácii 10 000 ng/ml. Do 1000 μl média v 6-jamkovej kultivačnej nádobe sme pipetovali 10 μl zásobného roztoku LPS o koncentrácii 10 000 ng/ml.

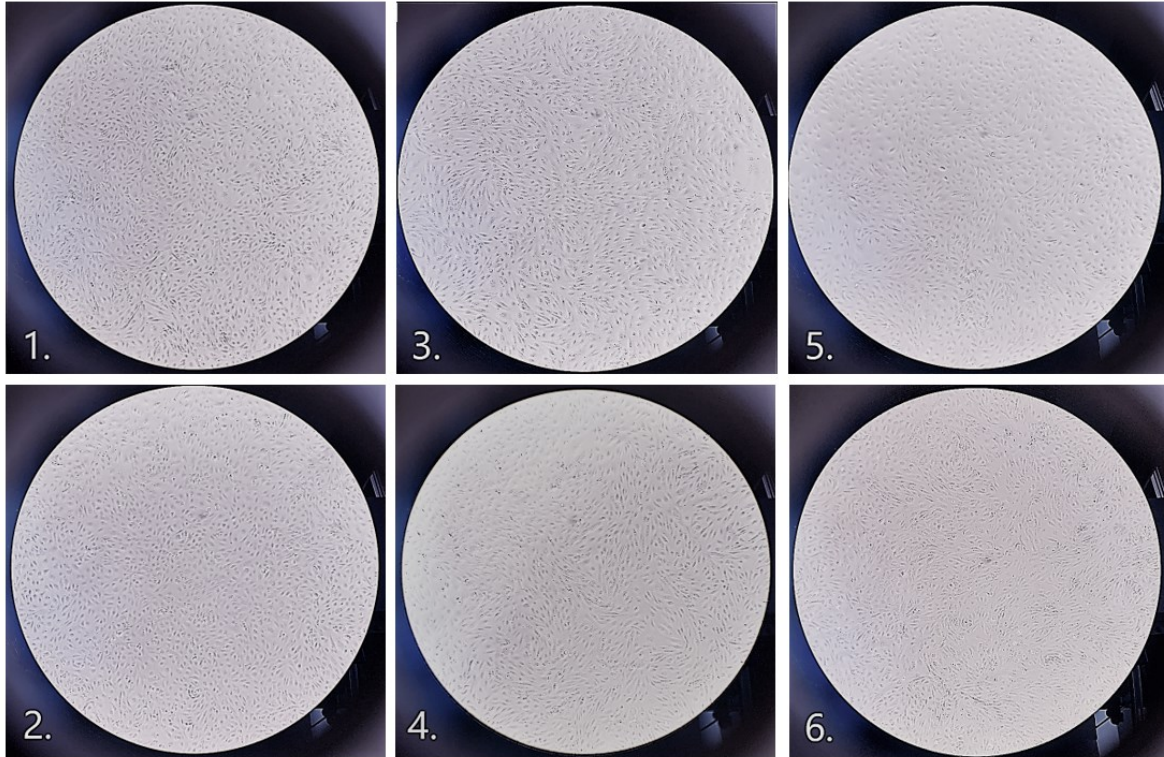
Pri premedikácii buniek sme postupovali nasledovne:

Zo všetkých jamôk sme si odsali staré médium a pridali 500 μl (1000 μl) nového média. Ku *kontrole* sme nepridávali žiadne medikamenty, skupina obsahovala čisté médium.

Pri skupine *TNF* a *TNF-TRC* sme z jamôk odobrali 5 μl (10 μl) média a pridali 5 μl (10 μl) roztoku TNF- α . Zároveň sme v rovnakom čase pri skupine *LPS* a *LPS-TRC* odobrali z jamôk tiež 5 μl (10 μl) média a pridali 5 μl (10 μl) roztoku LPS. Kultivačné nádoby sme po premedikácii vložili do inkubátora.

Po 4 hodinách sme z jamôk, ktoré mali obsahovať TRC105, odsali 6 μl (12 μl) média a pridali 6 μl (12 μl) roztoku TRC105. Jednotlivé časové rozostupy sme museli presne dodržiavať, aby sme zabezpečili stanovenú inkubačnú dobu pri jednotlivých medikamentoch (TNF- α a LPS sa s bunkami inkubovali po dobu 16 hodín a TRC105 po dobu 12 hodín).

Na Obr. 24 sú pod mikroskopom zobrazené HAEC bunky jednotlivých skupín po premedikácii.



Obrázok 24: Experimentálny dizajn ľudských aortálnych endotelových buniek

1. Kontrola 2. TRC 300 $\mu\text{g/ml}$ 3. TNF 10 ng/ml 4. TNF-TRC 5. LPS 100 ng/ml 6. LPS-TRC (vlastné výsledky)

4.2 PCR

Deň pred experimentom sme vložili chloroform, izopropylalkohol a 75% etanol do mrazničky. Keďže sme 75% etanol nemali k dispozícii, narieslili sme si ho z 96% etanolu.

Výpočet prípravy 75% etanolu:

$$V_1 * 75\% \text{ etanol} = V_2 * 96\% \text{ etanol}$$

$$V_2 = \frac{50 \text{ ml} * 75\%}{96\%} = 39 \text{ ml}$$

Pred zahájením prvého kroku sme si vložili roztok PBS do vodného kúpeľa na 20 minút. Medzičasom sme si odobrali vzorky pre experiment ELISA. Konkrétne sme preniesli 2x150 µl supernatantu do mikrocentrifugačnej skúmavky a uložili ich do mrazničky (-80 °C) až do vykonania ELISA experimentu.

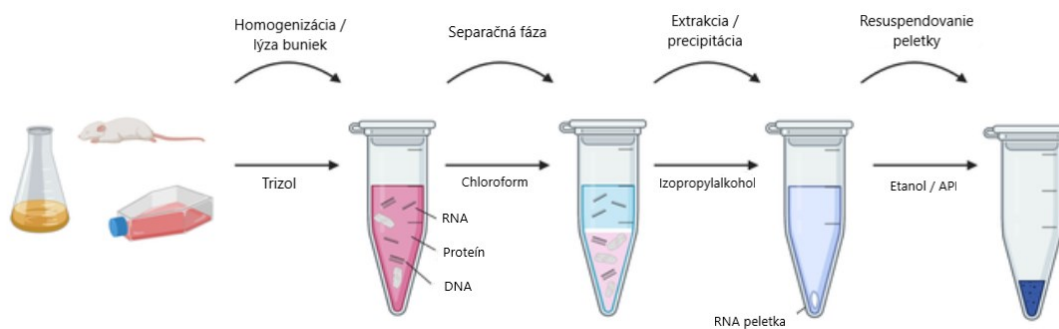
Všetky 6-jamkové kultivačné nádoby sme prepláchli 500 µl PBS a odsali odsávačkou. Premývací krok sme znovu zopakovali, aby sme odstránili čo najviac starého média. Použili sme osem 6-jamkových kultivačných nádob, pričom každá experimentálna skupina obsahovala 8 vzoriek. Spolu sme teda mali 48 vzoriek.

V ďalšom kroku sme do každej jamky pridali 1 ml TRI Reagent™ Solution (Invitrogen, kat. č.: AM9738, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), ktorý spôsobuje rozpad buniek a uvoľnenie DNA, RNA a proteínov. Kultivačné nádoby sme nechali položené na zamrzenej doske po dobu 5 minút a občas ich premiešali. Potom sme do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky (DNase/RNase-free) preniesli 1 ml tejto zmesi z každej našej jamky. Vzorky sme zhomogenizovali v ultrazvukovom kúpeli po dobu 10 minút.

Následne sme ku každej vzorke pridali 200 µl studeného chloroformu a pretrepali ich. Vzorky sme nechali stáť 5 minút pri izbovej teplote a následne sme ich vložili do centrifúgy vychladenej na 4°C a stočili pri 13 200 rpm po dobu 15 minút. Po centrifugácii sme pozorovali oddelenie vodnej a organickej vrstvy a na ich rozhraní bielu medzivrstvu.

Do nových mikrocentrifugačných skúmaviek sme napipetovali 5 µl GenElute™-LPA (Merck, kat. č.: 56575-1ML) a preniesli vodnú vrstvu, ktorá obsahovala RNA. Následne sme pridali 500 µl studeného izopropylalkoholu a vzorky sme premiešali. Nechali sme ich stáť 10 minút pri izbovej teplote a následne sme vzorky zcentrifugovali pri 4°C a 13 200 rpm po dobu 10 minút. Po centrifugácii sme izopropylalkohol opatrne odsali a k peletke sme pridali 1 ml 75 % etanolu na odstránenie solí.

Každú vzorku sme premiešavali pomocou vortexu približne 10 sekúnd. Etanol sme odsali a peletky nechali vyschnúť na vzduchu pokiaľ neboli priehľadné. Vyschnuté peletky sme rozpustili v 20 µl vody pre injekcie (API), zvortexovali a vložili na 20 minút do chladničky. Celý proces izolácie RNA je znázornený na Obr. 25.



Obrázok 25: Proces izolácie RNA

Najskôr sme k bunkám pridali trizol (TRI Reagent Solution), ktorý spôsobil rozpad (lýzu) buniek a uvoľnenie DNA, RNA a proteínov. V separačnej fáze sme k bunkám pridali chloroform a jeho vytrepávaním sa oddelili 3 vrstvy – vodná, ktorá obsahuje RNA, medzifáza a organická vrstva. Odobratím vodnej vrstvy a pridaním izopropylalkoholu došlo k precipitácii RNA za vzniku peletky. K peletke sme pridali 75% etanol, vzorky sme zvortexovali a etanol odsali. Peletku sme nechali vysušiť a potom ju resuspendovali v API (180).

Nasledovalo meranie koncentrácie RNA vo vzorkách pomocou spektrofotometra (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Nemecko). Na prístroji sme nastavili faktor zriedenia 1, jednotky: ng/μl a lid factor: 50. Vzorky sme merali v objeme 1,5 μl.

Na začiatku sme si zmerali tzv. blank vzorku (API), aby sa eliminovala absorbcia pozadia, a tým sa zvýšila presnosť merania. Po každom meraní sme dôkladne utreli optickú plochu buničinou. Výsledky sme zapisovali do Tabuľky 2.

Po meraní koncentrácie nasledoval prepis RNA do cDNA. Vzorky sme nariedili v 0,2 ml mikroskúmaviiek na koncentráciu 100 ng/μl v objeme 10 μl podľa Tabuľky 2. Následne sme si podľa Tabuľky 3 pripravili master mix na reverznú transkripciu (MM RT).

Do 0,2 ml mikroskúmaviiek sme pridali 10 μl pripraveného MM RT. Vzorky sme zcentrifugovali a vložili do termocykléra (Biometra TOne 96G, Analytik Jena, Nemecko).

Tabuľka 2: Riedenie RNA

Vzorka	ng/ul	Riedenie	
		Objem mRNA	Objem vody
K1	361	2,77	7,23
K2	360	2,78	7,22
K3	407	2,46	7,54
K4	415,5	2,41	7,59
K5	447,5	2,23	7,77
K6	417,5	2,40	7,60
K7	427	2,34	7,66
K8	411	2,43	7,57
TRC1	411	2,43	7,57
TRC2	368	2,72	7,28
TRC3	313	3,19	6,81
TRC4	402	2,49	7,51
TRC5	257	3,89	6,11
TRC6	328	3,05	6,95
TRC7	346	2,89	7,11
TRC8	354	2,82	7,18
TNF1	207	4,83	5,17
TNF2	145,5	6,87	3,13
TNF3	387,5	2,58	7,42
TNF4	362	2,76	7,24
TNF5	374,5	2,67	7,33
TNF6	373	2,68	7,32
TNF7	414,5	2,41	7,59
TNF8	379	2,64	7,36
T-T1	480,5	2,08	7,92
T-T2	458	2,18	7,82
T-T3	486,5	2,06	7,94
T-T4	501	2,00	8,00
T-T5	458	2,18	7,82
T-T6	422	2,37	7,63
T-T7	374	2,67	7,33
T-T8	441	2,27	7,73
LPS1	507	1,97	8,03
LPS2	469	2,13	7,87
LPS3	487	2,05	7,95
LPS4	522	1,92	8,08
LPS5	501	2,00	8,00
LPS6	492	2,03	7,97
LPS7	477	2,10	7,90
LPS8	476	2,10	7,90
L-T1	468	2,14	7,86
L-T2	475	2,11	7,89
L-T3	439	2,28	7,72
L-T4	456	2,19	7,81
L-T5	428	2,34	7,66
L-T6	436	2,29	7,71
L-T7	397	2,52	7,48
L-T8	491	2,04	7,96

Kontrola je znázornená tmavosivou farbou, skupina TRC svetlosivou, skupina TNF tmavozelenou, skupina TNF-TRC svetlozelenou, skupina LPS žltou a skupina LPS-TRC svetložltou farbou.

Tabuľka 3: Master mix na reverznú transkripciu

MM RT	50	SAMPLES	množ. [μ l]	nadb. [μ l]	Celkový objem [μ l]
1	nuclease free water		4,2	4,536	244,944
2	RT buffer		2	2,16	116,64
3	RT random primers		2	2,16	116,64
4	dNTP mix		0,8	0,864	46,656
5	reverse transcriptase		1	1,08	58,32

Nuclease free water – voda bez nukleáz, RT buffer – pufoer pre reverznú transkripciu, RT random primers – náhodné primery pre reverznú transkripciu, dNTP mix – mix deoxynukleotidtrifosfátov, reverse transcriptase – reverzná transkriptáza.

Po skončení prepisu sme získali 1000 ng cDNA v objeme 20 μ l (koncentrácia = 50 ng/ μ l). Vzorky sme si nariadili na koncentráciu 5 ng/ μ l pridaním 180 μ l API.

Takto pripravené vzorky sme pipetovali do 96-jamkovej dosky. Do každej jamky sme pipetovali zmes zloženú z 5 μ l master mixu na PCR (TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Kalifornia, USA) a 0,5 μ l primeru (viz Tabuľka 4). Vzorky sme pipetovali v objeme 4,5 μ l do jamiek v duplikátoch, podľa Tabuľky 5. 96-jamkovú dosku sme prelepili fóliou a umiestnili do centrifúgy na 2 minúty pri 1000 rpm.

Tabuľka 4: Master mix na PCR

	Objem na jednu vzorku	Celkový objem [μ l]
MM	5	500
Primer	0,5	50

MM- master mix

Tabuľka 5: 96-jamková doska

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	TRC1	TRC2	TRC3	TRC4
B	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	TRC1	TRC2	TRC3	TRC4
C	TRC5	TRC6	TRC7	TRC8	TNF1	TNF2	TNF3	TNF4	TNF5	TNF6	TNF7	TNF8
D	TRC5	TRC6	TRC7	TRC8	TNF1	TNF2	TNF3	TNF4	TNF5	TNF6	TNF7	TNF8
E	T-T1	T-T2	T-T3	T-T4	T-T5	T-T6	T-T7	T-T8	LPS1	LPS2	LPS3	LPS4
F	T-T1	T-T2	T-T3	T-T4	T-T5	T-T6	T-T7	T-T8	LPS1	LPS2	LPS3	LPS4
G	LPS5	LPS6	LPS7	LPS8	L-T1	L-T2	L-T3	L-T4	L-T5	L-T6	L-T7	L-T8
H	LPS5	LPS6	LPS7	LPS8	L-T1	L-T2	L-T3	L-T4	L-T5	L-T6	L-T7	L-T8

Kontrola je znázornená tmavosivou farbou, skupina TRC svetlosivou, skupina TNF tmavozelenou, skupina TNF-TRC svetlozelenou, skupina LPS žltou a skupina LPS-TRC svetložltou farbou.

