

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



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**HODNOCENÍ EXPRESE ICAM-1  
A P-SELEKTINU V AORTĚ MYŠÍ S VYSOKÝMI  
HLADINAMI SÉROVÉHO ENDOGLINU POMOCÍ  
WESTERN BLOT ANALÝZY**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2015

BARBORA UHLÍŘOVÁ

## **Poděkování**

Děkuji své školitelce PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D., za odbornou pomoc, vedení a lidský přístup, který mi poskytla při zpracování této diplomové práce. Další poděkování patří mé rodině a přátelům za podporu a trpělivost v průběhu celého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 30.4.2015

# OBSAH

1. ABSTRAKT.....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. ÚVOD.....	9
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
4.1 Ateroskleróza a principy rozvoje.....	10
4.1.1 Morfologická stavba arterie.....	10
4.1.2 Ateroskleróza a její základní formy.....	11
4.2 Cévní endotel.....	15
4.2.1 Endotel za fyziologických podmínek.....	15
4.2.2 Role endotelu při zánětu.....	15
4.2.3 Endotelová dysfunkce.....	18
4.3 Endoglin.....	24
4.3.1 Struktura endoglinu, jeho isoformy a exprese.....	24
4.3.2 Endoglin - pomocný TGF- $\beta$ RIII.....	26
4.3.3 Role endoglinu v procesu aterogeneze.....	29
4.3.4 Role sérového endoglinu v procesu aterogeneze.....	30
5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	33
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
6.1 Materiál - Použitá zvířata.....	35
6.2 Imunoanalytické stanovení - ELISA analýza.....	36
6.3 Biochemická analýza.....	36
6.4 Pracovní postup pro Western blot analýzu.....	36
6.4.1 Gelová elektroforéza.....	36
6.4.2 Blotování.....	39
6.4.3 Imunodetekce, chemiluminiscenční detekce.....	40
6.5 Vyhodnocení, statistická analýza.....	43
7. Výsledky.....	44
7.1 Biochemická analýza.....	44

7.2	Western blot analýza.....	45
8.	Diskuze.....	48
9.	ZÁVĚR.....	52
10.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	53
11.	SEZNAM TABULEK .....	55
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	55
13.	SEZNAM GRAFŮ.....	55
14.	POUŽITÁ LETERATURA.....	56

# 1. ABSTRAKT

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Autor:** Barbora Uhlířová

**Školitel:** PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Hodnocení exprese ICAM-1 a P-selektinu v aortě myši s vysokými hladinami sérového endoglinu pomocí Western blot analýzy

**Cíl práce:** Detekce a následné vyhodnocení exprese adhezních molekul ICAM-1 a P-selektinu v aortě dvou skupin transgenních myši lišících se hladinami lidského sérového endoglinu, které byly krmeny speciální dietou s vysokým obsahem tuku a cholesterolu.

**Metody:** Použili jsme 6 měsíců staré samice transgenních myši schopných exprese lidského endoglinu, který po odštěpení do cirkulace (tzv. solubilní endoglin - sENG) bylo možné stanovit pomocí ELISA analýzy a rozdělit myši do dvou skupin - sledovaná (vysoké hladiny sENG) a kontrolní (velmi nízké hladiny sENG). Oběma skupinám byla po dobu 3 měsíců podávána speciální dieta s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Byla provedena biochemická analýza (hladiny celkového cholesterolu) a Western blot analýza molekul ICAM-1 a P-selektinu v homogenátu myších aort.

**Výsledky:** Biochemická analýza celkového cholesterolu v krvi neprokázala statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách mezi oběma zkoumanými skupinami myši. Western blot analýza prokázala signifikantně zvýšenou expresi adhezní molekuly ICAM-1 o 90 % a adhezní molekuly P-selektinu o 47 % v porovnání s kontrolní skupinou.

**Závěr:** Výsledky této studie poukazují na možný podíl zvýšených hladin sérového endoglinu v kombinaci s cholesterolovou dietou na zvýšenou expresi zánětlivých markerů v aortě myši, a tedy na možné ovlivnění endotelu ve smyslu indukce zánětu.

**Klíčová slova:** endotelová dysfunkce, zánětlivá reakce, ICAM-1, P-selektin, solubilní endoglin

## 2. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

**Author:** Barbora Uhlířová

**Supervisor:** PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

**Title of Diploma Thesis:** Western blot analysis of ICAM-1 and P-selectin protein expression in aorta of mice with high soluble endoglin levels

**Background:** Detection and subsequent evaluation of the expression of adhesion molecules ICAM-1 and P-selectin in aorta of two groups of transgenic mice differing by levels of human serum endoglin that were fed a special high fat and cholesterol diet.

**Methods:** We used six-month-old female transgenic mice capable of expressing of human endoglin, which was able to be determined after cleavage in the circulation (Soluble endoglin - sENG) by the use of an ELISA assay. Therefore, we were able to divide the mice into two groups - an experimental group (high levels of sENG) and a control group (very low sENG levels). For 3 months, both groups were given a special high fat and cholesterol diet. Biochemical analysis (total cholesterol levels), and Western blot analysis of molecules ICAM-1 and P-selectin in the homogenate of mouse aortas were carried out.

**Results:** Biochemical analysis of total cholesterol in the blood revealed statistically no significant differences in the measured values between both groups of mice. Western blot analysis demonstrated a significantly increased expression of the adhesion molecule ICAM-1 by 90 % and the adhesion molecule P-selectin by 47 % in comparison with the control group.

**Conclusions:** The results of this study suggest a potential share of increased levels of serum endoglin in combination with cholesterol diet to increased expression of

inflammatory markers in mice aorta, and thus a possible effect on the endothelium in terms of an induction of inflammation.

**Keywords:** endothelial dysfunction, inflammatory response, ICAM-1, P-selectin, soluble endoglin



### 3. ÚVOD

Endotelová dysfunkce je dnes popisována jako soubor změn endotelových funkcí, které nastávají ještě před začátkem aterosklerotických změn. Některými autory je označována jako první stadium aterosklerózy. Jedná se o funkční poškození endotelové výstelky, jehož spouštěčem může být řada mechanických, fyzikálně-chemických a imunologických faktorů. Za její rozvoj a často i za komplikace s ní souvisejících je zodpovědná souhra řady faktorů, jež jsou známy jako rizikové faktory rozvoje aterosklerózy. Následkem funkčně poškozeného endotelu je zvýšená propustnost cévní stěny a vznik nerovnováhy mezi vazoaktivními mechanizmy a hemokoagulačními působky, jež vede k převaze vazospastických, protrombotických a aterogenních mechanismů (Vrablík et al., 2011).

Mechanismy spjaté se selháním endotelových funkcí jsou tedy velmi komplexní, přičemž za společný rys je považován rozvoj zánětlivé reakce jako odpověď endotelu na poškození cévní stěny. Bylo prokázáno, že v tomto procesu hraje klíčovou roli řada adhezních molekul a cytokinů - mediátorů exprimovaných při zánětu endotelovými buňkami (Frenette et al., 1996).

Podle řady literárních zdrojů je za jakýsi marker patologických stavů kardiovaskulárního systému považován solubilní endoglin (sENG) neboli netkáňová tzv. sérová forma endoglinu, transmembránového glykoproteinu (receptoru pro TGF- $\beta$  cytokin). Existuje tedy řada onemocnění souvisejících s tímto markerem, přičemž jeho zvýšené hladiny byly prokázány rovněž během procesu aterogeneze (Blaha et al., 2008; Blann et al., 2006; Ikemoto et al., 2012). Vzhledem k tomu, že účinky sérové formy endoglinu jsou často považovány za protichůdné oproti působení jeho tkáňové formy, byla řadou studií zkoumána spojitost sENG s endotelovou dysfunkcí, a tedy poškozením kardiovaskulárního systému (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala otázkou vlivu vysokých hladin solubilního endoglinu na expresi prozánětlivých adhezních molekul, konkrétně ICAM-1 a P-selektinu, a tedy ovlivněním endotelu ve smyslu indukce zánětu.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

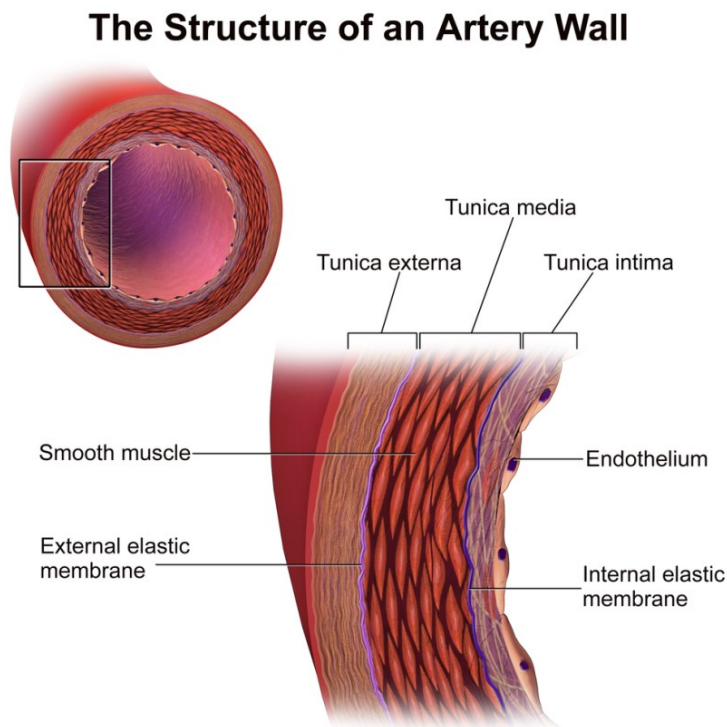
### 4.1 Ateroskleróza a principy rozvoje

#### 4.1.1 Morfologická stavba arterie

Stěna arterie je vymezena třemi soustřednými vrstvami: vnitřní (tunica interna - intima), střední (tunica media - media) a zevní (tunica externa - adventitia). Jednotlivé vrstvy jsou pak dále odděleny soustřednými vrstvami elastinu, přičemž mezi intimou a medií se nachází vrstva lamina elastica interna a mezi medií a adventitií je vrstva lamina elastica externa. Luminální povrch arterie představuje souvislá vrstva plochých těsně přiléhajících endotelových buněk, jež nasedá na bazální membránu extracelulární matrix a je vymezena spodní hranicí - vrstvou lamina elastica interna. Tato vrstva endotelových buněk tedy hraje roli jakési dynamické bariéry mezi lumen arterie a stromatem arteriální stěny. Mimo to je dnes již znám také vliv těchto buněk na celou řadu funkcí v arteriální stěně, mezi nejvýznamnější patří například regulace cévního tonu, krevní srážení, průchod leukocytů do cévní stěny (Keaney, 2000).

- **Vnitřní vrstva (tunica interna - intima)** neboli výstelka, tzv. endotel - je tvořena jednou vrstvou plochých buněk s hladkým a nesmáčivým povrchem. Pod endotelem je uložena subendotelová vrstva řídkého vaziva, v níž se příležitostně mohou vyskytovat elementy hladkého svalstva (Merkunová and Orel, 2008).
- **Střední vrstva (tunica media - media)** je složena z hladké svaloviny a elastických vláken, přičemž zastoupení obou tkání závisí na typu cévy - v menších a středních tepnách a především tepénkách se nachází mohutná vrstva svaloviny, která naproti tomu zcela chybí například ve vlasečnicích (Merkunová and Orel, 2008).
- **Vnější vrstva (tunica externa - adventitia)** je vrstva tvořená vazivem, v níž se rozvětvují pleteně sympatických nervových vláken. Díky tomu je pak tato vrstva schopna ovlivňovat napětí hladké svaloviny ve stěně cév (Merkunová and Orel, 2008).

## Obrázek 1 - Struktura arteriální stěny



Převzato z [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen\\_0055\\_ArteryWallStructure.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png)

[vid. 11-03-2015]

endothelium - endotel, external elastic membrane - vnější elastická membrána, internal elastic membrane - vnitřní elastická membrána, smooth muscle - hladká svalovina

### 4.1.2 Ateroskleróza a její základní formy

Ateroskleróza je dle starší, nicméně široce akceptovatelné definice popisována jako různorodá kombinace změn arteriální intimy, jež vyúsťuje v místní akumulaci lipidů, dalších komponent krve a fibrózní tkáně (Perušičová and Češka, 2009).

Důsledkem akumulace těchto elementů v cévní stěně dochází tedy ke ztluštění nevnitřnější vrstvy arterie (tunica intima), jež postupně zužuje průsvit cévy. Není však zasažena pouze vrstva cévní intimy. Postižena je i střední vrstva - tunica media, která degeneruje, ztenčuje se, vazivově se mění a ztrácí svoji pevnost (Šteiner, 2010).

Průběh tohoto onemocnění může být značně individuální, závislý je především na působení rizikových faktorů a na geneticky podmíněné citlivosti cévní stěny k jejich působení. Proces aterogeneze tak může progredovat i několik let, aniž by se objevily první klinické projevy (Keaney, 2000; Vrablík, 2009).

Následkem dlouhodobého progredujícího procesu aterogeneze pak může docházet ke komplikacím, jenž se klinicky manifestují jako ischemická choroba srdeční (ICHS), cévní mozková příhoda (CMP) nebo ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) (Perušičová and Češka, 2009).

Z patologicko-anatomického hlediska se rozlišují **3 základní stupně aterosklerotických lézí:**

- časně léze - tukové proužky
- fibrózní a ateromové pláty
- stadium komplikací, tzv. komplikované léze

### **Tukové proužky**

Časně léze aterosklerózy neboli tukové proužky jsou popsány jako žlutavá ložiska nacházející se v intimě především velkých cév, jejichž základem jsou pěnivé buňky vzniklé z makrofágů a buněk hladké svaloviny. K dalším buněčným elementům, jež se mohou vyskytovat v tukových proužcích, patří T-lymfocyty, ojediněle to mohou být také extracelulární lipidové kapénky. Vzhledem k tomu, že tato ložiska nezasahují do lumen arterie, nemohou významným způsobem ovlivnit průtok krve. Tukové proužky představují v podstatě reverzibilní léze, které mohou být prekurzorem pro vznik dalšího stupně tohoto onemocnění - aterosklerotického plátu. Je však také možné jejich vymizení. Tato nejčastěji se vyskytující forma aterosklerózy je běžná již u dětí (Češka, 2005; Šteiner, 1994).

### **Aterosklerotický plát**

Dalším stupněm aterosklerotických lézí již zasahujícím do lumen arterie jsou obvykle ostře ohraničená ložiska ve stěně cév - aterosklerotické pláty. Jejich velikost na délku se pohybuje od několika milimetrů po několik centimetrů, tloušťka většinou okolo 1 – 5 mm, přičemž s progresí onemocnění dochází k zvětšování, ztlušťování ale také přibývání těchto ložisek. Následkem tohoto děje pak dochází ke ztluštění cévní

stěny, jenž společně s vyklenutím do lumen cévy vede k částečné nebo úplné obstrukci jejího průsvitu (Češka, 2005; Šteiner, 1994).

Hlavní složku aterosklerotického plátu tvoří extracelulární mezibuněčná hmota, jejíž syntéza a odbourávání představují za fyziologického stavu pomalý proces. Během aterogeneze je však zvýšená tvorba jejích hlavních složek - elastinu, kolagenu a proteoglykanů. Díky působení zánětlivých buněk (pěnové buňky, makrofágy) vzniká uvnitř plátu prostředí bohaté na cytokiny a růstové faktory, jež mají následně významný vliv na syntézu i degradaci zmíněné matrix (Keaney, 2000).

Podle obsahu lipidů rozlišujeme **dva typy aterosklerotických plátů**:

- ateromový (nestabilní) plát
- fibrózní (stabilní) plát

První typ - **ateromový (nestabilní) plát** obsahuje velké množství lipidů žlutavé barvy a měkčí konzistence. Základ tohoto plátu představuje hyalinní vazivo na povrchu (vazivová čepička) a centrálně uložené nekrotické ateromové ložisko bohaté na cholesterol a jeho estery. Pro tento typ plátu jsou typické časté ruptury na okraji plátu a následný vznik trombózy projevující se akutní cévní příhodou (Češka, 2005; Svačina, 2010; Šteiner, 2010).

**Fibrózní (stabilní) plát** s malým obsahem lipidů světlešedé barvy tuhé konzistence naopak nemá tendence k ruptuře a následné trombóze, jež by uzavírala lumen cévy. Tento typ plátu se skládá z hyalinizovaného kolagenního vaziva, velkého množství proliferujících buněk hladké svaloviny a makrofágů, jež mohou být v různém stupni přeměny v pěnové buňky (Svačina, 2010; Šteiner, 2010).

### Stádium komplikací

Posledním stupněm aterosklerotických lézí jsou léze komplikované, které vznikají z aterosklerotického plátu kalcifikací, ulcerací (zvrhodovatěním) a následnou rupturou vazivové čepičky plátu (Češka, 2005; Šteiner, 1994).