Po centrifugácii sme 96-jamkovú dosku vložili do termocykléra (QuantStudio™ Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Kalifornia, USA). Namerané výsledky sme exportovali do Excel tabuľky, pričom jedným z výsledkov bola aj hodnota CT. Z tejto hodnoty sme následne vypočítali relatívnu génovú expresiu vzoriek.

Najskôr sme si museli vypočítať hodnotu *delta CT*, ktorá nám popisuje rozdiel medzi CT cieľového génu a CT referenčného génu:

$$\Delta CT = CT(\text{cieľový gén}) - CT(\text{referenčný gén})$$

Druhá hodnota, *delta delta CT*, je daná rozdielom medzi *delta CT* cieľového génu a priemerom *delta CT* kontrolnej skupiny:

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{cieľový gén}) - \text{priemer } \Delta CT(\text{kontrolná skupina})$$

Potom sme si vypočítali *negatívnu druhú mocninu delta delta CT*:

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

Negatívnu druhú mocninu delta delta CT sme vynásobili 100%, aby sme získali % kontroly:

$$(2^{-\Delta\Delta CT}) * 100\%$$

Tieto hodnoty nám vyjadrujú expresiu cieľového génu vzťahnutú na expresiu referenčného génu (181).

4.3 Prietoková cytometria

Z kultivačných nádob sme odsali staré médium, pridali 500 μ l PBS a pomaly sme preplachovali povrch nádoby. Potom sme PBS odsali a tento postup znova zopakovali. V ďalšom kroku sme k bunkám pridali 150 μ l enzýmu akutázy. Miernym pohybom sme akutázu rozprestrelí po celom povrchu jamiek v kultivačnej nádobe a následne sme ich vložili na 5 minút do inkubátora.

Po 5 minútach sme k akutáze pridali 100 μ l PBS s 2% FBS, čím sme enzým inaktivovali. Zmes buniek s akutázou a PSB s 2% FBS sme resuspendovali pipetou a preniesli do 96-jamkovej dosky s dnom v tvare „V“. Dosku sme scentrifugovali pri 300 ref po dobu 3 minút a vzniknutý supernatant sme rýchlym švihom vyliali do umývadla.

Peletky, ktoré nám vznikli na dne jamiek sme resuspendovali poklepaním dosky o tvrdý povrch a do každej jamky sme napipetovali 200 μ l PBS s 2% FBS a znova nechali scentrifugovať (300 ref, 3 minúty). Tento proces sme opakovali 2-krát.

Po druhom resuspendovaní peletky sme do každej jamky napipetovali 100 μ l odpovedajúcej primárnej protilátky s naviazaným fluorofórom. Jednotlivé protilátky sme si nariesli podľa Tabuľky 6. Tento proces prebiehal za tmy, aby nedochádzalo k excitovaniu vzoriek. Dosku sme inkubovali v tme pri 4 °C po dobu 30 minút. Po uplynutí potrebného času sme dosku znova scentrifugovali (300 ref, 3 minúty), supernatant vyliali rýchlym švihom do umývadla a peletku znova resuspendovali poklepaním dosky o tvrdý povrch. Vyliatím supernatantu sme odstránili protilátky, ktoré sa nenaviazali na bunky.

Tabuľka 6: Riedenie protilátok

Názov	Fluorofor	Kat. č.	Výrobca	Riedenie/100 uL
Eng	PerCP/Cy5.5	323216	Biolegend	1 uL
VCAM-1	APC	305810	Biolegend	1 uL
ICAM-1	Pacific Blue	322716	Biolegend	1 uL
PI	-	P4864-10ml	Sigma-Aldrich	0,5 uL

Eng – endoglin; VCAM-1 – vaskulárna bunková adhézna molekula-1; ICAM-1 – medzibunková adhézna molekula-1; PI – propidium jodid

Do každej jamky sme pridali 200 μ l PSB s 2% FBS, dosku sme scentrifugovali (300 rcf, 3 minúty), vyliali supernatant a proces znova zopakovali. Na záver sme k resuspendovanej peletke pridali 150 μ l PBS a vzorky šli zmerať pomocou cytometra.

Vzorky sme merali na prietokovom cytometri CytoFlex LX (Beckman Coulter, Kalifornia, USA). Výsledky, ktoré sme získali z prístroja sme vyhodnotili pomocou programu CytExpert Acquisition and Analysis Software (verzia 2.4, Beckman Coulter, Kalifornia, USA) a exportovali ich do programu Excel. Z nameraných hodnôt sme vypočítali % kontroly.

Výsledky sme ďalej spracovávali v štatistickom programe GraphPad Prism 9 (verzia 9.1.0; GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

4.4 ELISA

V tomto experimente sme použili Human Endoglin/CD105 DuoSet ELISA (R&D Systems, kat.č.: DY1097 a DY008B).

Vzorky pre tento experiment sme si odobrali pri PCR metóde. Konkrétne sme si odobrali 2x150 μ l supernatantu do mikrocentrifugačných skúmaviek a uložili ich do mrazničky (-80 °C) až do vykonania ELISA experimentu. Odoberali sme si len vzorky z kontrolnej skupiny, zo skupiny TNF a zo skupiny LPS, pretože TRC105 interferuje s jednou z protilátok používaných u metódy ELISA. Deň pred experimentom sme si vybrali vzorky z mrazničky (-80 °C) a preniesli ich do chladničky (4 °C).

Roztok záchytnej primárnej protilátky sme si pripravili nasledovne: k dispozícii sme mali roztok protilátky s koncentráciou 9 μ g/ml a potrebovali sme 12 ml roztoku s koncentráciou 0,05 μ g/ml.

Výpočet množstva záchytnej primárnej protilátky:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

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

Do 15 ml skúmavky sme napipetovali 12 ml PBS, odobrali sme 66,7 μ l PBS a pridali 66,7 μ l roztoku primárnej protilátky. Tento postup sme zvolili pre čo najpresnejšie napipetované objemy roztokov.

96-jamkovú mikroplatničku sme potiahli roztokom záchytnej primárnej protilátky v PBS. Do každej jamky sme napipetovali 100 μ l roztoku. Mikroplatničku sme prelepili a nechali cez noc inkubovať pri izbovej teplote za stáleho miešania (RT, 500 rpm).

V deň experimentu sme si pripravili premývací roztok (WB). 20 ml koncentrovaného WB sme pridali k 480 ml deionizovanej vody, aby sme dostali výsledný objem 500 ml.

Potom sme si pripravili roztok reagenčného činidla (RD). 8 ml koncentrovaného RD (25% Tween 20 roztok v PBS) sme pridali do 32 ml roztoku PBS, aby sme dostali výsledný objem 40 ml.

Keď sme mali všetky potrebné roztoky pripravené, rýchlym švihom do umývadla sme vyliali roztok z mikroplatničky a premyli všetky jamky 250 μ l WB pomocou multikanálovej pipety. Tento proces sme opakovali trikrát.

Po premytí sme do jamiek pridali 250 μ l RD, platničku sme prelepili a nechali inkubovať pri izbovej teplote za stáleho miešania (RT 500 rpm) 1 hodinu. Následne sme jamky znova trikrát premyli WB rovnakým spôsobom, ako je uvedené vyššie. Takto sme si pripravili mikroplatničku, do ktorej sme v ďalšom kroku pridávali naše vzorky a kalibračnú radu.

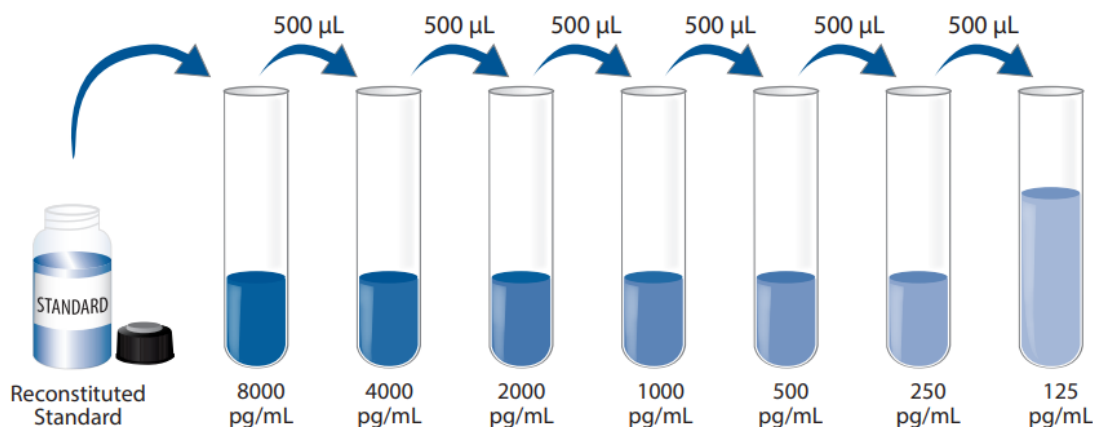
Na vytvorenie kalibračnej rady sme mali k dispozícii 1000 μ l zásobného roztoku štandardu o koncentrácii 380 ng/ml a potrebovali sme roztok štandardu o koncentrácii 8 ng/ml. Zo zásobného roztoku sme si odobrali 21 μ l.

Výpočet množstva štandardu:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$x = \frac{1000 \mu l * 8 \text{ ng/ml}}{380 \text{ ng/ml}} = 21 \mu l$$

Nariadením štandardu do mikroskúmaviek sme vytvorili kalibračnú radu. Do prvej kalibračnej mikroskúmavky sme pridali 1000 μ l RD a do všetkých ostatných (2. – 8. mikroskúmavka) 500 μ l RD. Z prvej mikroskúmavky sme odobrali 21 μ l RD, pridali 21 μ l štandardu o koncentrácii 380 ng/ml a zvortexovali. V ďalšom kroku sme do každej nasledujúcej mikroskúmavky napipetovali 500 μ l z predchádzajúcej mikroskúmavky (Obr. 26). Posledná mikroskúmavka bola použitá ako slepá vzorka a obsahovala už len čistý RD.



Obrázok 26: Riedenie štandardu

Obrázok znázorňuje riedenie roztoku zrekonštituovaného štandardu (*reconstituted standard*) na vytvorenie kalibračnej rady. V prvom kroku sa k 979 µl RD (*reagent diluent; reagenčné činidlo*) pridá 21 µl štandardu, čo predstavuje prvý bod kalibračnej rady. Následne sa v každom bode odoberie 500 µl z predchádzajúcej mikroskúmavky a pridá sa k 500 µl RD, až kým nevznikne roztok o koncentrácii 125 pg/ml. Mikroskúmavka so samotným RD slúži ako slepá vzorka (182).

Z každej experimentálnej skupiny (kontrola, TNF a LPS) sme mali 8 vzoriek, ktoré sme pipetovali v duplikátoch. Do prvých dvoch stĺpcov na mikroplatničke sme pipetovali 50 µl RD a 50 µl nariedených štandardov v duplikátoch. Do ďalších jamiek sme pipetovali 50 µl RD a 50 µl vzorky. Mikroplatničku sme zalepili a nechali inkubovať 2 hodiny pri izbovej teplote za stáleho miešania (RT 500 rpm). Po uplynutí 2 hodín sme mikroplatničku trikrát premyli WB.

Roztok detekčnej protilátky sme si pripravili nasledovne: K dispozícii sme mali zásobný roztok protilátky s koncentráciou 9 µg/ml a potrebovali sme 12 ml roztoku s koncentráciou 0,05 µg/ml.

Výpočet množstva detekčnej sekundárnej protilátky:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

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

Do 15 ml skúmavky sme napipetovali 12 ml RD, odobrali sme 66,7 μ l RD a pridali 66,7 μ l roztoku detekčnej protilátky. Následne sme v ďalšom kroku pridali do jamiek 100 μ l detekčnej protilátky. Mikroplatničku sme prelepili a nechali inkubovať 2 hodiny pri izbovej teplote za stáleho miešania (RT, 500 rpm). Po uplynutí 2 hodín sme mikroplatničku znova trikrát premyli WB.

Roztok Streptavidin-HRP sme nariadili v PBS v pomere 1:200. Do sklenenej banky sme napipetovali 12 ml RD, odobrali sme 60 μ l RD a pridali 60 μ l roztoku Streptavidin-HRP.

Výpočet roztoku Streptavidin-HRP:

$$x = \frac{12\,000\ \mu\text{l}}{200} = 60\ \mu\text{l}$$

Do všetkých jamiek sme potom pridali 100 μ l roztoku Streptavidin-HRP, mikroplatničku sme zalepili a nechali inkubovať v tme 20 minút pri izbovej teplote za stáleho miešania. Po uplynutí času sme mikroplatničku znova trikrát premyli WB.

Po premytí sme do jamiek napipetovali 100 μ l roztoku substrátu. K dispozícii sme mali roztok peroxidu vodíka a roztok tetrametylbenzidínu. Oba roztoky sme spolu zmiešali v pomere 1:1, aby výsledný objem roztoku substrátu bol 12 ml. Po pridaní substrátu sme mikroplatničku znova zalepili a nechali inkubovať 20 min v tme pri izbovej teplote za stáleho miešania (RT, 500 rpm). Po pridaní substrátu prebehla farebná reakcia, ktorej výsledkom bola modrá farba.

Po 20 minútach sme do jamiek napipetovali 50 μ l roztoku kyseliny sírovej, ktorý nám slúžil na zastavenie reakcie. Po pridaní roztoku kyseliny sírovej došlo k farebnej zmene z modrej na žltú. Mikroplatničku sme jemne poklepali o dlaň a vzorky šli okamžite merať.

Merali sme optickú hustotu každej jamky pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 450 nm a 540 nm. Namerané hodnoty pri 540 nm sme odčítali od nameraných hodnôt pri 450

nm. Rozdiel jednotlivých hodnôt nám opravil optické nedokonalosti mikroplatničky (Tabuľka 7). Následne sme všetky hodnoty odčítali od priemernej hodnoty slepého vzorku (0,0660), aby sme odstránili vplyv vehikula, viz Tabuľka 8.

Tabuľka 7: Rozdiel nameranej optickej hustoty pri 540 nm a 450 nm

A	0,068	0,064	-0,001	0,577	0,594	0,001	1,005	0,85	0,001	0,614	0,595	0
B	0,186	0,181	0	0,552	0,536	-0,003	0,704	0,672	-0,001	0,673	0,634	-0,001
C	0,313	0,316	0	0,69	0,707	-0,003	0,748	0,727	-0,007	0,851	0,937	-0,007
D	0,565	0,555	-0,002	0,575	0,564	-0,001	0,544	0,582	-0,007	0,728	0,759	-0,006
E	1,03	1,004	-0,005	0,549	0,541	-0,006	0,964	0,687	-0,006	0,599	0,568	-0,009
F	1,848	1,943	-0,004	0,693	0,852	-0,004	0,593	0,693	-0,006	0,63	0,595	-0,009
G	2,997	2,962	-0,009	0,509	0,548	-0,004	0,635	0,599	-0,009	0,568	0,605	-0,012
H	3,787	3,787	-0,01	0,542	0,53	-0,01	0,663	0,616	-0,008	0,64	0,584	-0,012

Kalibračná rada je znázornená svetlomodrou farbou, kontrola tmavosivou, skupina TNF tmavozelenou a skupina LPS žltou farbou.