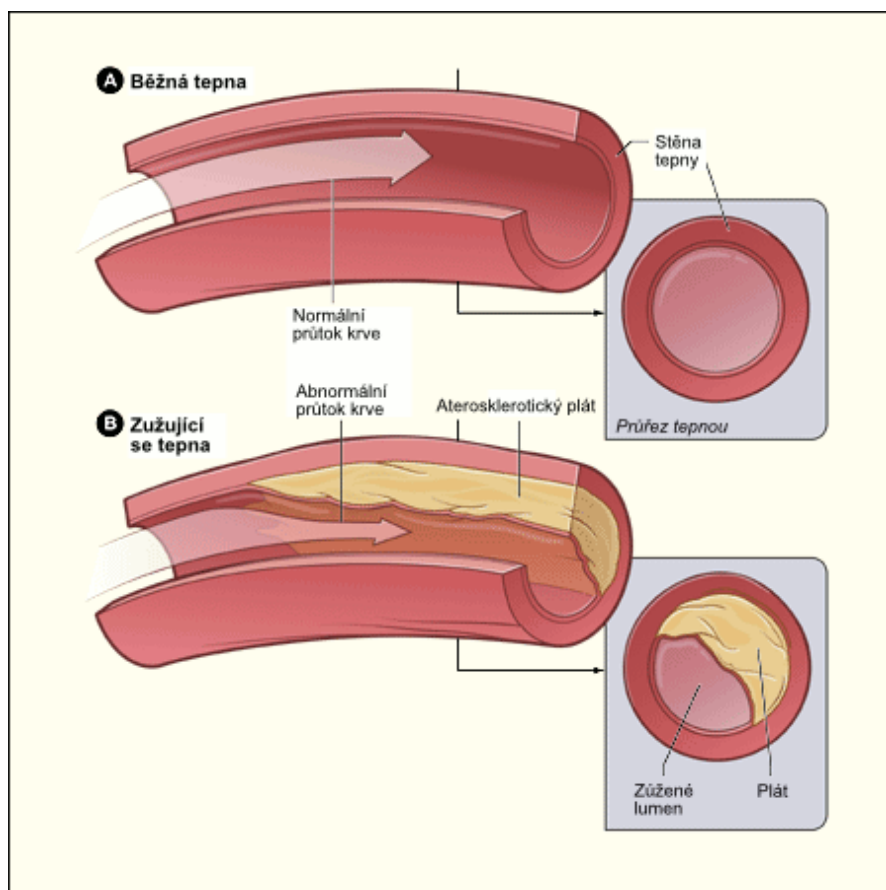
Ruptura aterosklerotického plátu způsobí vyplavení lipidů a tkáňového faktoru do lumen arterie, čímž se následně aktivuje koagulační kaskáda. Tento proces vede

společně s adherencí a agregací trombocytů ke vzniku trombózy. Ta se poté projeví náhlým uzavřením cévy (Češka, 1999; Keaney, 2000).

Mezi další možné komplikace patří krvácení do plátu, k němuž dochází při prasknutí cévy ve vaskularizovaném plátu, nebo krvácení z lumen arterie při ruptuře povrchu plátu. Následkem krvácení se plát zvětšuje a do periferie tepny se uvolňuje ateromová hmota. Tento proces se posléze manifestuje vznikem embolie (Šteiner, 2010).

Negativní vliv na povrch aterosklerotického plátu, jehož působením může dojít k prasknutí plátu, má tenká čepička (tloušťka  $< 65 \mu\text{m}$ ), hemodynamické působení krevního proudu na okraj plátu a aktivní biologické procesy uvnitř plátu (zánět, přítomnost metaloproteináz z makrofágů atd.) (Češka, 1999; Šteiner, 2010).

**Obrázek 2 - Ateroskleróza - porovnání arterií**



Převzato z [http://www.wikiskripta.eu/images/c/c2/Atherosclerosis\\_diagram.gif](http://www.wikiskripta.eu/images/c/c2/Atherosclerosis_diagram.gif)

[vid. 11-03-2015]

## **4.2 Cévní endotel**

### **4.2.1 Endotel za fyziologických podmínek**

Cévní endotel je definován jako souvislá vrstva buněk na rozhraní krevního řečiště a pevné tkáně cévní stěny nebo endokardu. Podle toho kde se endotelové buňky v těle nachází, mohou se navzájem lišit svojí stavbou, tvarem a do jisté míry i funkcí (Fejfar and Přerovský, 2002).

Za fyziologického stavu mají endotelové buňky funkci nejenom mechanické bariéry, ale představují metabolicky velmi aktivní tkáň, jenž aktivně reguluje cévní tonus a tedy i průtok krve, permeabilitu, ovlivňuje procesy koagulace a fibrinolýzy i reparační pochody. Na těchto dějích se podílí fyzikálně chemické vlastnosti endotelu a hlavně tvorba mnoha chemických substancí většinou lokálně a krátkodobě působících. Endotel se tak stává místem, kde dochází ke vzniku vazodilatačních (NO) i vazokonstrikčních působků (endoteliny), proliferaci stimulujících cytokinů (zejména PDGF). Dále je zde také tvořen například tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) i jeho inhibitor (PAI-1). Endotelové buňky jsou však mimo tuto sekreční aktivitu schopny vykonávat také degradaci některých vazoaktivních působků (např. bradykininu). Je tedy zřejmé, že pro organismus je nesmírně důležitá souhra a rovnováha mezi tvorbou chemotaktických, pro- a antiagregačních a pro- a antiproliferačních působků (Vrablík et al., 2011).

### **4.2.2 Role endotelu při zánětu**

Za fyziologických podmínek je za normální odpověď endotelu v případě poškození cévní stěny považován rozvoj zánětlivé reakce, přičemž její podstatou je především snaha udržet homeostázu. Tento proces zahrnuje strukturální reparaci a rovněž obnovu funkce cévní stěny. Skutečnost, že klíčovou roli zde hraje řada adhezních molekul a cytokinů, byla prokázána na myších, u nichž deficit adhezních molekul ze skupiny selektinů vedl k opakovaným infekcím (Frenette et al., 1996). Avšak z dlouhodobého hlediska není hyperreaktivita endotelu žádoucí. Jeho prozánětlivým působením je totiž spuštěna kaskáda dalších imunitních dějů vedoucí k poškození

tkáně, následné dysfunkci endotelu a v konečném důsledku k možné iniciaci aterosklerózy (Hill and Whitten, 1997).

K nejvýznamnějším mediátorům exprimovaným při zánětu endotelem patří:

### **Adhezní molekuly**

Za mediátory zajišťující pevnou vazbu lymfocytů a monocytů na endotel jsou považovány adhezní molekuly ze skupiny imunoglobulinů: **ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 a PECAM-1**. Jejich exprese jsou však kromě endotelových buněk schopny též buňky hladké svaloviny nebo makrofágy (Cybulsky et al., 1999; Dejana et al., 1997). Vzhledem k tomu, že byla prokázána spojitost zvýšené exprese adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 se zánětlivými působky (TNF, IL-1, přítomnost oxidovaných LDL částic atd.), je role těchto molekul v procesu rozvoje aterosklerózy nezpochybnitelná (Ahmad et al., 1998; Dustin et al., 1986). To však nelze s jistotou tvrdit u adhezní molekuly PECAM-1, u níž některými studiemi nebyly zaznamenány výrazné změny exprese během procesu aterosklerózy u lidí i zvířat (Davies et al., 1993; Nakashima et al., 1998).

Pokud jde o molekulu ICAM-1 (CD54), byly její zvýšené hladiny detekovány i u dalších zánětlivých stavů - ať už lokálních, nebo generalizovaných, jako je alergické astma, septický šok, autoimunitní choroby, zánětlivé a alergické kožní onemocnění, či infarkt. Exprese této molekuly může být podle dostupných dat naopak inhibována glukokortikoidy. Ve struktuře tohoto transmembránového glykoproteinu se rozlišuje pět extracelulárních imunoglobulinových částí, transmembránová doména a jedna malá intracelulární doména nesoucí na svém konci karboxylovou skupinu. Kromě doposud popisované tkáňové formy ICAM-1 je třeba zmínit také její další, netkáňovou, tzv. sérovou formu ICAM-1 (sICAM-1), jenž vzniká buďto proteolytickým štěpením, nebo je přímo produkována buňkami. Její přítomnost byla detekována v tělních tekutinách (mozkomíšni mok, synoviální tekutina, sliny, moč atd.) (Fotis et al., 2012; Scholz et al., 1996).