Tabuľka 8: Odčítanie optickej hustoty od slepého vzorku

A	0,0020	-0,002	-0,067	0,511	0,528	-0,065	0,939	0,784	-0,065	0,548	0,529	-0,066
B	0,12	0,115	-0,066	0,486	0,47	-0,069	0,638	0,606	-0,067	0,607	0,568	-0,067
C	0,247	0,25	-0,066	0,624	0,641	-0,069	0,682	0,661	-0,073	0,785	0,871	-0,073
D	0,499	0,489	-0,068	0,509	0,498	-0,067	0,478	0,516	-0,073	0,662	0,693	-0,072
E	0,964	0,938	-0,071	0,483	0,475	-0,072	0,898	0,621	-0,072	0,533	0,502	-0,075
F	1,782	1,877	-0,07	0,627	0,786	-0,07	0,527	0,627	-0,072	0,564	0,529	-0,075
G	2,931	2,896	-0,075	0,443	0,482	-0,07	0,569	0,533	-0,075	0,502	0,539	-0,078
H	3,721	3,721	-0,076	0,476	0,464	-0,076	0,597	0,55	-0,074	0,574	0,518	-0,078

Kalibračná rada je znázornená svetlomodrou farbou, kontrola tmavosivou, skupina TNF tmavozelenou a skupina LPS žltou farbou.

Tabuľka 9: Finálne hodnoty optickej hustoty

A	0,0000	0,5195	0,8615	0,5385
B	0,1175	0,478	0,622	0,5875
C	0,2485	0,6325	0,6715	0,828
D	0,4940	0,5035	0,497	0,6775
E	0,9510	0,479	0,7595	0,5175
F	1,8295	0,7065	0,577	0,5465
G	2,9135	0,4625	0,551	0,5205
H	3,7210	0,47	0,5735	0,546

Kalibračná rada je znázornená svetlomodrou farbou, kontrola tmavosivou, skupina TNF tmavozelenou a skupina LPS žltou farbou.

Tabuľka 10: Výsledná koncentrácia z online softvéru Assayfit Pro

A	0	554.715486661	894.053262169	573.801035764
B	86.4881906946	512.73476744	656.985697728	622.726895934
C	265.272735744	667.39013789	705.973303716	860.748862457
D	528.973135411	538.582004046	532.010028576	711.902969802
E	983.660272612	513.751805226	792.911256524	552.702034244
F	1984.67646323	740.551203045	612.273124128	581.815814486
G	4047.72307522	496.931482113	586.319039523	555.721880735
H	7940.43534325	504.587617511	608.785233341	581.315234573

Kalibračná rada je znázornená svetlomodrou farbou, kontrola tmavosivou, skupina TNF tmavozelenou a skupina LPS žltou farbou.

Výsledky z Tabuľky 9 sme vložili do online softvéru Assayfit Pro na vytvorenie 4-PL kalibračnej krivky. V Tabuľke 10 sú znázornené výsledné koncentrácie, ktoré sme získali z online softvéru.

Výsledky sme ďalej spracovávali v štatistickom programe GraphPad Prism 9 (verzia 9.1.0; GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

4.5 Adhézia

Pri adhézii sme okrem EC používali aj THP-1 bunkovú líniu. THP-1 je monocytárna ľudská bunková línia získaná z krvi pacienta trpiaceho akútnou leukémiou, ktorá sa morfológickými a funkčnými vlastnosťami podobá primárnym monocytom a makrofágom, vrátane markerov diferenciácie (bunky boli poskytnuté pre KBLV od S. Čejkovej (IKEM, Praha, Česká republika).

V úvode experimentu sme si nahriali médium bez FBS vo vodnom kúpeli. Na jednu jamku sme potrebovali 1×10^5 monocytov z bunkovej línie THP-1. V našom experimente sme pracovali so 48 vzorkami (6 skupín), no odobrali sme si THP-1 bunky v nadbytku (pre 50 vzoriek), ktoré nám slúžili ako pozitívna kontrola neskôr pri meraní.

Na 50 jamôk sme potrebovali 5×10^6 monocytov, ktoré sme si spočítali v počítačke buniek. K dispozícii sme mali 5×10^5 monocytov/ml, čo značí, že sme potrebovali 10 ml média THP-1 monocytov.

Výpočet množstva THP-1 buniek:

$$x = \frac{100\,000 \text{ buniek} * 50 \text{ jamiek}}{1 \text{ jamka}} = 5\,000\,000 \text{ buniek}$$

$$x = \frac{5\,000\,000 \text{ buniek} * 1 \text{ ml}}{500\,000 \text{ buniek}} = 10 \text{ ml}$$

THP-1 monocyty sme si označili pomocou Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution (Invitrogen, kat.č.: V22886) v množstve 4 μ l na 1×10^6 THP-1. Keďže sme potrebovali 5×10^6 monocytov, použili sme 20 μ l Vybrant™ DiO. Monocyty sme nechali inkubovať v inkubátore po dobu 15 minút.

Výpočet množstva Vybrant™ DiO:

$$x = \frac{4 \mu\text{l} * 5000\ 000 \text{ buniek}}{1000\ 000 \text{ buniek}} = 20 \mu\text{l}$$

Po inkubácii sme THP-1 bunky premyli médiom bez FBS, scentrifugovali ich (300 rcf, 3 minúty) a supernatant sme odsali odsávačkou. Tento krok sme opakovali dvakrát.

THP-1 bunky sme pipetou resuspendovali v 5 ml média bez FBS. Aby sme v každej jamke kultivačnej nádoby mali 1×10^5 monocytov, z roztoku sme pipetovali 100 μl . Do jednej jamky, ktorá nám slúžila ako kontrola EC, sme monocyty nepridávali. THP-1 bunky a EC sme potom nechali v inkubátore 1 hodinu.

Vo vodnom kúpeli sme si nahriali PBS s 1% BSA (hovädzí sérový albumín) a enzým akutázu (približne 20 minút pred vybratím buniek z inkubátora). Po hodine sme z jamôk odsali staré médium odsávačkou. Aby sme odstránili čo najviac nepriľnutých THP-1 buniek a zvyšky média, prepláchli sme jamky 300 μl PBS a roztok sme odsali. Tento krok sme opakovali dvakrát. V ďalšom kroku sme k bunkám pridali 150 μl akutázy a vložili ich do inkubátory na 5 minút.

Keď sa všetky bunky odlepili z dna jamiiek, pridali sme k nim 300 μl PBS s 1% BSA, resuspendovali ich pipetou a preniesli do 1,5 ml špeciálnej nízkoadhéznej mikroskúmvavky.

Prenesené bunky v mikroskúmvavke sme scentrifugovali (300 rcf, 3 minúty) a vzniknutý supernatant sme odsali odsávačkou. Na záver sme k bunkám pridali 200 μl studeného PBS a vzorky šli merať na prietokovom cytometri CytoFlex LX (Beckman Coulter, Kalifornia, USA).

Na základe pozitívnej kontroly značených THP-1 buniek a negatívnej kontroly EC sme si vytvorili v programe CytExpert Acquisition and Analysis Software gate, kde sme potom merali počet THP-1 buniek. Vzorky sme merali dvakrát, aby sme si mohli vypočítať priemernú nameranú hodnotu.

Výsledky, ktoré sme získali z prístroja sme vyhodnotili pomocou programu CytExpert Acquisition and Analysis Software (verzia 2.4, Beckman Coulter, Kalifornia, USA). Získané výsledky sme exportovali do programu Excel a z nameraných hodnôt sme získali počet adherovaných monocytov.

4.6 Transmigrácia

Bunky sme pri pasáži resuspendovali v novom médiu a preniesli ich do troch 24-jamkových kultivačných nádob, z ktorých každá obsahovala 12 inzertov. Keďže sme pracovali so 6 experimentálnymi skupinami a každá skupina sa skladala zo 6 vzoriek, spolu sme mali 36 vzoriek v inzertoch a 3 jamky bez inzertov nám slúžili pre kontrolu rastu buniek.

Do spodnej časti jamôk, ktoré obsahovali inzerty sme napipetovali 400 μ l čistého média. Do hornej časti inzertov a do ďalších 3 jamôk (kontrola rastu buniek bez inzertov) sme pipetovali 400 μ l média s bunkami. Pár dní sme bunky nechali inkubovať, aby konfluencia rastu bola 100%.

Deň pred experimentom sme bunky premedikovali podľa experimentálneho dizajnu jednotlivých skupín.

Výpočet množstva TNF- α :

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$x = \frac{10\,000\ \mu\text{l} * 10\ \text{ng/ml}}{1000\ \text{ng/ml}} = 100\ \mu\text{l}$$

Z pracovného roztoku TNF- α (1000 ng/ml), ktorý sme už mali pripravený a vypočítaný (viz strana 52), sme odobrali 100 μ l a pridali ich k 9 900 μ l média. Následne sme pipetovali 400 μ l pripraveného roztoku do horného aj spodného kompartmentu 12 jamôk s inzertami (6 jamôk pre skupinu TNF 10 ng/ml a 6 jamôk pre skupinu TNF-TRC).

Výpočet množstva LPS:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$x = \frac{10\,000 \mu\text{l} * 100 \text{ ng/ml}}{10\,000 \text{ ng/ml}} = 100 \mu\text{l}$$

Zo zásobného roztoku LPS (10 000 ng/ml) sme odobrali 100 μl a pridali ich k 9 900 μl média. Následne sme pipetovali 400 μl pripraveného roztoku do horného aj spodného kompartmentu 12 jamôk s inzertami (6 jamôk so skupinou *LPS 100 ng/ml* a 6 jamôk so skupinou *LPS-TRC*).

Po 4 hodinách sme do 6 jamiek pridali roztok TRC105 (300 $\mu\text{g/ml}$), ktorý sme si pripravili nasledovne:

Výpočet množstva TRC105:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$x = \frac{5000 \mu\text{l} * 300 \mu\text{g/ml}}{25\,000 \mu\text{g/ml}} = 60 \mu\text{l}$$

Zo zásobného roztoku TRC105 (25 000 $\mu\text{g/ml}$) sme odobrali 60 μl a pridali ich k 4 940 μl média. Následne sme pipetovali 400 μl pripraveného roztoku do horného aj spodného kompartmentu 6 jamiek.

Do jamiek TNF-TRC a LPS-TRC sme pridávali roztoky, ktoré sme si pripravili nasledovne:

Výpočet množstva TNF- α :

$$x = \frac{5000 \mu\text{l} * 10 \text{ ng/ml}}{1000 \text{ ng/ml}} = 50 \mu\text{l}$$

Z pripraveného roztoku TNF- α (1000 ng/ml) sme odobrali 50 μl a pridali ich do 4 890 μl média. Následne sme do média pridali aj 60 μl roztoku TRC105 (25 000 $\mu\text{g/ml}$). Z takto pripraveného roztoku sme pipetovali 400 μl do horného aj spodného kompartmentu jamiek TNF-TRC.

Výpočet množstva LPS:

$$x = \frac{5000 \mu\text{l} * 100 \text{ ng/ml}}{10\,000 \text{ ng/ml}} = 50 \mu\text{l}$$

Z pripraveného roztoku LPS (10 000 ng/ml) sme odobrali 50 μl a pridali ich do 4 890 μl média. Následne sme do média pridali aj 60 μl roztoku TRC105 (25 000 $\mu\text{g/ml}$). Z takto pripraveného roztoku sme pipetovali 400 μl do horného aj spodného kompartmentu jamiek LPS-TRC.

Na ďalší deň ráno sme si vypočítali potrebné množstvo THP-1 buniek. Do každej jamky sme potrebovali napipetovať 1×10^5 THP-1 buniek. V experimente sme mali 36 jamôk, takže sme potrebovali $3,6 \times 10^6$ THP-1 buniek, no aby sme ráтали s menšou rezervou, odobrali sme si 4×10^6 . Podľa počítacky buniek sme mali k dispozícii 1 540 000 THP-1 buniek/ml, z čoho vyplýva, že sme potrebovali 2,6 ml.

Výpočet množstva odobratých THP-1 buniek:

$$x = \frac{4\,000\,000 \text{ buniek} * 1 \text{ ml}}{1\,540\,000 \text{ buniek}} = 2,6 \text{ ml}$$

Výpočet množstva média, v ktorom sme resuspendovali THP-1 bunky:

$$x = \frac{4\,000\,000 \text{ buniek} * 100 \mu\text{l}}{100\,000 \text{ buniek}} = 4\,000 \mu\text{l}$$

4×10^6 THP-1 buniek sme resuspendovali v 4 ml média.

Do každého horného kompartmentu sme napipetovali 100 μl resuspendovaných THP-1 buniek a nechali ich v inkubátore 3 hodiny.

V ďalšom kroku sme odstránili všetky inzerty a 250 μl média v spodnom kompartmente sme preniesli na 96-jamkovú dosku s dnom v tvare písmena „V“. Dosku sme scentrifugovali (300 rcf, 3 min) a postup opakovali dovtedy, až kým sme nepreniesli všetok objem z dolného kompartmentu jamôk na dosku.

V závere sme k scentrifugovaným bunkám pridali roztok PBS. Vzorky sme merali na prietokovom cytometri CytoFlex LX (Beckman Coulter, Kalifornia, USA). Výsledky, ktoré sme získali z prístroja sme vyhodnotili pomocou programu CytExpert Acquisition and Analysis Software (verzia 2.4, Beckman Coulter, Kalifornia, USA). Získané výsledky sme exportovali do programu Excel a z nameraných hodnôt sme zistili, koľko THP-1 buniek transmigrovalo cez membránu inzertov.

5. VÝSLEDKY

Výsledky v tejto práci uvádzame ako medián s medzikvartilovým rozpätím. Hladinu štatistickej významnosti (p) sme stanovili pomocou Mann-Whitney testu (neparametrický t -test) medzi nasledujúcimi skupinami: *kontrola* vs *TRC*, *kontrola* vs *TNF*, *TNF* vs *TNF-TRC*, *kontrola* vs *LPS*, *LPS* vs *LPS-TRC*. Za štatisticky významný rozdiel sa považuje hodnota $p \leq 0,05$. V prípade, že hodnota štatisticky významná nebola, je označená symbolom „ns“, pričom platí, že $p > 0,05$.

Symbolom „*“ označujeme štatisticky významné hodnoty voči *kontrole*, pričom platí, že: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Symbolom „#“ označujeme štatisticky významné hodnoty voči *TNF*, pričom platí, že: # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$.

Symbolom „§“ označujeme štatisticky významné hodnoty voči *LPS*, pričom platí, že: § $p \leq 0,05$; §§ $p \leq 0,01$; §§§ $p \leq 0,001$.