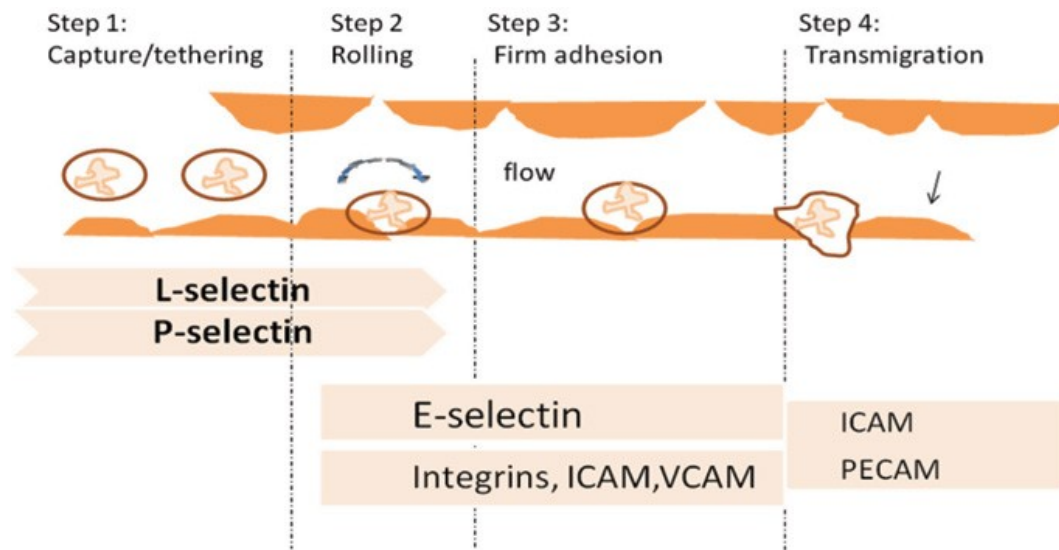
## Selektiny

Samotné adhezi a prostupu leukocytů přes endotel předchází interakce a následné těsné přilnutí obou typů buněk, jenž vyústí v tzv. "kutálení" (rolling) leukocytů po endotelu. Tento pohyb leukocytů umožňují adhezní molekuly ze skupiny selektinů: **E-**, **L-** a **P-selektin**. Jejich přítomnost je vázána na aktivované endotelové buňky, například molekuly E- a P- selektinu byly detekovány na endotelu aterosklerotických lézí. Pokud jde o syntézu jednotlivých typů selektinů, je vyvolána vždy konkrétními zánětlivými podněty. Takovým podnětem může být v případě molekuly P-selektinu působení histaminu nebo thrombinu, jenž se tedy v konečném důsledku podílí i na pohybu leukocytů po endotelu. Přítomnost adhezní molekuly P-selektinu však není limitována pouze na endotelové buňky, byla prokázána i v krevních destičkách (Jang et al., 1994; Wood et al., 1993; Yao et al., 1996).

## Zánětlivé cytokiny

Skupinu zánětlivých cytokinů představují mediátory vyplavované v reakci na zánět. Vzhledem k tomu, že jsou kromě endotelových buněk exprimovány též leukocyty, zejména aktivovanými monocyty a makrofágy, přispívají k udržení prozánětlivého procesu v cévě a k jeho dalšímu rozvoji. Pokud jde o endotelovou dysfunkci, za nejvýznamnější mediátory jsou považovány **Interleukin-8 (IL-8)** a **monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1)**, jenž se aktivně podílejí na prostupu leukocytů a monocytů do cévní stěny. MCP-1 může být kromě výše zmíněných buněk exprimován též cévními fibroblasty a hladkými svalovými buňkami, které mají rovněž vliv na rozvoj endotelové dysfunkce a s ní související komplikace. V rámci této skupiny však nelze opomenout ani cytokin **TGF- $\beta$** , jemuž bude věnována pozornost v další kapitole (Lukacs et al., 1995; Tracey and Cerami, 1992).

**Obrázek 3 - Prostup leukocytu endotelem za účasti zánětlivých mediátorů**



(Fotis et al., 2012)

**Krok 1:** zachycení (capture/tethering), **krok 2:** "kutálení" (rolling), **krok 3:** pevné přilnutí (firm adhesion), **krok 4:** prostup endotelem (transmigration)

### 4.2.3 Endotelová dysfunkce

Z hlediska etiologie je rozvoj aterosklerózy multifaktoriální, proto se nedá její patogeneze objasnit jediným faktorem. Je tedy pochopitelné, že byla formulována i řada teorií a hypotéz o vzniku aterosklerózy, přičemž za dvě nejrozšířenější jsou považovány: Lipidová hypotéza a Rossova hypotéza endotelového poškození (Češka, 1999).

Autorem **Lipidové hypotézy** je Rudolf Virchow, který již v roce 1856 vyslovil myšlenku, že primární příčinou aterosklerózy je infiltrace cévní stěny lipidy. Ve své teorii se zabýval především významným vlivem lipoproteinů o nízké hustotě - LDL částic na počáteční rozvoj aterosklerózy a důsledkem jejich zvýšené plazmatické koncentrace. Ta podle něj vede ke zvýšenému pronikání těchto částic přímo do endotelu arterií a k následné progresi onemocnění (Češka, 1999).

**Rossova hypotéza endotelového poškození** neboli první hypotéza o tom, že primární příčinou vzniku aterosklerotické léze je strukturální poškození endotelu, byla definována v polovině 70. let minulého století. Podle Rosse může dojít k poškození endotelu noxami různého původu (mechanického, chemického, fyzikálního, imunologického atd.), které následně spustí kaskádu aterosklerotických změn. V místě porušení souvislého nesmáčivého povrchu endotelu nastává adherence trombocytů uvolňujících mitogeny (např. destičkový růstový faktor - PDGF). Jejich působením pak dochází ke zvýšené proliferaci buněk hladkého svalstva, produkci extracelulární matrix, zvyšuje se také syntéza kolagenu, elastinu a proteoglykanů. Dalším stupněm progresu je aktivace monocytů a makrofágů, která vzhledem k jejich lokálnímu působení a produkci cytokinů, způsobí další rozvoj aterosklerotické léze (Vrablík et al., 2011).

Rossova hypotéza tedy považuje za primární inzult poškození endotelové výstelky, která se pak díky němu stává více propustná pro lipoproteinové částice. Akumulace lipidů v cévní stěně je vnímána jako sekundární (Vrablík et al., 2011).

Vzhledem k tomu, že ani jedna z výše zmíněných hypotéz však neobjasnila velmi komplexní proces rozvoje aterosklerózy, došlo ke sjednocení názorů obou teorií v tzv. **Jednotnou hypotézu**. Ta se nejvíce ztotožňuje se současnými představami o aterogenezi (Češka, 1999).

Endotelová dysfunkce je dnes popisována jako soubor změn endotelových funkcí, které nastávají ještě před začátkem aterosklerotických změn, přičemž je některými autory označována jako první stadium aterosklerózy. Jedná se tedy o funkční poškození endotelové výstelky, jehož spouštěčem může být řada mechanických, fyzikálně-chemických a imunologických faktorů. Za rozvoj endotelové dysfunkce a často i za komplikace s ní související (ischemická choroba srdeční - ICHS, ischemické onemocnění dolních končetin - ICHDK, cévní mozková příhoda - CMP) je zodpovědná souhra řady faktorů, jež jsou známy jako rizikové faktory aterosklerózy (Vrablík et al., 2011).

Je dokázáno, že pravděpodobnost rozvoje aterosklerózy je tím vyšší, čím je přítomno více těchto rizikových faktorů (Šteiner, 1994).

Výše zmíněné **rizikové faktory aterosklerózy** dělíme na neovlivnitelné (endogenní) a ovlivnitelné (exogenní).

Mezi **neovlivnitelné** rizikové faktory patří:

- věk
- pohlaví
- genetická faktory
- rasové faktory

### **Věk**

Věk patří neodmyslitelně mezi rizikové faktory pro rozvoj aterosklerózy, přičemž platí, že s věkem se pravděpodobnost manifestace onemocnění zvyšuje. Přestože časné léze se začínají rozvíjet už v dětství, klinické projevy aterosklerózy jsou typické až v dospělosti. Za rizikový věk se u mužů považuje 45 let a více, u žen 55 let a více (Svačina, 2010; Šteiner, 2010).

### **Pohlaví**

Je prokázán fakt, že muži mají výrazně vyšší riziko rozvoje aterosklerózy než ženy do menopauzy. U žen po menopauze bez substituční léčby estrogeny se však riziko zvyšuje. Za příčinu tohoto jevu je považován protektivní vliv estrogenů a jeho souvislost s vyššími koncentracemi HDL cholesterolu (high density lipoproteins - lipoproteiny o vysoké hustotě) u ženského pohlaví (Češka 2005; Svačina 2010).

### **Genetické faktory**

Přestože existuje velké množství genů, které mohou ovlivnit proces aterogeneze, u daného jedince mohou mít rozhodující význam jen některé z nich. Ve většině případů je rodinná dispozice k rozvoji aterosklerózy a ischemické choroby srdeční podmíněna genetickou poruchou metabolismu lipoproteinů. Takovou

poruchou je například mutace v genu pro LDL receptor, jejímž následkem je vysoká hladina krevních lipidů v krvi (Svačina, 2010; Šteiner, 2010).

### **Rasové faktory**

Mezi skupinu neovlivnitelných rizikových faktorů pro rozvoj aterosklerózy řadí někteří autoři i faktory rasové, které vychází především ze studií v USA. Vzhledem k tomu, že lze však velmi těžko odlišit vzájemné působení vlivu prostředí a vrozené dispozice u různých skupin obyvatelstva, není otázka rasového vlivu na rozvoj aterosklerózy jednoznačně vyřešena (Češka, 1999).