Na vyhodnotenie výsledkov sme použili štatistický program GraphPad Prism 9 (verzia 9.5.1; GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA).

5.1 mRNA expresia endogénu a jeho transkripčných faktorov

Samostatne použitý TRC105 (300 µg/ml) nepreukázal žiaden signifikantný vplyv na mRNA expresiu Eng ani jeho transkripčných faktorov KLF6, RelA a NR1H3 ($p > 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou.

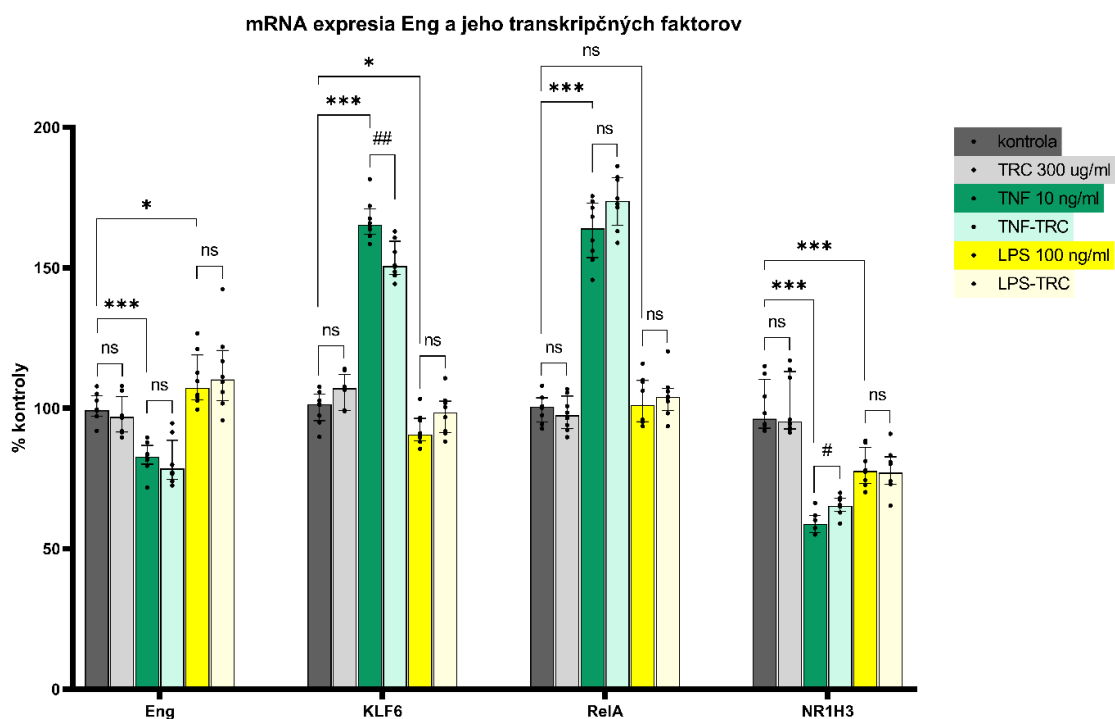
Stimulácia HAEC prostredníctvom TNF- α (10 ng/ml) viedla k signifikantne zníženej mRNA expresii Eng ($p \leq 0,001$) v porovnaní s kontrolou. Zatiaľ čo mRNA expresia KLF6 a RelA bola signifikantne zvýšená ($p \leq 0,001$), mRNA expresia NR1H3 bola znížená ($p \leq 0,001$). To naznačuje, že pokles mRNA expresie Eng môže byť čiastočne spôsobený zníženou transkripciou, v ktorej transkripčný faktor NR1H3 pravdepodobne zohráva dôležitú úlohu.

Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α nevedlo k signifikantnej zmene mRNA expresie Eng v porovnaní so skupinou TNF- α . V prípade mRNA expresie jeho transkripčných faktorov došlo k signifikantnému zníženiu expresie KLF6 ($p \leq 0,01$) a k signifikantnému zvýšeniu expresie NR1H3 ($p \leq 0,05$). mRNA expresia transkripčného faktora RelA nebola signifikantne zmenená ($p > 0,05$). Z toho vyplýva, že pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α síce viedlo k zmenám v mRNA expresii niektorých Eng transkripčných faktorov (zníženie expresie KLF6 a zvýšenie expresie NR1H3), no keďže tieto zmeny sú protichodné, tak v konečnom dôsledku TRC105 signifikantne neovplyvnil mRNA expresiu Eng indukovanú pomocou TNF- α . Na základe toho môžeme skonštatovať, že pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α nemá signifikantný vplyv na transkripciu Eng.

Stimulácia buniek pomocou LPS (100 ng/ml) viedla k zvýšenej mRNA expresii Eng ($p \leq 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zatiaľ čo mRNA expresia Eng transkripčných faktorov KLF6 a NR1H3 bola signifikantne znížená ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$), v prípade mRNA expresie RelA nebola zaznamenaná signifikantná zmena ($p > 0,05$). Z výsledkov teda vyplýva, že za zvýšenie mRNA expresie Eng v bunkách po stimulácii LPS nie je zodpovedný ani jeden zo sledovaných transkripčných faktorov, a teda že za reguláciu Eng transkripcie je v týchto podmienkach zodpovedný iný mechanizmus.

V prípade pridania TRC105 k bunkám stimulovaným LPS sa nepreukázala žiadna štatisticky významná zmena v mRNA expresii Eng ani jeho transkripčných faktorov KLF6, RelA a NR1H3 ($p > 0,05$) v porovnaní s LPS skupinou. Z toho vyplýva, že ani v tomto prípade pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným LPS významne neovplyvňuje transkripciu Eng ani jeho transkripčných faktorov (Graf 1).

Graf 1: mRNA expresia endoglínu a jeho transkripčných faktorov



Graf znázorňuje mieru mRNA expresie Eng a jeho transkripčných faktorov (KLF6, RelA, NR1H3) v kontrolnej skupine a v skupinách TRC 300 $\mu\text{g/ml}$, TNF 10 ng/ml , TNF-TRC, LPS 100 ng/ml a LPS-TRC. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly, pričom platí že ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ vs kontrola; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ vs TNF- α .

5.2 mRNA expresia zápalových molekúl

Samostatne použitý TRC105 nemal signifikantný vplyv na mRNA expresiu zápalových molekúl ICAM-1 a VCAM-1 ($p > 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. V prípade mRNA expresie zápalovej molekuly SELE sa preukázalo signifikantné zníženie ($p \leq 0,05$). Z toho vyplýva, že stimulácia HAEC prostredníctvom samotného TRC105 môže potencionálne znižovať expresiu adhézných molekúl, ktoré sa uplatňujú v počiatočnej fáze aterosklerózy pri zachytávaní a rolovaní leukocytov (E-selektín), avšak nemá signifikantný efekt na expresiu molekúl zúčastňujúcich sa neskoršej fázy aterosklerózy, ako je pevná adhézia (ICAM-1, VCAM-1).

Stimulácia HAEC prostredníctvom TNF- α 10 ng/ml viedla podľa očakávania k signifikantnému zvýšeniu mRNA expresie všetkých troch zápalových molekúl ICAM-1, VCAM-1 a SELE ($p \leq 0,001$) v porovnaní s kontrolou. Z toho vyplýva, že tento model funguje a pomocou TNF- α sme v bunkách úspešne indukovali zápal.

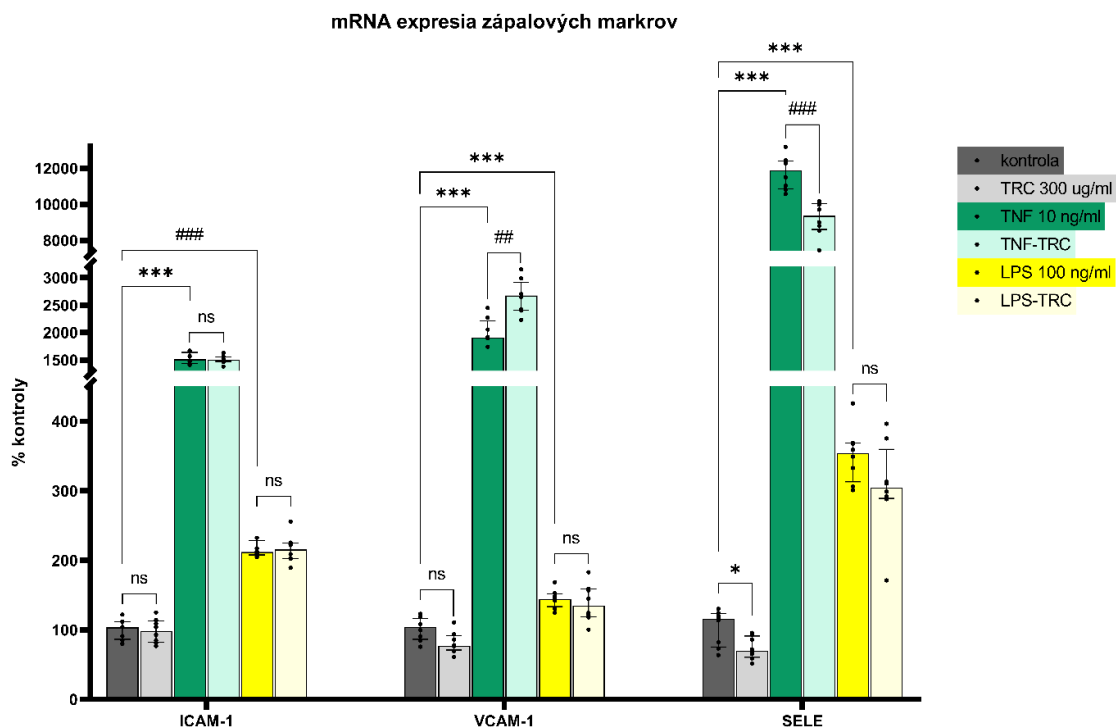
Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α viedlo k signifikantným zmenám mRNA expresie zápalových molekúl VCAM-1 a SELE v porovnaní so skupinou TNF- α . V prípade mRNA expresie molekuly VCAM-1 došlo k signifikantnému zvýšeniu ($p \leq 0,01$), no v prípade molekuly SELE došlo k signifikantnému zníženiu mRNA expresie ($p \leq 0,001$). U mRNA expresie ICAM-1 nedošlo k signifikantnej zmene. Na základe týchto výsledkov môžeme skonštatovať, že TRC105 aj u TNF- α stimulovaných buniek môže znižovať expresiu molekúl, ktoré sa uplatňujú v počiatočnej fáze aterosklerózy, no nemá signifikantný efekt alebo zvyšuje expresiu molekúl zúčastňujúcich sa neskoršej fázy aterosklerózy.

Stimulácia buniek pomocou LPS 100 ng/ml taktiež viedla k signifikantne zvýšenej mRNA expresii všetkých troch zápalových molekúl ICAM-1, VCAM-1 a SELE ($p \leq 0,001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Na základe toho môžeme tvrdiť, že sme pomocou LPS v bunkách úspešne indukovali zápalový stav.

V prípade pridania TRC105 k bunkám stimulovaným LPS sa nepreukázala žiadna štatisticky významná zmena v mRNA expresii ICAM-1, VCAM-1 ani SELE ($p > 0,05$) v porovnaní s LPS skupinou. Z toho vyplýva, že pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným

LPS nemá signifikantný vplyv na mRNA expresiu ani jednej z adhézných zápalových molekúl v akejkoľvek fáze aterosklerózy (Graf 2).

Graf 2: mRNA expresia zápalových molekúl



Graf znázorňuje mieru mRNA expresiu zápalových molekúl ICAM-1, VCAM-1 a SELE v kontrolnej skupine a v skupinách TRC 300 $\mu\text{g/ml}$, TNF 10 ng/ml , TNF-TRC, LPS 100 ng/ml a LPS-TRC. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly, pričom platí že ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ vs kontrola; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ vs TNF- α .

5.3 Proteínová expresia endoglínu a zápalových molekúl

Samostatne použitý TRC105 preukázal signifikantné zníženie proteínovej expresie Eng ($p \leq 0,01$) v porovnaní s kontrolnou skupinou, no v prípade proteínovej expresie zápalových molekúl ICAM-1 a VCAM-1 nedošlo k signifikantnej zmene ($p > 0,05$). Z toho vyplýva, že prítomnosť samotného TRC105 podľa očakávania signifikantne znižuje proteínovú expresiu Eng, no neovplyvňuje proteínovú expresiu zápalových adhézných molekúl zúčastňujúcich sa neskoršej fázy aterosklerózy.

Stimulácia HAEC prostredníctvom TNF- α 10 ng/ml viedla k signifikantnému poklesu proteínovej expresie Eng ($p \leq 0,01$) v porovnaní s kontrolou, a v prípade oboch zápalových molekúl, ICAM-1 a VCAM-1, došlo k signifikantnému zvýšeniu proteínovej expresie ($p \leq 0,01$). TNF- α v bunkách signifikantne zvyšuje expresiu adhézných molekúl, čo značí, že zápal bol úspešne indukovaný a že za týchto podmienok je proteínová expresia Eng znížená.

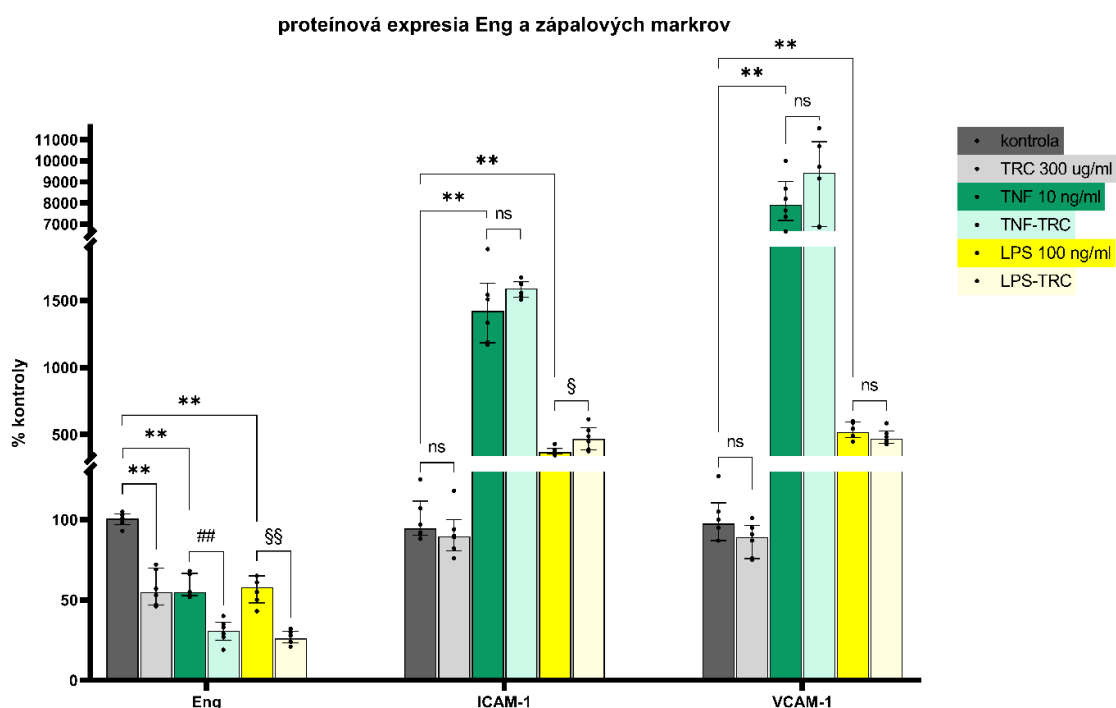
Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α viedlo k signifikantnému zníženiu proteínovej expresie Eng ($p \leq 0,01$) v porovnaní so skupinou TNF- α , avšak proteínová expresia zápalových molekúl ICAM-1 a VCAM-1 nebola signifikantne zmenená ($p > 0,05$). Tieto výsledky naznačujú, že prítomnosť TRC105 v bunkách stimulovaných TNF- α znižuje proteínovú expresiu Eng a zároveň nemá signifikantný vplyv na proteínovú expresiu zápalových molekúl zohrávajúcich úlohu v pevnej adhézii leukocytov pri ateroskleróze.

Stimulácia buniek pomocou LPS 100 ng/ml viedla k signifikantne zníženej proteínovej expresii Eng ($p \leq 0,01$) a k zvýšenej proteínovej expresii molekúl ICAM-1 a VCAM-1 ($p \leq 0,01$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Z toho vyplýva, že stimulácia buniek pomocou LPS signifikantne zvyšuje expresiu adhézných molekúl, čo značí, že zápal bol úspešne indukovaný a že u zápalu je proteínová expresia Eng znížená, podobne ako tomu bolo pri stimulácii buniek TNF- α .

Po pridaní TRC105 k bunkám stimulovaným LPS došlo k signifikantnému zníženiu proteínovej expresie Eng ($p \leq 0,01$) v porovnaní s LPS skupinou. Čo sa týka proteínovej expresie zápalových molekúl, v prípade molekuly ICAM-1 došlo k signifikantnému zvýšeniu

proteínovej expresie ($p \leq 0,05$), no v prípade molekuly VCAM-1 sa proteínová expresia nezmenila ($p > 0,05$). Môžeme teda konštatovať, že pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným LPS signifikantne znižuje proteínovú expresiu Eng a zároveň nemá signifikantný efekt, alebo dokonca zvyšuje expresiu adhézných molekúl zúčastňujúcich sa neskoršej fázy aterosklerózy (Graf 3).

Graf 3: Proteínová expresia endoglinu a zápalových molekúl



Graf znázorňuje mieru proteínovej expresie Eng a zápalových molekúl ICAM-1 a VCAM-1 v kontrolnej skupine a v skupinách TRC 300 $\mu\text{g/ml}$, TNF 10 ng/ml , TNF-TRC, LPS 100 ng/ml a LPS-TRC. Výsledky sú vyjadrené v % kontroly, pričom platí že ns $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$ vs kontrola; ## $p \leq 0,01$ vs TNF- α ; \$ $p \leq 0,05$; \$\$ $p \leq 0,01$ vs LPS.

5.4 *Vznik solubilného endoglinu*

Samostatne použitý TRC105 nepreukázal signifikantný vplyv na mRNA expresiu MMP-14 ($p > 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou, z čoho vyplýva že TRC105 samostatne nijako neovplyvňuje transkripciu MMP-14.

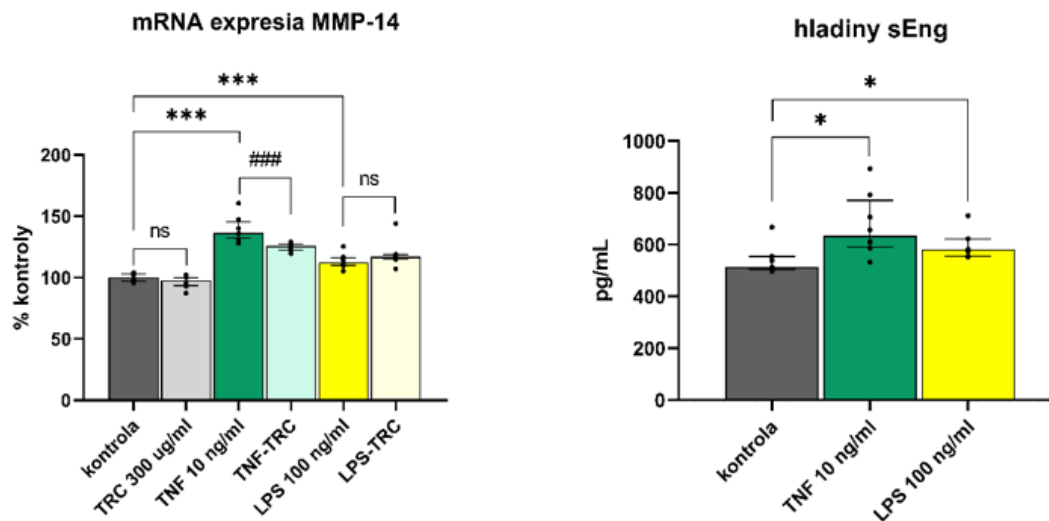
Stimulácia buniek prostredníctvom TNF- α 10 ng/ml viedla k signifikantnému zvýšeniu mRNA expresie MMP-14 ($p \leq 0,001$) a zároveň sa signifikantne zvýšila aj hladina sEng ($p \leq 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Na základe toho môžeme tvrdiť, že prítomnosť TNF- α v bunkách zvyšuje transkripciu MMP-14, čo môže viesť k zvýšeným hladinám sEng.

Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α viedlo k signifikantnému poklesu mRNA expresie MMP-14 ($p \leq 0,001$) v porovnaní so skupinou TNF- α , z čoho vyplýva, že prítomnosť TRC105 v bunkách stimulovaných TNF- α výrazne znižuje transkripciu MMP-14.

Stimulácia buniek pomocou LPS 100 ng/ml viedla k signifikantnému zvýšeniu mRNA expresie MMP-14 ($p \leq 0,001$), a taktiež k zvýšeným hladinám sEng ($p \leq 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Z toho vyplýva, že prítomnosť LPS v bunkách významne zvyšuje transkripciu MMP-14, čo môže mať za následok zvýšené hladiny sEng v médiu.

Po pridaní TRC105 k bunkám stimulovaným LPS nedošlo k signifikantnej zmene v mRNA expresii MMP-14 ($p > 0,05$) v porovnaní s LPS skupinou. Na základe toho môžeme tvrdiť, že prítomnosť TRC105 v bunkách stimulovaných LPS signifikantne neovplyvňuje transkripciu MMP-14 na rozdiel od toho ako tomu bolo u TNF- α (Graf 4).

Graf 4: Vznik solubilného endoglinu



Graf vľavo znázorňuje mieru mRNA expresie MMP-14 (v kontrolnej skupine a skupinách TRC 300 µg/ml, TNF 10 ng/ml, TNF-TRC, LPS 100 ng/ml a LPS-TRC) a graf vpravo znázorňuje hladiny sEng (v kontrolnej skupine a skupinách TNF 10 ng/ml a LPS 100 ng/ml). mRNA expresia MMP-14 je vyjadrená v % kontroly a hladiny sEng sú vyjadrené v pg/ml, pričom platí že ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ vs kontrola; ### $p \leq 0,001$ vs TNF- α .

5.5 Funkčná analýza

Samostatne použitý TRC105 signifikantne znížil adhéziu monocytov ($p \leq 0,05$) k endotelovým bunkám, ale nemal signifikantný vplyv na transmigráciu monocytov ($p > 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Z toho vyplýva, že znižovanie hladín Eng pomocou TRC105 vedie k zníženej adhézii monocytov, ale nijako neovplyvňuje transmigráciu monocytov.

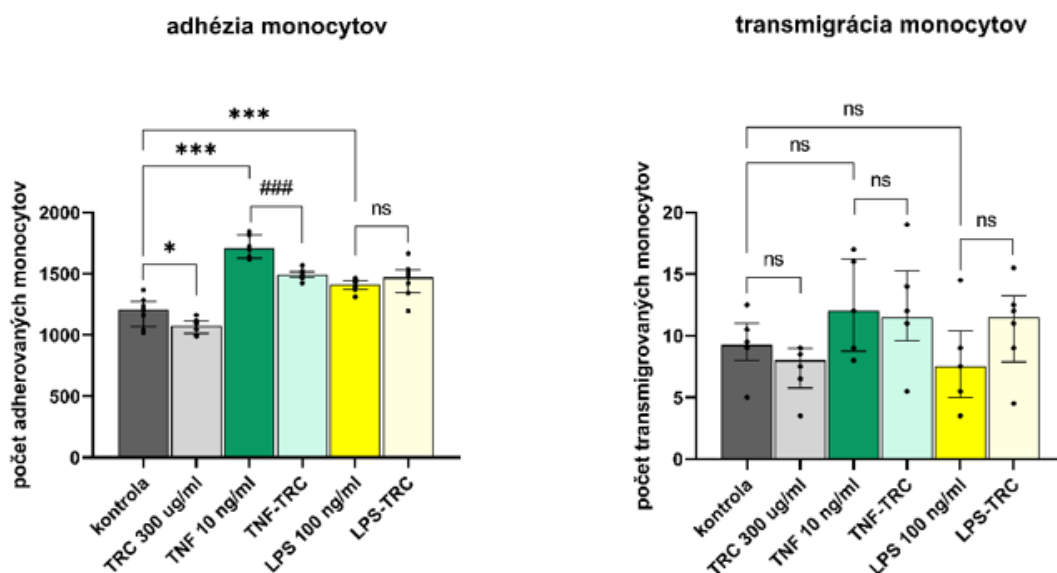
Stimulácia buniek prostredníctvom TNF- α 10 ng/ml viedla k signifikantnému zvýšeniu adhézie monocytov ($p \leq 0,001$), ale neovplyvnila transmigráciu monocytov v porovnaní s kontrolou. Na základe toho môžeme konštatovať, že napriek zníženej proteínovej expresii Eng po stimulácii TNF- α , adhézia monocytov je zvýšená, a teda prevažuje efekt zvýšených adhézných molekúl. Naopak, transmigrácia monocytov cez monovrstvu endotelových buniek bola nezmenená aj napriek zvýšeným adhéznym molekulám, čo značí že prevláda efekt Eng (ktorého expresia je znížená) a teda, že Eng je potencionálne dôležitý pre transendoteliálnu migráciu monocytov.

Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α viedlo k signifikantnému zníženiu adhézie monocytov ($p \leq 0,001$), no počet transmigrovaných monocytov sa významne nezmenil v porovnaní so skupinou TNF- α . Z toho vyplýva, že dodatočné zníženie Eng pomocou pridania TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α vedie k zníženiu adhézie monocytov, a teda že Eng zohrávala čiastočne úlohu aj u adhézie. Na druhej strane Eng nemá významný vplyv na transmigráciu monocytov, pravdepodobne kvôli tomu, že transmigrácia nebola signifikantne zmenená ani v skupine s TNF- α .

Stimulácia buniek pomocou LPS 100 ng/ml viedla k signifikantnému zvýšeniu adhézie ($p \leq 0,001$) a nemala významný efekt na transmigráciu monocytov, u ktorej nedošlo k žiadnym zmenám v porovnaní s kontrolnou skupinou. To značí, že podobne ako aj TNF- α , tak aj LPS v bunkách významne zvyšuje adhéziu monocytov (prevažuje efekt adhézných molekúl), no transmigrácia monocytov ostáva aj napriek zvýšeným adhéznym molekulám nezmenená (prevažuje efekt Eng), z čoho vyplýva, že Eng môže byť dôležitý pre transmigráciu monocytov pri zápale.

Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným LPS nevedie k signifikantnej zmene v adhézii ani v transmigrácii monocytov ($p > 0,05$) v porovnaní s LPS skupinou. Môžeme teda skonštatovať, že dodatočné zníženie Eng pomocou pridania TRC105 k bunkám stimulovaným LPS nemá efekt na adhéziu monocytov k endotelovým bunkám a nemá významný vplyv ani na transmigráciu, pravdepodobne z dôvodu, že transmigrácia nebola signifikantne zmenená ani v skupine s LPS (Graf 5).

Graf 5: Funkčná analýza



Graf znázorňuje adhéziu a transmigráciu monocytov v kontrolnej skupine a skupinách TRC 300 $\mu\text{g/ml}$, TNF 10 ng/ml , TNF-TRC, LPS 100 ng/ml a LPS-TRC. V prípade adhézie sú výsledky vyjadrené ako počet adherovaných monocytov. V prípade transmigrácie monocytov sú výsledky vyjadrené ako počet transmigrovaných monocytov, pričom platí, že ns $p > 0,05$; $*p \leq 0,05$; $***p \leq 0,001$ vs kontrola; $###p \leq 0,001$ vs TNF- α .

6. DISKUSIA

Eng je transmembránový glykoproteín, ktorý je významne exprimovaný v arteriálnych EC (6). Niekoľko *in vivo* a *in vitro štúdií* poukázalo na rozdielne úlohy Eng v ED. Na jednej strane sa Eng podieľa na prevencii rozvoja ED zvýšenou produkciou eNOS, čo vedie k zvýšenej syntéze NO (113, 114). Na druhej strane, zvýšená expresia Eng vedie k zvýšenej adhézii a transendotelovej migrácii leukocytov (115).

Štúdie zaoberajúce sa sEng ukázali, že zvýšené hladiny sEng boli zaznamenané pri niekoľkých patologických stavoch súvisiacich s ED, ako je preeklampsia u tehotných žien, DM, hypercholesterolémia, AH a zápal (115, 117). Avšak, sEng je vďaka prítomnosti RGD oblasti schopný interagovať s integrínmi leukocytov, čo vedie k zníženiu adhézie a transmigrácie leukocytov cez endotel (5). Vyššie uvedené údaje poukazujú na komplexnú úlohu Eng u patológií súvisiacich s ATS, a teda potrebu ďalších štúdií v tejto oblasti.

TRC105 (carotuximab) je monoklonálna protilátka proti Eng, ktorá bola pôvodne vyvinutá pre onkologickú terapiu (21, 22). Avšak bolo publikované, že TRC105 je schopný priamo modulovať Eng a jeho signalizáciu počas rozvoja ED vyvolanej vysokými hladinami glukózy a cholesterolu (26). V tejto diplomovej práci sme použili TRC105 ako model farmakologickej látky, ktorá je schopná znižovať expresiu Eng a inhibovať jeho signalizáciu, vďaka čomu sme mohli popísať vplyv Eng na zápalom indukovanú ED.

V prvej časti tejto diplomovej práce sme sa zamerali na expresiu Eng, jeho transkripčných faktorov a adhézných molekúl počas zápalom indukovanej ED. Zápal bol vyvolaný dvoma stimulmi - TNF- α a LPS (114, 183). Ukázali sme, že premedikácia buniek oboma stimulmi vedie k zníženej proteínovej expresii Eng napriek tomu, že mRNA expresia Eng a jeho transkripčných faktorov je odlišná.