Do druhé skupiny patří podle různých autorů řada **ovlivnitelných** faktorů rozvoje aterosklerózy, přičemž mezi ty nejdůležitější řadíme:

- dyslipidémie
- kouření
- arteriální hypertenze
- diabetes mellitus
- obezita

### **Dyslipidémie**

Za dyslipidémií je v dnešní době považována jednak zvýšená hladina celkového a LDL cholesterolu, hypertriacylglycerolémie, ale také snížená hladina HDL cholesterolu a změna velikostí LDL částic. Jak již bylo zmíněno výše, za vysokou hladinu cholesterolu v séru zodpovídají genetické faktory. Mimoto je však také výsledkem nesprávných stravovacích návyků (nadměrná spotřeba živočišných tuků, jednoduchých cukrů a naopak nízký příjem vlákniny, či vysokomolekulárních cukrů) (Svačina, 2010; Šteiner, 2010).

## **Kouření**

Kouření cigaret má významný vliv na rozvoj aterosklerózy. Vzhledem k tomu, že způsobuje endotelovou dysfunkci, vede ke zvýšenému cévnímu tonu, snížené hladině HDL cholesterolu, působí prooxidačně na LDL částice a zvyšuje hladinu fibrinogenu, je kouření spojováno se zvýšeným výskytem ischemické choroby srdeční i úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění (Svačina, 2010; Widimský, 2002).

## **Arteriální hypertenze**

Za jeden z nejzávažnějších rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění je považována arteriální hypertenze s hodnotou krevního tlaku nad 140/90 mm Hg. Endotelová dysfunkce, zvýšená propustnost cévní stěny pro lipoproteiny, zvýšená tvorba endotelinu, zvýšená přilnavost leukocytů k cévní stěně - to vše jsou možné důsledky vysokého krevního tlaku (Svačina, 2010; Widimský, 2002).

## **Diabetes mellitus**

S předčasnou manifestací aterosklerózy je spojován také diabetes mellitus a porucha glukózové tolerance. Vlivem hyperglykémie dochází totiž k tvorbě modifikovaných makromolekul, které jsou následně zodpovědné za zvýšenou produkci cytokinů v endotelových buňkách (Češka, 2005).

## **Obezita**

Pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění je velmi důležitým faktorem distribuce tuku, přičemž se za nejrizikovější považuje mužský typ obezity s velkým množstvím abdominálního tuku. Obezita představuje jednak samostatný nezávislý rizikový faktor ICHS, může se však také podílet při manifestaci dalších významných rizikových faktorů (arteriální hypertenze, diabetes mellitus 2.typu, inzulinová rezistence) (Svačina, 2010).

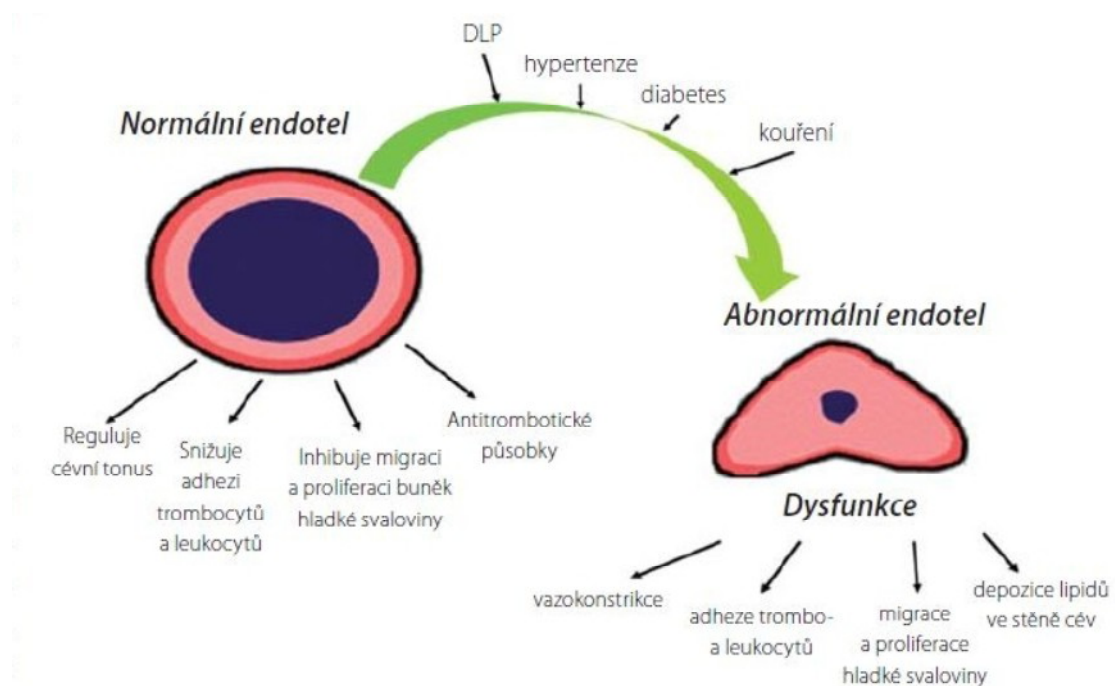
## Další rizikové faktory

Kromě výše zmíněných můžeme řadit mezi rizikové faktory také vysokou hladinu fibrinogenu v séru, jež se uplatňuje v procesu trombogeneze. Dále například metabolický syndrom, zvýšenou plazmatickou hladinu homocysteinu vedoucí k rozvoji předčasné aterosklerózy či nedostatek pohybu (Češka, 1999; Svačina, 2010).

Obzvlášť za nebezpečnou se považuje u jednotlivce kombinace několika rizikových faktorů současně. Jejich vliv se totiž v tom případě nesčítá, ale násobí (Češka, 1999).

Následkem funkčně poškozeného endotelu je zvýšená propustnost cévní stěny a vznik nerovnováhy mezi vazoaktivními mechanismy a hemokoagulačními působky, jež vede k převaze vazospastických, protrombotických a aterogenních mechanismů (Vrablík et al., 2011).

**Obrázek 4 - Vznik a důsledky dysfunkčního endotelu**



(Vrablík et al., 2011)

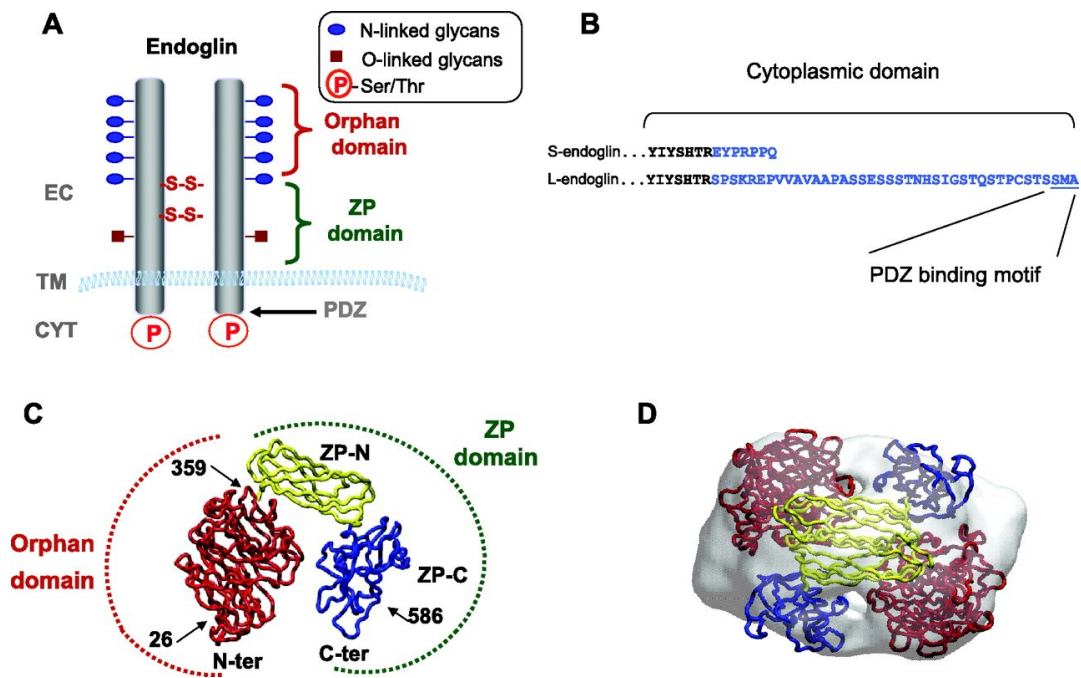
## **4.3 Endoglin**

### **4.3.1 Struktura endoglinu, jeho isoformy a exprese**

Endoglin (ENG, TGF- $\beta$ RIII), přídatný receptor pro TGF- $\beta$ , který je označován též jako CD105, je řazen do rodiny proteinů zona pellucida (ZP). Společným znakem proteinů této rodiny je ZP doména v extracelulární oblasti proteinu skládající se z 260 aminokyselin. Ve struktuře endoglinu se rozlišuje velká extracelulární doména tvořená 561 aminokyselinami (AMK), jedna hydrofobní transmembránová doména a krátká intracelulární doména. V NH<sub>2</sub> terminální oblasti extracelulární domény se nachází pět N-vazebných glykosylačních míst, dále je tu jedno O-vazebné glykosylační místo v blízkosti membrány. Co se týče intracelulární domény endoglinu, jsou zde obsaženy serinové a threoninové zbytky, které podléhají fosforylaci (aktivaci) prostřednictvím TGF- $\beta$  receptorových kináz. Za klíčovou je dle hypotézy považována serinová fosforylace endoglinu, která představuje rozhodující proces TGF- $\beta$  signalizační kaskády, podílí se totiž na regulaci aktivit jednotlivých receptorů. Endoglin jakožto homodimerní vysoce glykosylovaný protein je tvořen dvěma podjednotkami o molekulové hmotnosti 95 kDa, které jsou spojeny dvěma disulfidickými můstky (Koleva et al., 2006; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Nachtigal et al., 2012)



**Obrázek 5 - Struktura endoglinu**



(Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010 )

**A:** EC - extracelulární doména, TM - transmembránová doména, CYT - cytoplazmatická doména, orphan domain - orfan doména, ZP domain - ZP doména typická pro proteiny rodiny zona pellucida, PDZ - PDZ oblast intracelulární domény, díky níž dochází k interakci endoglinu s proteiny, P - místa podléhající fosforylaci (aktivaci), N-linked glycans - N-vazebná glykosylační místa, O-linked glycans - O-vazebné glykosylační místo

**B:** Cytoplazmatická doména - aminokyselinová sekvence isoform L- a S- endoglinu včetně PDZ vazebné oblasti

**C:** Orfan doména - zahrnuje aminokyselinové zbytky Glu26-Ile359 (červeně), ZP doména - obsahuje aminokyselinové fragmenty Gln360-Gly586. ZP-N a ZP-C subdomény jsou naznačeny žlutě a modře.

**D:** Mapa elektronové hustoty (šedá barva) - model dimerní struktury endoglinu

Byly rozpoznány dvě isoformy endoglinu lišící se sestřihem neboli délkou aminokyselinové sekvence svých intracelulárních domén. Rozlišuje se tedy převládající L-isoforma endoglinu (long) tvořená 47 aminokyselinami a S-isoforma endoglinu (short), jejíž intracelulární doménu tvoří pouze 14 aminokyselin. Isoformy endoglinu však nejsou rozdílné jen z hlediska strukturálního (Blanco et al., 2008), ale liší se

i na úrovni fosforylace a svou schopností regulovat TGF- $\beta$  signalizaci. Obě jsou přitom schopny vázat svůj ligand (Nachtigal et al., 2012).

Kromě výše uvedeného byly také objeveny rozdílné efekty těchto dvou isoferem. Dostupná data totiž poukazují na jejich protichůdné působení například v procesu angiogeneze, podle nichž L-isoforma endoglinu vykazuje proangiogenní účinek, zatímco S-isoforma endoglinu účinek antiangiogenní (Perez-Gomez et al., 2005).

Endoglin (ENG) je kódován genem, který se u lidí lokalizuje na chromozomu 9 (9q34ter) a je tvořen 15 exony, z nichž 13 kóduje extracelulární doménu proteinu. Důsledkem mutace tohoto genu dochází ke vzniku hereditární hemoragické teleangiektázie typu I (HHT-1). Jedná se o autosomálně dominantní onemocnění projevující se dilatací postkapilárních cév a arterio-venózními malformacemi (Fernandez-Ruiz et al., 1993).

Bylo prokázáno, že endoglin je exprimován hlavně endotelovými buňkami, dále pak buňkami hladké svaloviny, srdečními fibroblasty a makrofágy, přičemž za zdroj jeho největší exprese jsou považovány proliferující endotelové buňky nacházející se v tkáních, v nichž probíhá angiogeneze (např. při hojení ran, při ateroskleróze, po infarktu myokardu). Jeho zvýšená exprese byla dále zaznamenána v hladkých svalových buňkách lidských cév s aterosklerotickými pláty a také během přeměny monocytů v makrofágy (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Co se však týče průkaznosti endoglinu v myší aortě, byl pozorován pouze na endotelu aorty (Pospisilova et al., 2006).

#### **4.3.2 Endoglin - pomocný TGF- $\beta$ RIII**

Endoglin jakožto receptor III pro TGF- $\beta$  neboli pomocný TGF- $\beta$ RIII je nedílnou součástí signalizační kaskády transformujícího růstového faktoru- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Rathouska et al., 2011).

Transformující růstový faktor- $\beta$  je definován jako multifunkční cytokin účastnící se řady důležitých procesů, mezi které patří regulace proliferace, diferenciací, migrace, tvorba extracelulární matrix a také přežívání různých typů lidských buněk. Podle

dostupných dat byly v savčích buňkách rozpoznány tři isoformy tohoto růstového faktoru - TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3 (Lebrin et al., 2005; Strasky et al., 2011).

Konečný efekt TGF- $\beta$  na proliferaci endotelových buněk může být v závislosti na jeho hladinách jak inhibiční, tak stimulační. Zatímco nízká hladina TGF- $\beta$  bude proliferaci a migraci endotelových buněk stimulovat, vysoké hladiny TGF- $\beta$  budou mít na tento proces naopak inhibiční vliv. Vzhledem k tomu, že tento růstový faktor je produkován v neaktivní formě, je nutné jej před vazbou na své specifické receptory zaktivovat prostřednictvím proteáz nebo trombospondinu. Ze zmíněných specifických receptorů jsou za nejvýznamnější považovány serin/threonin kinázové receptory typu I a typu II podílející se na TGF- $\beta$  signalizaci. Konkrétně se jedná o jeden TGF- $\beta$  receptor typu II a dva různé TGF- $\beta$  receptory typu I - activin receptor like kináza 1 (ALK1) a activin receptor like kináza 5 (ALK5) (Lebrin et al., 2005).

Přestože funkce endoglinu je pro TGF- $\beta$  signalizaci nezbytná, je označován jako doplňkový receptor. S vysokou afinitou váže TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 3 cytokin a v průběhu signalizační kaskády se pojí s TGF- $\beta$  receptorem typu II (TGF $\beta$ RII), čímž reguluje jeho aktivitu. Mimoto se podílí na regulaci aktivity i obou receptorů typu I - ALK1 i ALK5 (Barbara et al., 1999; Cheifetz et al., 1992; Lebrin et al., 2005).

Spouštěčem TGF- $\beta$  signalizace je vazba ligandu (TGF- $\beta$ ) na TGF- $\beta$  receptor typu II a aktivace (fosforylace) TGF- $\beta$  receptorů typu I. Následně jsou signály převedeny z membrány do jádra buňky intracelulárními signálními proteiny, které jsou označovány jako SMAD proteiny (Lebrin et al., 2005; Nachtigal et al., 2012).

TGF- $\beta$  signalizace zprostředkovaná fosforylací receptoru ALK1 a převodem signálu pomocí SMAD1 a SMAD5 vede ke stimulaci proliferace a migrace endotelových buněk a je v konečném důsledku zodpovědná za angiogenezi. Opačný efekt - tedy inhibici proliferace a migrace endotelových buněk způsobí fosforylace receptoru ALK5 a převod signálu prostřednictvím SMAD2 a SMAD3. Tato kaskáda tak vede k vytvoření klidového endotelu (Lebrin et al., 2005).

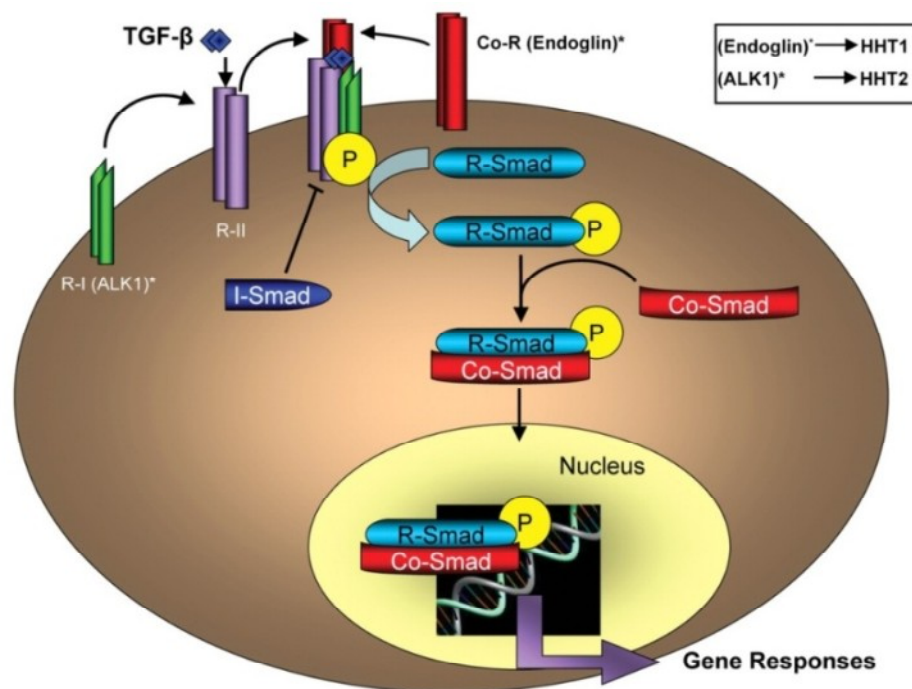
Tuto teorii potvrdila studie s endotelovými buňkami, u nichž se záměrně vyřadil endoglin z funkce. Tím byla narušena signalizace přes ALK1 a v konečném důsledku

došlo k zastavení růstu a migrace těchto buněk. Současně se tak potvrdilo také inhibiční působení kaskády prostřednictvím ALK5 (Goumans et al., 2002).