Pozorovali sme, že stimulácia buniek TNF- α vedie k významnému zníženiu mRNA expresie Eng, čo bolo pravdepodobne spôsobené zníženou mRNA expresiou transkripčného faktora NR1H3. Podobné účinky TNF- α na Eng v EC preukázali už iné štúdie (5, 114), avšak mechanizmus, ktorý je za ne zodpovedný, nebol úplne objasnený. Podľa očakávania sme potvrdili, že mRNA a proteínová expresia bunkových adhézných molekúl (ICAM-1, VCAM-

1 a E-selektínu) sa vplyvom TNF- α významne zvýšila, čo je v súlade s inými štúdiami (5, 114, 179). Okrem toho sme preukázali, že liečba TNF- α vedie k zvýšenej mRNA expresii MMP-14, čo by zase mohlo byť jedným z mechanizmov zodpovedných za zvýšené hladiny sEng, čo potvrdili aj štúdie *in vivo* (184). Funkčná analýza odhalila, že stimulácia TNF- α viedla k zvýšenej adhézii monocytov k EC, čo naznačuje, že zvýšená expresia adhézných molekúl prevažuje nad zníženou expresiou Eng. Avšak, napriek vysoko zvýšenej expresii adhézných molekúl sa transendotelová migrácia monocytov významne nezmenila, čo by mohlo potenciálne znamenať, že Eng môže byť pre tento proces nevyhnutný.

Na druhej strane sme po prvýkrát ukázali, že stimulácia buniek pomocou LPS vedie k zvýšenej mRNA expresii Eng. Za tento účinok nie je zodpovedný žiadny zo skúmaných transkripčných faktorov. Keďže LPS je známy prozápalový stimul, nebolo prekvapením, že premedikácia buniek LPS viedla k zvýšenej mRNA a proteínovej expresii adhézných bunkových molekúl (183). Okrem toho, prítomnosť LPS významne indukovala mRNA expresiu MMP-14 (185), čo viedlo k zvýšeniu hladín sEng. Podobne ako pri TNF- α , stimulácia LPS taktiež viedla k zvýšenej adhézii monocytov k EC (prevažuje zvýšená expresia adhézných molekúl nad zníženou expresiou Eng). Transendotelová migrácia monocytov sa významne nezmenila, čo opäť naznačuje, že Eng môže byť nevyhnutný pre proces transmigrácie za prozápalových podmienok, čo potvrdzuje aj *in vivo* štúdia Rossi a kol., ktorá ukázala, že znížená expresia Eng je spojená so zníženou infiltráciou leukocytov počas zápalu (5).

V druhej časti tejto diplomovej práce sme skúmali úlohu Eng v zápalom indukovanej ED pomocou TRC105, monoklonálnej protilátky proti Eng, ktorý je schopný znížiť proteínovú expresiu Eng. TRC105 sám o sebe nemal významný vplyv na mRNA expresiu Eng, ani na jeho transkripčné faktory, čo je v súlade s predošlou publikovanou štúdiou (26). mRNA expresia adhézných molekúl sa však po TRC105 buď nezmenila (ICAM-1, VCAM-1), alebo sa znížila (E-selektín), čo je v rozpore so spomínanou štúdiou (rozdielely sú pravdepodobne spôsobené použitím rôznych metód). Ukázali sme, že TRC105 nemá významný vplyv na mRNA expresiu MMP-14, no bolo publikované, že TRC105 je schopný indukovať hladinu proteínu MMP-14 a vyvolať enzymatické štiepenie membránového Eng na jeho rozpustnú formu (133). V tejto práci sme nemohli merať hladiny sEng v skupinách s

TRC105, pretože sa ukázalo, že TRC105 interferuje s metódou ELISA, ako to opísala Liu a kol (25). Napokon, TRC105 dokázal znížiť adhéziu monocytov, no transendotelová migrácia monocytov sa nezmenila, čo je opäť v súlade s vyššie uvedenou štúdiou (26).

Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α nemalo významný vplyv na mRNA expresiu Eng, ale významne znížilo proteínovú expresiu Eng, čo naznačuje, že znížené hladiny proteínu Eng sú spôsobené iným mechanizmom ako zníženou transkripciou. Podobný účinok sa pozoroval v štúdiu, kde TRC105 významne znížil proteínovú expresiu Eng, ale nie mRNA expresiu Eng, ktorá bola indukovaná hypercholesterolémiou alebo hyperglykémiou (26). TRC105 mal vplyv TNF- α indukovanú mRNA expresiu adhézných molekúl, ale na úrovni proteínov sa to nepotvrdilo, čo je v rozpore s predošlou publikovanou štúdiou (26). Okrem toho stimulácia s TRC105 viedla k významnému zníženiu TNF- α indukovanej mRNA expresie MMP-14, čo je v rozpore so štúdiou Kumara a kol. (133). Jedným z možných vysvetlení týchto rozdielov by mohlo byť použitie iných typov buniek v uvedenej štúdiu v porovnaní s touto prácou. Ďalším dôležitým bodom je, že v tejto diplomovej práci sme nemerali proteínovú expresiu proteínu MMP-14, ani jeho aktivitu. Taktiež nemôžeme vylúčiť, že na štiepení Eng sa mohli podieľať aj iné proteolytické enzýmy. Funkčná analýza ukázala, že znížená expresia proteínu Eng pomocou TRC105 dokázala znížiť aj TNF- α indukovanú adhéziu monocytov na EC, čo naznačuje, že Eng sa čiastočne podieľa aj na procese adhézie monocytov, podobne ako pri štúdiu s TRC105 počas hypercholesterolémie a hyperglykémie (26). Keďže sa nám nepodarilo navodiť transmigráciu monocytov pomocou TNF- α , nebolo prekvapením, že sme nepozorovali žiadne významné zmeny v transmigrácii monocytov ani po pridaní TRC105.

Podobne, pridanie TRC105 k bunkám ošetrovaným LPS nemalo významný vplyv na mRNA expresiu Eng, ale znížilo proteínovú expresiu Eng. TRC105 nemal významný účinok na LPS indukovanú mRNA expresiu adhézných molekúl, avšak dokázal významne zvýšiť proteínovú expresiu ICAM-1, čo podporujú výsledky vyššie spomínanej štúdie (26). Na rozdiel od TNF- α , nemal TRC105 významný účinok na mRNA expresiu MMP-14 indukovanú LPS. To je v rozpore s inou publikovanou štúdiou (133) (možné vysvetlenia sú popísané vyššie). Na rozdiel od TNF- α , funkčná analýza nepreukázala významný účinok

zníženia proteínovej expresie Eng pomocou TRC105 v bunkách stimulovaných LPS na adhéziu monocytov k EC, ani na transendotelovú migráciu monocytov.

V tejto diplomovej práci sme preukázali, že prítomnosť TNF- α a LPS v bunkách znižuje proteínovú expresiu membránového Eng a zvyšuje hladiny sEng. Okrem toho sme zistili, že TRC105 významne znižuje proteínovú expresiu Eng bez priamej účasti jeho transkripčných faktorov. V bunkách vystavených TNF- α a LPS sa preukázalo, že prítomnosť TRC105 výrazne znižuje expresiu Eng, a navyše v prípade buniek stimulovaných TNF- α znižuje adhéziu monocytov.

7. ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť vplyv TRC105 na expresiu Eng a jeho transkripčných faktorov (KLF6, RelA a NR1H3), expresiu zápalových molekúl (ICAM-1, VCAM-1, E-selektín), expresiu enzýmu MMP-14, hladinu solubilného endoglínu a na adhéziu a transmigráciu monocytov cez ľudské aortálne endotelové bunky (HAEC) vystavené pôsobeniu TNF- α (10 ng/ml) a LPS (100 ng/ml) po dobu 16 hodín.

Samotný TRC105 nemal signifikantný vplyv na mRNA expresiu Eng a jeho transkripčných faktorov, no v prípade proteínovej expresie Eng viedol k signifikantnému zníženiu hladín. TRC105 zásadne neovplyvnil proteínovú expresiu adhézných molekúl ani transmigráciu, avšak bol schopný znížiť adhéziu monocytov k EC. Stimulácia buniek prostredníctvom TNF- α a LPS spôsobila signifikantné zníženie proteínovej expresie Eng, zvýšenie hladín sEng a proteínovej expresie zápalových adhézných molekúl. Síce nemala významný vplyv na transendotelovú migráciu monocytov, no v prípade adhézie monocytov došlo k zvýšeniu adherovaných monocytov. Pridanie TRC105 k bunkám stimulovaným TNF- α a LPS viedlo k signifikantnému zníženiu proteínovej expresie Eng, avšak nemalo zásadný vplyv na expresiu adhézných molekúl. Len v prípade TNF- α indukovaného zápalu viedla prítomnosť TRC105 k zníženiu adhézie monocytov. TRC105 signifikantne neovplyvnil ani TNF- α , ani LPS stimulovanú transmigráciu.

Záverom teda je, že TRC105 môže predchádzať TNF- α indukovanej adhézií monocytov, čím poukazujeme na to, že sa Eng podieľa na rozvoji ED navodenej TNF- α . Týmto zistením môžeme Eng považovať za zaujímavý farmakologický cieľ u ochorení so zápalovou etiológiou.

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Skratka	Význam skratky	Slovenský význam skratky
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	cytotoxicita závislá od protilátok
AH	arterial hypertension	arteriálna hypertenzia
ALK	activin receptor-like kinase	kinázy podobné aktivínovému receptoru
ALK1	activin receptor-like kinase 1	kináza 1 podobná aktivínovému receptoru
ALK5	activin receptor-like kinase 5	kináza 5 podobná aktivínovému receptoru
API	aqua pro injectione	voda pre injekcie
ATS	atherosclerosis	ateroskleróza
BMP10	bone morphogenetic protein 10	kostný morfogenetický proteín 10
BMP9	bone morphogenetic protein 9	kostný morfogenetický proteín 9
BMPR	bone morphogenetic protein receptor	receptor kostného morfogenetického proteínu
BMPs	bone morphogenetic proteins	kostné morfogenetické proteíny
BSA	bovine serum albumine	hovädzí sérový albumín
cDNA	complementary DNA	komplementárna DNA
CRP	C-reactive protein	C-reaktívny proteín
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	chemokínový ligand 12 s motívom C-X-C
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EBM-2	endothelial cell growth basal medium	médium pre rast endotelových buniek
EC	endothelial cells	endotelové bunky
ED	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkcia
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	imunoenzymetické stanovenie
Eng	endoglin	endoglín
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ESAM	endothelial cell-selective adhesion molecule	endotelová selektívna adhézna molekula
FBS	fetal bovine serum	fetálne hovädzie sérum
FC	flow cytometry	prietoková cytometria

FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový rastový faktor
FSC	forward scatter	predný rozptyl
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GC	guanine-cytosine	guanín-cytozín
HAEC	human aortic endothelial cells	ľudské aortálne endotelové bunky
hEGF	human epidermal growth factor	ľudský epidermálny rastový faktor
HHT	hereditary hemorrhagic telangiectasia	hereditárna hemoragická teleangiektázia
HIF-1α	hypoxia-inducible factor 1 alpha	hypoxiou indukovateľný faktor 1 alfa
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	endotelové bunky ľudskej pupočníkovej žily
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1	medzibunková adhézna molekula-1
IgG1	immunoglobulin G1	imunoglobulín G1
IL-1	interleukin-1	interleukín-1
JAM	junctional adhesion molecule	spojovacia adhézna molekula
KLF6	Kruppel-like factor 6	člen rodiny faktorov podobných Kruppelovi 6
KVO	cardiovascular diseases	kardiovaskulárne ochorenia
KVS	cardiovascular system	kardiovaskulárny systém
LDL	low-density lipoproteins	lipoproteíny s nízkou hustotou
L-Eng	long endoglin	dlhý endoglin
LXR	liver X receptor	pečeňový X receptor
MM RT	master mix for reverse transcription	master mix na reverznú transkripciu
MMP12	matrix metalloproteinase 12	matrixová metaloproteináza 12
MMP14	matrix metalloproteinase 14	matrixová metaloproteináza 14
MMPs	matrix metalloproteinases	matrixové metaloproteinázy
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NF-κB	nuclear factor kappa B	nukleárny faktor kappa B
NK cells	natural killer cells	prirodzené zabíjači
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
NR1H3	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 3	člen 3 podrodiny jadrových receptorov 1 skupiny H
OD	orphan domain	sirotská doména

PBS	phosphate buffered saline	fosfátový tlmivý roztok
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová reťazová reakcia
PECAM-1	platelet and endothelial cell adhesion molecule-1	adhézna molekula krvných doštičiek a endotelových buniek-1
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	kvantitatívna reverzná transkripcia s polymerázovou reťazovou reakciou
R₃-IGF	recombinant insulin-like growth factor	rekombinantný rastový faktor podobný inzulínu
RD	reagent diluent	reagenčného činidlo
RelA	nuclear factor kappa B subunit phosphorylated on carbon 65	podjednotka nukleárneho faktoru kappa B fosforylovaná na uhlíku 65
RGD	arginyl-glycyl-aspartic acid	arginyl-glycyl-aspartát
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species	reaktívne formy kyslíka
RT	reverse transcription	reverzná transkripcia
SDF1α	stromal cell-derived factor 1 alpha	faktor 1 alfa odvodený zo stromálnych buniek
sEng	soluble endoglin	solubilný endoglin
S-Eng	short endoglin	krátky endoglin
SP	signaling peptide	signálny peptid
Sp1	specific protein 1	špecifický proteín 1
SSC	side scatter	bočný rozptyl
TGF-β	transforming growth factor beta	transformujúci rastový faktor beta
TGF-βR	transforming growth factor beta receptor	receptor transformujúceho rastového faktoru beta
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrotizujúci faktor alfa
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	vaskulárna bunková adhézna molekula-1
VEGF	vascular endothelial growth factor	cievny endotelový rastový faktor
WB	wash buffer	premyvací roztok
ZP	zona pellucida	zóna pellucida

ZP-C	zona pellucida domain closer to the C-terminal region	doména zóna pellucida bližšie k C-koncovej oblasti
ZP-N	zona pellucida domain closer to the N-terminal region	doména zóna pellucida bližšie k N-koncovej oblasti

9. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Experimentálny dizajn buniek.....	55
Tabuľka 2: Riedenie RNA	61
Tabuľka 3: Master mix na reverznú transkripciu.....	62
Tabuľka 4: Master mix na PCR	62
Tabuľka 5: 96-jamková doska	63
Tabuľka 6: Riedenie protilátok	65
Tabuľka 7: Rozdiel nameranej optickej hustoty pri 540 nm a 450 nm.....	70
Tabuľka 8: Odčítanie optickej hustoty od slepého vzorku	70
Tabuľka 9: Finálne hodnoty optickej hustoty	71
Tabuľka 10: Výsledná koncentrácia z online softvéru Assayfit Pro.....	71

10. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Štruktúra endoglínu.....	14
Obrázok 2: Signálne dráhy endoglínu v endotelových bunkách.....	17
Obrázok 3: Vznik solubilného endoglínu	18
Obrázok 4: Cievny endotel	19
Obrázok 5: Medzibunkové spojenia medzi endotelovými bunkami.....	20
Obrázok 6: Kardiovaskulárne rizikové faktory.....	24
Obrázok 7: Biomarkery endotelovej dysfunkcie	25
Obrázok 8: Mechanizmus transendotelovej migrácie leukocytov	26
Obrázok 9: Typy endotelových buniek často používaných vo výskume KVS.....	30
Obrázok 10: Zložky akútnej a chronickej zápalovej reakcie a ich hlavné funkcie...	32
Obrázok 11: Úloha endoglínu pri extravazácii leukocytov	33
Obrázok 12: Mechanizmus účinku TRC105.....	35
Obrázok 13: Schematické znázornenie polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)	37
Obrázok 14: Amplifikačná krivka.....	39
Obrázok 15: Schéma prietokového cytometru.....	41
Obrázok 16: Schematické znázornenie priamej ELISA metódy	43
Obrázok 17: Schematické znázornenie nepriamej ELISA metódy.....	43
Obrázok 18: Schematické znázornenie priamej sendvičovej ELISA metódy	44
Obrázok 19: Adhézia monocytov k endotelovým bunkám na báze fluorescencie ...	46
Obrázok 20: Transmigrácia monocytov cez polopriepustnú membránu	48
Obrázok 21: Ľudské aortálne endotelové bunky po inkubácii.....	51
Obrázok 22: Ľudské aortálne endotelové bunky po pôsobení akutázy.....	53
Obrázok 23: Schéma pasážovania buniek.....	54
Obrázok 24: Experimentálny dizajn ľudských aortálnych endotelových buniek	58
Obrázok 25: Proces izolácie RNA	60
Obrázok 26: Riedenie štandardu	68

11. ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: mRNA expresia endoglínu a jeho transkripčných faktorov	80
Graf 2: mRNA expresia zápalových molekúl	82
Graf 3: Proteínová expresia endoglínu a zápalových molekúl	84
Graf 4: Vznik solubilného endoglínu.....	86
Graf 5: Funkčná analýza	88

12. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Jeng, K.S., et al. *The Role of Endoglin in Hepatocellular Carcinoma*. Int J Mol Sci. 2021;22(6).
2. Tual-Chalot, S., et al. *Loss of Endothelial Endoglin Promotes High-Output Heart Failure through Peripheral Arteriovenous Shunting Driven by Vegf Signaling*. Circ Res. 2020;126(2):243-257.
3. Kapur, N.K., et al. *Endoglin: A Critical Mediator of Cardiovascular Health*. Vasc Health Risk Manag. 2013;9:195-206.
4. Valbuena-Diez, A.C., et al. *Oxysterol-Induced Soluble Endoglin Release and Its Involvement in Hypertension*. Circulation. 2012;126(22):2612-2624.
5. Rossi, E., et al. *Endothelial Endoglin Is Involved in Inflammation: Role in Leukocyte Adhesion and Transmigration*. Blood. 2013;121(2):403-415.
6. Nachtigal, P., et al. *The Role of Endoglin in Atherosclerosis*. Atherosclerosis. 2012;224(1):4-11.
7. Vicen, M., et al. *Regulation and Role of Endoglin in Cholesterol-Induced Endothelial and Vascular Dysfunction in Vivo and in Vitro*. FASEB J. 2019;33(5):6099-6114.
8. Reitsma, S., et al. *The Endothelial Glycocalyx: Composition, Functions, and Visualization*. Pflugers Arch. 2007;454(3):345-359.
9. Galley, H.F., Webster, N.R. *Physiology of the Endothelium*. Br J Anaesth. 2004;93(1):105-113.
10. Kasprzak, J.D., et al. *Clinical Aspects of Assessment of Endothelial Function*. Pharmacol Rep. 2006;58 Suppl:33-40.
11. Pi, X., et al. *Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis*. Circ Res. 2018;123(4):477-494.
12. Feletou, M. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. San Rafael (CA)2011.
13. Egeblad, M., Werb, Z. *New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression*. Nat Rev Cancer. 2002;2(3):161-174.

14. Endemann, D.H., Schiffrin, E.L. *Endothelial Dysfunction*. J Am Soc Nephrol. 2004;15(8):1983-1992.
15. Gimbrone, M.A., Jr., Garcia-Cardena, G. *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res. 2016;118(4):620-636.
16. Szmitko, P.E., et al. *New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I*. Circulation. 2003;108(16):1917-1923.
17. Medzhitov, R. *Origin and Physiological Roles of Inflammation*. Nature. 2008;454(7203):428-435.
18. Pahwa, R., et al. *Chronic Inflammation*. Statpearls. Treasure Island (FL)2022.
19. Hannoodee, S., Nasuruddin, D.N. *Acute Inflammatory Response*. Statpearls. Treasure Island (FL)2022.
20. Markiewski, M.M., Lambris, J.D. *The Role of Complement in Inflammatory Diseases from Behind the Scenes into the Spotlight*. Am J Pathol. 2007;171(3):715-727.
21. Liu, Y., et al. *Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain*. Int J Mol Sci. 2020;22(1).
22. Rosen, L.S., et al. *Endoglin for Targeted Cancer Treatment*. Curr Oncol Rep. 2014;16(2):365.
23. Saito, T., et al. *Structural Basis of the Human Endoglin-Bmp9 Interaction: Insights into Bmp Signaling and Hht1*. Cell Rep. 2017;19(9):1917-1928.
24. Hong, H., et al. *Positron Emission Tomography Imaging of Cd105 Expression During Tumor Angiogenesis*. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011;38(7):1335-1343.
25. Liu, Y., et al. *Modulation of Circulating Protein Biomarkers Following Trc105 (Anti-Endoglin Antibody) Treatment in Patients with Advanced Cancer*. Cancer Med. 2014;3(3):580-591.
26. Tripska, K., 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.
27. Bot, P.T., et al. *Increased Expression of the Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway, Endoglin, and Early Growth Response-1 in Stable Plaques*. Stroke. 2009;40(2):439-447.

28. St-Jacques, S., et al. *Localization of Endoglin, a Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein, and of Cd44 and Integrins in Placenta During the First Trimester of Pregnancy*. Biol Reprod. 1994;51(3):405-413.
29. Meurer, S., et al. *Endoglin Trafficking/Exosomal Targeting in Liver Cells Depends on N-Glycosylation*. Cells. 2019;8(9).
30. Lastres, P., et al. *Regulated Expression on Human Macrophages of Endoglin, an Arg-Gly-Asp-Containing Surface Antigen*. Eur J Immunol. 1992;22(2):393-397.
31. Xu, G., et al. *Novel Protein Interactions with Endoglin and Activin Receptor-Like Kinase 1: Potential Role in Vascular Networks*. Mol Cell Proteomics. 2014;13(2):489-502.
32. Gougos, A., Letarte, M. *Primary Structure of Endoglin, an Rgd-Containing Glycoprotein of Human Endothelial Cells*. J Biol Chem. 1990;265(15):8361-8364.
33. Llorca, O., et al. *Structural Model of Human Endoglin, a Transmembrane Receptor Responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*. J Mol Biol. 2007;365(3):694-705.
34. Garcia-Pozo, L., et al. *[Endoglin: Structure, Biological Functions, and Role in Fibrogenesis]*. Rev Esp Enferm Dig. 2008;100(6):355-360.
35. Oujo, B., et al. *Membrane and Soluble Forms of Endoglin in Preeclampsia*. Curr Mol Med. 2013;13(8):1345-1357.
36. Bellon, T., et al. *Identification and Expression of Two Forms of the Human Transforming Growth Factor-Beta-Binding Protein Endoglin with Distinct Cytoplasmic Regions*. Eur J Immunol. 1993;23(9):2340-2345.
37. Blanco, F.J., et al. *S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology*. Circ Res. 2008;103(12):1383-1392.
38. Di Guglielmo, G.M., et al. *Distinct Endocytic Pathways Regulate Tgf-Beta Receptor Signalling and Turnover*. Nat Cell Biol. 2003;5(5):410-421.
39. Schoonderwoerd, M.J.A., et al. *Endoglin: Beyond the Endothelium*. Biomolecules. 2020;10(2).
40. Velasco, S., 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):913-919.

41. Rossi, E., et al. *Endoglin Involvement in Integrin-Mediated Cell Adhesion as a Putative Pathogenic Mechanism in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1 (Hht1)*. *Front Genet.* 2014;5:457.
42. Rius, C., et al. *Cloning of the Promoter Region of Human Endoglin, the Target Gene for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1*. *Blood.* 1998;92(12):4677-4690.
43. Ollauri-Ibanez, C., et al. *Endoglin-Based Biological Therapy in the Treatment of Angiogenesis-Dependent Pathologies*. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(9):1053-1063.
44. Sanchez-Elsner, T., et al. *Endoglin Expression Is Regulated by Transcriptional Cooperation between the Hypoxia and Transforming Growth Factor-Beta Pathways*. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43799-43808.
45. van Uden, P., et al. *Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha by Nf-Kappab*. *Biochem J.* 2008;412(3):477-484.
46. Ratzliff, V., 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):9500-9505.
47. Botella, L.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):4001-4010.
48. Mitchell, S., et al. *Signaling Via the Nfkappab System*. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016;8(3):227-241.
49. Henry-Berger, J., 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):968-975.
50. Jonk, L.J., et al. *Identification and Functional Characterization of a Smad Binding Element (Sbe) in the Junb Promoter That Acts as a Transforming Growth Factor-Beta, Activin, and Bone Morphogenetic Protein-Inducible Enhancer*. *J Biol Chem.* 1998;273(33):21145-21152.
51. Venkatesha, S., et al. *Soluble Endoglin Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia*. *Nat Med.* 2006;12(6):642-649.

52. Cheifetz, S., et al. *Endoglin Is a Component of the Transforming Growth Factor-Beta Receptor System in Human Endothelial Cells*. J Biol Chem. 1992;267(27):19027-19030.
53. Townson, S.A., et al. *Specificity and Structure of a High Affinity Activin Receptor-Like Kinase 1 (Alk1) Signaling Complex*. J Biol Chem. 2012;287(33):27313-27325.
54. Massague, J., et al. *The Tgf-Beta Family and Its Composite Receptors*. Trends Cell Biol. 1994;4(5):172-178.
55. ten Dijke, P., et al. *Endoglin in Angiogenesis and Vascular Diseases*. Angiogenesis. 2008;11(1):79-89.
56. Tian, F., 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):283-288.
57. Alt, A., et al. *Structural and Functional Insights into Endoglin Ligand Recognition and Binding*. PLoS One. 2012;7(2):e29948.
58. Castonguay, R., et al. *Soluble Endoglin Specifically Binds Bone Morphogenetic Proteins 9 and 10 Via Its Orphan Domain, Inhibits Blood Vessel Formation, and Suppresses Tumor Growth*. J Biol Chem. 2011;286(34):30034-30046.
59. Li, W., et al. *Regulation of the Alk1 Ligands, Bmp9 and Bmp10*. Biochem Soc Trans. 2016;44(4):1135-1141.
60. Margioulas-Siarkou, G., et al. *The Role of Endoglin and Its Soluble Form in Pathogenesis of Preeclampsia*. Mol Cell Biochem. 2022;477(2):479-491.
61. Gregory, A.L., et al. *Review: The Enigmatic Role of Endoglin in the Placenta*. Placenta. 2014;35 Suppl:S93-99.
62. Bernabeu, C., et al. *The Emerging Role of Tgf-Beta Superfamily Coreceptors in Cancer*. Biochim Biophys Acta. 2009;1792(10):954-973.
63. Alsamman, M., et al. *Endoglin in Human Liver Disease and Murine Models of Liver Fibrosis-a Protective Factor against Liver Fibrosis*. Liver Int. 2018;38(5):858-867.
64. Qu, R., et al. *Distribution of Endoglin in Early Human Development Reveals High Levels on Endocardial Cushion Tissue Mesenchyme During Valve Formation*. Cell Tissue Res. 1998;292(2):333-343.

65. Hawinkels, L.J., et al. *Matrix Metalloproteinase-14 (Mtl-Mmp)-Mediated Endoglin Shedding Inhibits Tumor Angiogenesis*. *Cancer Res*. 2010;70(10):4141-4150.
66. Blazquez-Medela, A.M., et al. *Increased Plasma Soluble Endoglin Levels as an Indicator of Cardiovascular Alterations in Hypertensive and Diabetic Patients*. *BMC Med*. 2010;8:86.
67. Lawera, A., et al. *Role of Soluble Endoglin in Bmp9 Signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(36):17800-17808.
68. Adamson, R.H. *Microvascular Endothelial Cell Shape and Size in Situ*. *Microvasc Res*. 1993;46(1):77-88.
69. Augustin, H.G., et al. *Differentiation of Endothelial Cells: Analysis of the Constitutive and Activated Endothelial Cell Phenotypes*. *Bioessays*. 1994;16(12):901-906.
70. *An Introduction to Primary Endothelial Cells*.
https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/endothelial-cells. Accessed 26.03.2023.
71. Dejana, E., et al. *Endothelial Cell-to-Cell Junctions*. *FASEB J*. 1995;9(10):910-918.
72. Schnittler, H.J. *Structural and Functional Aspects of Intercellular Junctions in Vascular Endothelium*. *Basic Res Cardiol*. 1998;93 Suppl 3:30-39.
73. Dejana, E. *Endothelial Adherens Junctions: Implications in the Control of Vascular Permeability and Angiogenesis*. *J Clin Invest*. 1996;98(9):1949-1953.
74. Bennett, H.S., et al. *Morphological Classifications of Vertebrate Blood Capillaries*. *Am J Physiol*. 1959;196(2):381-390.
75. Duong, C.N., Vestweber, D. *Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond Ve-Cadherin*. *Front Physiol*. 2020;11:519.
76. Augustin, H.G., Koh, G.Y. *Organotypic Vasculature: From Descriptive Heterogeneity to Functional Pathophysiology*. *Science*. 2017;357(6353).
77. Minami, T., et al. *Organ/Tissue-Specific Vascular Endothelial Cell Heterogeneity in Health and Disease*. *Biol Pharm Bull*. 2019;42(10):1609-1619.
78. Gillich, A., et al. *Capillary Cell-Type Specialization in the Alveolus*. *Nature*. 2020;586(7831):785-789.
79. Kruger-Genge, A., et al. *Vascular Endothelial Cell Biology: An Update*. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).

80. Huang, X., et al. *Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Sex and Age Diversity of Gene Expression in Mouse Endothelial Cells*. *Front Genet*. 2021;12:590377.
81. Song, H.W., et al. *Transcriptomic Comparison of Human and Mouse Brain Microvessels*. *Sci Rep*. 2020;10(1):12358.
82. Voisin, M.B., Nourshargh, S. *Neutrophil Transmigration: Emergence of an Adhesive Cascade within Venular Walls*. *J Innate Immun*. 2013;5(4):336-347.
83. Sandoo, A., et al. *The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone*. *Open Cardiovasc Med J*. 2010;4:302-312.
84. Bonetti, P.O., et al. *Endothelial Dysfunction: A Marker of Atherosclerotic Risk*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168-175.
85. Pries, A.R., et al. *The Endothelial Surface Layer*. *Pflugers Arch*. 2000;440(5):653-666.
86. Nachman, R.L., Jaffe, E.A. *Endothelial Cell Culture: Beginnings of Modern Vascular Biology*. *J Clin Invest*. 2004;114(8):1037-1040.
87. Aird, W.C. *Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms*. *Circ Res*. 2007;100(2):158-173.
88. Minshall, R.D., Malik, A.B. *Transport across the Endothelium: Regulation of Endothelial Permeability*. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(176 Pt 1):107-144.
89. Folkman, J., D'Amore, P.A. *Blood Vessel Formation: What Is Its Molecular Basis?* *Cell*. 1996;87(7):1153-1155.
90. Fischer, C., et al. *Principles and Therapeutic Implications of Angiogenesis, Vasculogenesis and Arteriogenesis*. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(176 Pt 2):157-212.
91. Hadi, H.A., et al. *Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome*. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183-198.
92. Lum, H., Roebuck, K.A. *Oxidant Stress and Endothelial Cell Dysfunction*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(4):C719-741.
93. Ross, R. *Atherosclerosis--an Inflammatory Disease*. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.
94. Poznyak, A.V., et al. *Nadph Oxidases and Their Role in Atherosclerosis*. *Biomedicines*. 2020;8(7).

95. Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. *Reactive Oxygen Species in Vascular Biology: Implications in Hypertension*. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(4):339-352.
96. Ray, P.D., et al. *Reactive Oxygen Species (Ros) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling*. *Cell Signal*. 2012;24(5):981-990.
97. Venugopal, S.K., et al. *Demonstration That C-Reactive Protein Decreases Enos Expression and Bioactivity in Human Aortic Endothelial Cells*. *Circulation*. 2002;106(12):1439-1441.
98. Koppenol, W.H., et al. *Peroxynitrite, a Cloaked Oxidant Formed by Nitric Oxide and Superoxide*. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(6):834-842.
99. Griending, K.K., FitzGerald, G.A. *Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part I: Basic Mechanisms and in Vivo Monitoring of Ros*. *Circulation*. 2003;108(16):1912-1916.
100. Park, K.H., Park, W.J. *Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches*. *J Korean Med Sci*. 2015;30(9):1213-1225.
101. Pasceri, V., et al. *Direct Proinflammatory Effect of C-Reactive Protein on Human Endothelial Cells*. *Circulation*. 2000;102(18):2165-2168.
102. Collins, T., et al. *Transcriptional Regulation of Endothelial Cell Adhesion Molecules: Nf-Kappa B and Cytokine-Inducible Enhancers*. *FASEB J*. 1995;9(10):899-909.
103. Blake, G.J., Ridker, P.M. *Novel Clinical Markers of Vascular Wall Inflammation*. *Circ Res*. 2001;89(9):763-771.
104. Medina-Leyte, D.J., et al. *Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches*. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8).
105. Ley, K., Reutershan, J. *Leucocyte-Endothelial Interactions in Health and Disease*. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(176 Pt 2):97-133.
106. Hwang, S.J., 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):4219-4225.

107. Carman, C.V., Springer, T.A. *A Transmigratory Cup in Leukocyte Diapedesis Both through Individual Vascular Endothelial Cells and between Them*. J Cell Biol. 2004;167(2):377-388.
108. Zhang, J., et al. *Biomarkers of Endothelial Cell Activation Serve as Potential Surrogate Markers for Drug-Induced Vascular Injury*. Toxicol Pathol. 2010;38(6):856-871.
109. Zhang, J., et al. *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.
110. Arts, J.J., et al. *Endothelial Junctional Membrane Protrusions Serve as Hotspots for Neutrophil Transmigration*. Elife. 2021;10.
111. Kumar, V., et al. *Inflammation and Repair* Robbins Basic Pathology (9th Edition)2013.
112. Santibanez, J.F., et al. *Endoglin Increases Enos Expression by Modulating Smad2 Protein Levels and Smad2-Dependent Tgf-Beta Signaling*. J Cell Physiol. 2007;210(2):456-468.
113. Jerkic, M., et al. *Endoglin Regulates Nitric Oxide-Dependent Vasodilatation*. FASEB J. 2004;18(3):609-611.
114. Zemankova, L., et al. *Atorvastatin-Induced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in Endothelial Cells Is Mediated by Endoglin*. J Physiol Pharmacol. 2015;66(3):403-413.
115. Vicen, M., et al. *Membrane and Soluble Endoglin Role in Cardiovascular and Metabolic Disorders Related to Metabolic Syndrome*. Cell Mol Life Sci. 2021;78(6):2405-2418.
116. Gallardo-Vara, E., et al. *Potential Role of Circulating Endoglin in Hypertension Via the Upregulated Expression of Bmp4*. Cells. 2020;9(4).
117. Varejckova, M., et al. *Soluble Endoglin Modulates the Pro-Inflammatory Mediators Nf-Kappab and Il-6 in Cultured Human Endothelial Cells*. Life Sci. 2017;175:52-60.
118. Jimenez-Tellez, N., Greenway, S.C. *Cellular Models for Human Cardiomyopathy: What Is the Best Option?* World J Cardiol. 2019;11(10):221-235.

119. Lippi, M., et al. *Human Cell Modeling for Cardiovascular Diseases*. Int J Mol Sci. 2020;21(17).
120. Marx, V. *Cell-Line Authentication Demystified*. Nat Methods. 2014;11(5):483-488.
121. Donnini, D., et al. *A New Model of Human Aortic Endothelial Cells in Vitro*. Biochimie. 2000;82(12):1107-1114.
122. Liu, B., et al. *Downregulated Microrna-133a Induces Huvecs Injury: Potential Role of the (Pro) Renin Receptor in Angiotensin Ii-Dependent Hypertension*. Mol Med Rep. 2019;20(3):2796-2804.
123. Baudin, B., et al. *A Protocol for Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. Nat Protoc. 2007;2(3):481-485.
124. Torres-Vazquez, J., et al. *Molecular Distinction between Arteries and Veins*. Cell Tissue Res. 2003;314(1):43-59.
125. Deng, D.X., et al. *Differences in Vascular Bed Disease Susceptibility Reflect Differences in Gene Expression Response to Atherogenic Stimuli*. Circ Res. 2006;98(2):200-208.
126. Ando, J., Kamiya, A. *Flow-Dependent Regulation of Gene Expression in Vascular Endothelial Cells*. Jpn Heart J. 1996;37(1):19-32.
127. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. <https://www.sciencellonline.com/human-umbilical-vein-endothelial-cells/>. Accessed 26.03.2023.
128. *Human Aortic Endothelial Cells*. <https://www.sciencellonline.com/human-aortic-endothelial-cells/>. Accessed 26.03.2023.
129. Branco, A., et al. *Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation*. Mediators Inflamm. 2018;2018:9524075.
130. Karin, N. *The Multiple Faces of Cxcl12 (Sdf-1alpha) in the Regulation of Immunity During Health and Disease*. J Leukoc Biol. 2010;88(3):463-473.
131. Ley, K., et al. *Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated*. Nat Rev Immunol. 2007;7(9):678-689.
132. Schoonderwoerd, M.J.A., et al. *Targeting Endoglin-Expressing Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment Enhances the Effect of Pd1 Checkpoint Inhibitor Immunotherapy*. Clin Cancer Res. 2020;26(14):3831-3842.

133. Kumar, S., et al. *Antibody-Directed Coupling of Endoglin and Mmp-14 Is a Key Mechanism for Endoglin Shedding and Dereglulation of Tgf-Beta Signaling*. *Oncogene*. 2014;33(30):3970-3979.
134. Paauwe, M., et al. *Endoglin Targeting Inhibits Tumor Angiogenesis and Metastatic Spread in Breast Cancer*. *Oncogene*. 2016;35(31):4069-4079.
135. Liu, Y., et al. *Effects of the Combination of Trc105 and Bevacizumab on Endothelial Cell Biology*. *Invest New Drugs*. 2014;32(5):851-859.
136. Garibyan, L., Avashia, N. *Polymerase Chain Reaction*. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
137. Mullis, K.B. *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*. *Sci Am*. 1990;262(4):56-61, 64-55.
138. Delidow, B.C., et al. *Polymerase Chain Reaction : Basic Protocols*. *Methods Mol Biol*. 1993;15:1-29.
139. Enzoklop. *Schematic Drawing of the Pcr Cycle*. 2014
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg. Accessed 28.03.2023.
140. Killelea, T., et al. *Pcr Performance of a Thermostable Heterodimeric Archaeal DNA Polymerase*. *Front Microbiol*. 2014;5:195.
141. Yamagami, T., et al. *Mutant Taq DNA Polymerases with Improved Elongation Ability as a Useful Reagent for Genetic Engineering*. *Front Microbiol*. 2014;5:461.
142. Bachman, J. *Reverse-Transcription Pcr (Rt-Pcr)*. *Methods Enzymol*. 2013;530:67-74.
143. VanGuilder, H.D., et al. *Twenty-Five Years of Quantitative Pcr for Gene Expression Analysis*. *Biotechniques*. 2008;44(5):619-626.
144. Bustin, S.A., et al. *Quantitative Real-Time Rt-Pcr--a Perspective*. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(3):597-601.
145. Wadle, S., et al. *Real-Time Pcr Probe Optimization Using Design of Experiments Approach*. *Biomol Detect Quantif*. 2016;7:1-8.
146. Kubista, M., et al. *The Real-Time Polymerase Chain Reaction*. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.

147. Zainuddin, A., et al. *Effect of Experimental Treatment on Gapdh Mrna Expression as a Housekeeping Gene in Human Diploid Fibroblasts*. BMC Mol Biol. 2010;11:59.
148. Adan, A., et al. *Flow Cytometry: Basic Principles and Applications*. Crit Rev Biotechnol. 2017;37(2):163-176.
149. Wilkerson, M.J. *Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine*. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2012;42(1):53-71.
150. Shapiro, H.M. *Lasers for Flow Cytometry*. Curr Protoc Cytom. 2004;Chapter 1:Unit 1 9.
151. Reggeti, F., Bienzle, D. *Flow Cytometry in Veterinary Oncology*. Vet Pathol. 2011;48(1):223-235.
152. LearnHaem. *Flow Cytometers*. 2021 <https://www.learnhaem.com/courses/flow-cytometry/lessons/flow-cytometers/>. Accessed 28.03.2023.
153. Hornbeck, P. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*. Curr Protoc Immunol. 2001;Chapter 2:Unit 2 1.
154. Engvall, E. *The Elisa, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Clin Chem. 2010;56(2):319-320.
155. Lequin, R.M. *Enzyme Immunoassay (Eia)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa)*. Clin Chem. 2005;51(12):2415-2418.
156. Konstantinou, G.N. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa)*. Methods Mol Biol. 2017;1592:79-94.
157. Shah, K., Maghsoudlou, P. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa): The Basics*. Br J Hosp Med (Lond). 2016;77(7):C98-101.
158. Kohl, T.O., Ascoli, C.A. *Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa)*. Cold Spring Harb Protoc. 2017;2017(7):pdb prot093740.
159. *Direct Elisa*. <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>. Accessed 01.04.2023.
160. *Indirect Elisa*. <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>. Accessed 01.04.2023.
161. Kohl, T.O., Ascoli, C.A. *Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Cold Spring Harb Protoc. 2017;2017(6):pdb prot093724.

162. *Sandwich Elisa*. <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>. Accessed 01.04.2023.
163. Kataoka, H., et al. *An Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Brigatinib and Gilteritinib Using a Specific Polyclonal Antibody*. Biol Pharm Bull. 2022;45(7):904-909.
164. Mestas, J., Ley, K. *Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med. 2008;18(6):228-232.
165. Ende, G., et al. *Tnf-Alpha-Mediated Adhesion of Monocytes to Endothelial Cells-the Role of Ephrina1*. J Mol Cell Cardiol. 2014;77:125-135.
166. Xu, K., et al. *Monocyte Adhesion Assays for Detecting Endothelial Cell Activation in Vascular Inflammation and Atherosclerosis*. Methods Mol Biol. 2022;2419:169-182.
167. Dejana, E., et al. *Organization and Signaling of Endothelial Cell-to-Cell Junctions in Various Regions of the Blood and Lymphatic Vascular Trees*. Cell Tissue Res. 2009;335(1):17-25.
168. Carman, C.V., et al. *Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes*. Immunity. 2007;26(6):784-797.
169. Vandembroucke St Amant, E., et al. *Pkcalpha Activation of P120-Catenin Serine 879 Phospho-Switch Disassembles Ve-Cadherin Junctions and Disrupts Vascular Integrity*. Circ Res. 2012;111(6):739-749.
170. Hashimoto, K., et al. *Monocyte Trans-Endothelial Migration Augments Subsequent Transmigratory Activity with Increased Pecam-1 and Decreased Ve-Cadherin at Endothelial Junctions*. Int J Cardiol. 2011;149(2):232-239.
171. Bazzoni, G. *The Jam Family of Junctional Adhesion Molecules*. Curr Opin Cell Biol. 2003;15(5):525-530.
172. Muller, W.A., et al. *Pecam-1 Is Required for Transendothelial Migration of Leukocytes*. J Exp Med. 1993;178(2):449-460.
173. Schenkel, A.R., et al. *Cd99 Plays a Major Role in the Migration of Monocytes through Endothelial Junctions*. Nat Immunol. 2002;3(2):143-150.
174. Sullivan, D.P., et al. *Poliovirus Receptor (Cd155) Regulates a Step in Transendothelial Migration between Pecam and Cd99*. Am J Pathol. 2013;182(3):1031-1042.

175. Chen, H.C. *Boyden Chamber Assay*. *Methods Mol Biol*. 2005;294:15-22.
176. Falasca, M., et al. *Boyden Chamber*. *Methods Mol Biol*. 2011;769:87-95.
177. Deng, Y., et al. *An in Vitro Transepithelial Migration Assay to Evaluate the Role of Neutrophils in Respiratory Syncytial Virus (Rsv) Induced Epithelial Damage*. *Sci Rep*. 2018;8(1):6777.
178. Čedíková, M., et al. *On-Line Atlas Různých Typů Kmenových Buněk a Vybraných Diferenciačních Postupů*. 2012.
179. Banerjee, S., et al. *Endoglin Is a Novel Endothelial Cell Specification Gene*. *Stem Cell Res*. 2012;8(1):85-96.
180. *A Diagram of the Different Steps in Rna Extraction*.
<https://www.addgene.org/protocols/kit-free-rna-extraction/>. Accessed 28.04.2023.
181. Rao, X., et al. *An Improvement of the 2⁻(-Delta Delta Ct) Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis*. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
182. *Human Endoglin/Cd105 DuoSet Elisa*.
https://www.rndsystems.com/products/human-endoglin-cd105-duo-set-elisa_dy1097#product-datasheets. Accessed 28.04.2023.
183. Li, C., et al. *Quercetin Inhibits Lps-Induced Adhesion Molecule Expression and Oxidant Production in Human Aortic Endothelial Cells by P38-Mediated Nrf2 Activation and Antioxidant Enzyme Induction*. *Redox Biol*. 2016;9:104-113.
184. Zhou, C.C., et al. *Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibody-Mediated Tumor Necrosis Factor-Alpha Induction Contributes to Increased Soluble Endoglin Production in Preeclampsia*. *Circulation*. 2010;121(3):436-444.
185. Lively, S., Schlichter, L.C. *The Microglial Activation State Regulates Migration and Roles of Matrix-Dissolving Enzymes for Invasion*. *J Neuroinflammation*. 2013;10:75.