Endoglin (TGF- $\beta$ RIII) tedy svou schopností interagovat s ostatními TGF- $\beta$  receptory a signálními intracelulárními proteiny (SMAD) ovlivňuje TGF- $\beta$  signalizační dráhy (Nachtigal et al., 2012).

Na účast endoglinu v procesu aterogeneze poukazují výsledky dostupných studií, podle nichž je exprese endoglinu, TGF- $\beta$ RII i TGF- $\beta$ RI zaznamenána v lidských aterosklerotických cévách. Naopak v cévách, ve kterých tento proces neprobíhá, byla jejich exprese nízká (Strasky et al., 2011).

**Obrázek 6 - TGF- $\beta$  signální dráha**



(Fernandez-L. A. et al., 2006)

Účast endoglinu na TGF- $\beta$  signální transdukcii: TGF- $\beta$  se váže na TGF- $\beta$  receptor typu II (T $\beta$ RII), navázaný ligand (TGF- $\beta$ ) ovlivní touto vazbou specifický TGF- $\beta$  receptor typu I, vytvoří se komplex těchto dvou typů receptorů - T $\beta$ RII a T $\beta$ RI a následně dochází k aktivaci T $\beta$ RI. T $\beta$ RII a aktivovaný T $\beta$ RI fosforylují serin/threoninové zbytky cytosolické domény endoglinu. Za přenos signálu z membrány do jádra buňky jsou zodpovědné intracelulární signální proteiny - SMAD proteiny. Rozlišují se tři rozdílné typy těchto SMAD proteinů: R-SMADs - receptory regulované proteiny, Co-SMADs - komediátorové proteiny a I-SMADs - inhibiční SMAD proteiny. R-SMADs jsou fosforylovány (aktivovány) receptorem typu I (ALK1 nebo ALK5) a interagují s Co-SMADs za vzniku komplexu R-SMAD/Co-SMAD, jenž translokuje do jádra. Jádro je tedy místem, kde dochází k regulaci transkripční aktivity řady cílových genů. Důsledkem mutace genu kódujícího endoglin je vznik hereditární hemoragické teleangiektázie typu I (HHT-1). Mutace TGF- $\beta$  receptoru typu I, a to konkrétně podtypu ALK-1, je příčinou vzniku hereditární hemoragické teleangiektázie typu II (HHT-2). Ta se vyznačuje abnormální tvorbou cév a krvácivými stavy (Bobik, 2006; Fernandez-L. A. et al., 2006; Shi and Massagué, 2003).

### 4.3.3 Role endoglinu v procesu aterogeneze

Jak již vyplývá z výše uvedeného, endoglin má důležitý význam pro kardiovaskulární systém. Nejenže se podílí na zachování cévní homeostázy, vývoji srdce, srdečních chlopní a účastní se procesu angiogeneze (Qu et al., 1998), kromě toho je také spojován s řadou metabolických a kardiovaskulárních onemocnění, mezi

něž patří hypertenze, preeklampsie či ateroskleróza (Conley et al., 2000; De Vivo et al., 2008; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Většina dostupných dat se shoduje na tvrzení o antiaterogenním účinku TGF- $\beta$ 1 cytokinové kaskády, a tedy předpokládá, že endoglin jakožto regulátor TGF- $\beta$  signalizace, může mít na účinek tohoto cytokinu vliv. Přesto stále není otázka role endoglinu v procesu aterogeneze definitivně vyjasněna (Mallat and Tedgui, 2002; Nachtigal et al., 2012).

Úloha endoglinu v procesu aterogeneze je však jistě významná z hlediska vlivu tohoto receptoru na produkci a aktivitu endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS). Jedná se o klíčový enzym v produkci NO endotelem, jenž mimo jiné reguluje angiogenezi a též kardiovaskulární homeostázu. Jeho působením tedy vzniká NO se svými vasodilatačními účinky na cévy, který se dále podílí na udržení anti-trombotického, anti-proliferativního a anti-apoptického prostředí v cévní stěně. Hypoxie, růstové faktory, některé hormony a další extracelulární podněty jsou dle dostupných dat považovány za regulátory exprese tohoto enzymu, přičemž s jejím poklesem je spojován rozvoj endotelové dysfunkce (Nachtigal et al., 2009; Nachtigal et al., 2012; Santibanez et al., 2007).

Byla doložena teorie, že endoglin svým působením zvyšuje expresi eNOS v endotelových buňkách za pomoci zvýšeného množství SMAD2 proteinů. Stejně tak byl potvrzen i fakt, že v těch samých buňkách s deficitem endoglinu bylo množství tohoto enzymu významně sníženo. Endoglin tedy plní funkci regulátoru nejen vazodilatace závislé na vzniklém NO, ale také exprese a aktivity eNOS (Nachtigal et al., 2009; Santibanez et al., 2007; Toporsian et al., 2005).

#### **4.3.4 Role sérového endoglinu v procesu aterogeneze**

Pokud jde o úlohu endoglinu v procesu aterogeneze, je třeba odlišit od tkáňové transmembránové formy tohoto glykoproteinu, o níž se pojednávalo až doposud, formu netkáňovou, tzv. sérovou (solubilní).

Ze strukturálního hlediska představuje sérovou formu endoglinu (sENG) extracelulární doména jeho tkáňové formy, jenž se do cirkulace uvolnila

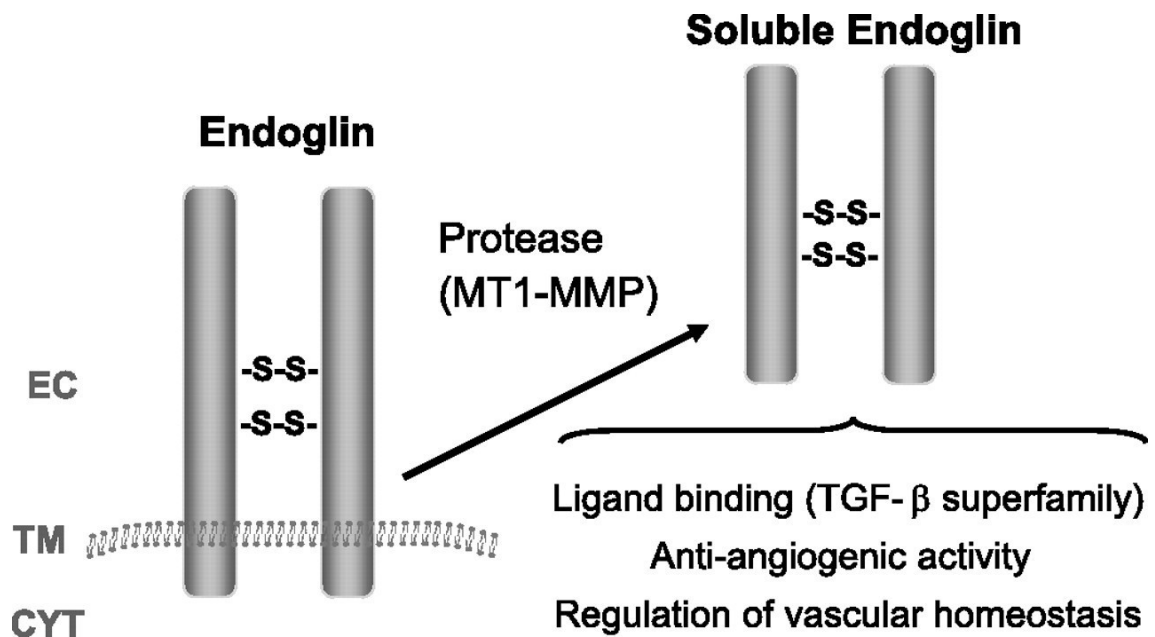
prostřednictvím membránově vázané metaloproteinázy (MMP-14) (Hawinkels et al., 2010).

Existuje řada onemocnění souvisejících se sérovým endoglinem, přičemž za hlavní nemoc s jeho zvýšenými hladinami je považována preeklampsie, závažný stav vznikající v těhotenství. K projevům tohoto onemocnění patří dále hypertenze a endotelová dysfunkce (Venkatesha et al., 2006). Další nemocí, u které byly prokázány zvýšené hladiny sENG je ateroskleróza (Blann et al., 1996).

Účinky sérové formy endoglinu jsou často považovány za protichůdné vzhledem k působení jeho tkáňové formy (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Na základě tohoto tvrzení byla zkoumána spojitost sENG s endotelovou dysfunkcí, a tedy poškozením kardiovaskulárního systému u pacientů s hypertenzí a cukrovkou, či vztah angiogenního účinku sENG k nádorovému bujení (Blazquez-Medela et al., 2010; Hawinkels et al., 2010;).

Podle řady literárních zdrojů je tedy sérový endoglin označován za jakýsi marker patologických stavů kardiovaskulárního systému, například aterosklerotického procesu či kardiovaskulárních příhod (Blaha et al., 2008; Ikemoto et al., 2012). Je však třeba brát v úvahu fakt, že hladiny volného sENG mohou být v průběhu onemocnění ovlivňovány různými příčinami. Jednou z nich může být vazba sENG na cirkulující TGF- $\beta$  cytokin a následná tvorba komplexů vyplývající z průběhu signalizační kaskády. Rovněž regulace odštěpování endoglinu z jeho tkáňové formy může mít vliv na hladiny sENG v průběhu nemoci (Hawinkels et al., 2010; Li et al., 2000). Klinický dopad těchto dějů v průběhu endotelové dysfunkce/aterosklerózy je v současnosti předmětem výzkumů.

**Obrázek 7 - Vznik sérového ENG odštěpením z jeho tkáňové formy**



(Lopez-Novoa & Bernabeu, 2010 )

Tkáňová forma endoglinu: EC - extracelulární doména, TM - transmembránová doména, CYT - cytoplazmatická doména

Protease (MT1-MMP) neboli (MMP-14) - membránově vázaná metaloproteináza, díky níž se z tkáňové formy endoglinu odštěpuje jeho sérová forma a vzniká tak solubilní endoglin

Funkce sérového endoglinu: vazba s TGF- $\beta$ , inhibice angiogeneze, regulace cévní homeostázy



## 5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo popsat a kvantifikovat expresi zánětlivých markerů - ICAM-1 a P-selektinu v aortě transgenních myší s vysokými hladinami lidského sérového endoglinu (sledovaná skupina) po podávání speciální diety s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Současně měla být sledována exprese těchto markerů u transgenních myší s velmi nízkými (nedetekovatelnými) hladinami lidského sérového endoglinu (kontrolní skupina), které byly rovněž krmeny touto dietou. Pro účely hodnocení a porovnání exprese zadaných markerů u těchto dvou skupin myší byla zvolena Western blot analýza. Pro účely zhodnocení vlivu diety na hladiny celkového cholesterolu u kontrolní i sledované skupiny byla využita biochemická analýza.

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Bylo provedeno imunoanalytické stanovení sENG v odebrané krvi pomocí ELISA analýzy, přičemž na základě jejího vyhodnocení (hodnoty hladin lidského solubilního endoglinu) byly zkoumané myši rozděleny do dvou skupin - sledovaná a kontrolní skupina. Po odběru krve na konci experimentu (po podání diety) byla v plazmě obou skupin myší provedena biochemická analýza se stanovením hladin celkového cholesterolu.

Vzorky myších aort byly nejprve homogenizovány s inhibitory proteáz a fosfatáz, aby se zabránilo rozkladu proteinů, s nimiž se nadále pracovalo. Získaný homogenát byl poté zkoumán Western blot analýzou za účelem detekce specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny vzorku homogenátu. K separaci proteinů dle jejich molekulové hmotnosti byla použita gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE metoda), přičemž jednotlivé proteiny vytvořily v gelu tzv. bandy (zóny). Separované proteiny byly následně přeneseny "přebíjeny" pomocí blotovacího zařízení z gelu na povrch polyvinyliden difluoridové membrány (PVDF). Před vlastní detekcí konkrétního proteinu pomocí specifické protilátky bylo nutné membránu zablokovat, aby nemohlo dojít k pozdější nesprávné (nespecifické) vazbě protilátky, která je též proteinem. Membrána má totiž schopnost vázat na svůj povrch nesespecificky veškeré proteiny. Poté byla přes noc provedena inkubace s primární protilátkou - specifickou protilátkou proti určitému proteinu. Další den byly membrány promyty v TBS-T. Následovala inkubace se sekundární protilátkou neboli protilátkou proti primární protilátce značenou křenuvou peroxidázou, díky níž je umožněna detekce navázání primární protilátky na hledaný protein. Membrány byly opět promyty. Proteiny na membráně ani protilátky na ně navázané však nejsou samy o sobě viditelné. Vizualizaci výsledku reakce „detekovaný protein-primární protilátka-sekundární protilátka" umožňuje detekční systém. Jde obvykle o enzym schopný po přidání specifického substrátu katalyzovat reakci. V případě chemiluminiscenční detekce, jež byla pro tento experiment využita, vzniká v místě výskytu proteinu světlo, které lze detekovat přiložením RTG filmu na membránu v temné komoře. Pro kvantifikaci výsledků (vyvolaných RTG filmů) byla zvolena denzitometrická metoda. Pruhy bandů byly

naskenovány a semikvantitativně vyhodnoceny. Závěrem bylo provedeno statistické vyhodnocení získaných výsledků - byly porovnány hladiny exprese zkoumaného proteinu (markeru) u sledovaných skupin a byly formulovány závěry plynoucí z tohoto experimentu.

## **6.1 Materiál - Použitá zvířata**

Jak již bylo výše zmíněno, k experimentu byly použity dvě skupiny myší - sledovaná a kontrolní skupina. V obou případech šlo o samice transgenních myší kmene CBAx57BL/6J získané z pracoviště University of Salamanca ve Španělsku (Genetically Modified Organisms Generation Unit). Těmto zvířatům byla pro vědecké účely do organismu inkorporována genetická informace pro expresi lidského solubilního endoglinu, pracovalo se tedy s geneticky modifikovanými organismy. Sledovanou skupinu představovaly samice těchto transgenních myší exprimující ve vysokých hladinách lidský solubilní endoglin (skupina Sol-Eng<sup>+</sup>, hladiny v průměru 3480 ng/ml). Tato šestiměsíční zvířata byla po dobu následujících tří měsíců krmena speciální dietou, jež byla tvořena z 1,25% cholesterolem a ze 40% tukem (Research Diets, Inc, USA). Kontrolní skupinu představovaly stejně staré samice, které rovněž dostávaly po stanovenou dobu tuto speciální dietu, u nich byl však solubilní endoglin detekován ve velmi nízkých (nedetekovatelných) hladinách. Obě skupiny se tedy lišily pouze hladinami tohoto markeru. Myši byly chovány za konstantní teploty a vlhkosti a byl dodržován cyklus 12 hodin světlo/12 hodin tma. Po celou dobu experimentu měly volný přístup k vodě. Veškerá manipulace s těmito zvířaty byla provedena v souladu se směrnicí Evropské unie (86/609/EEC) o ochraně zvířat využívaných pro vědecké účely, rovněž všechny protokoly byly schváleny etickou komisí na ochranu zvířat proti týrání Farmaceutické fakulty, Univerzity Karlovy v Praze, a výborem pro bioetiku na výše zmíněném pracovišti ve Španělsku.

Rozdělení zvířat do 2 skupin:

- skupina 1: **n=7** - kontrolní skupina myší s nízkými hladinami lidského sENG
- skupina 2: **n=5** - sledovaná skupina myší vysoce exprimující lidský sENG

## **6.2 Imunoanalytické stanovení - ELISA analýza**

U sledovaných transgenních myší byly provedeny odběry krve a následně kvantitativní stanovení plazmatické koncentrace lidského solubilního endoglinu. Pro toto měření byla zvolena imunoanalytická metoda s využitím tzv. ELISA analýzy, a to konkrétně stanovovací souprava Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA), stanoveno pracovníky KBLV. Na základě výsledků této analýzy bylo 12 zkoumaných transgenních myší rozděleno do dvou skupin podle rozsahu exprese lidského solubilního endoglinu. Myši vysoce exprimující tento marker představovaly sledovanou skupinu, která byla porovnávána s kontrolní skupinou, do níž patřily myši s nízkými plazmatickými hladinami tohoto markeru.

## **6.3 Biochemická analýza**

U obou skupin transgenních myší byly enzymaticky stanoveny koncentrace celkového cholesterolu s využitím diagnostické soupravy (Lachema, Czech Republic) a byla provedena spektrofotometrická analýza (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden). Hodnoty cholesterolu byly naměřeny při vlnové délce 510 nm, hodnoty triglyceridů byly stanoveny při vlnové 540 nm. Získané výsledky biochemické analýzy byly porovnávány mezi oběma skupinami sledovaných myší, viz kapitola Výsledky.

## **6.4 Pracovní postup pro Western blot analýzu**

### **6.4.1 Gelová elektroforéza**

#### **Zpracování vzorků**

Vzorky myších aort byly získány odebráním ze zkoumaných transgenních myší a následně byly zhomogenizovány v RIPA lyzačním pufru s inhibitory proteáz a fosfatáz, aby bylo zabráněno rozkladu bílkovin. Dále se již pracovalo s jejich homogenáty.

#### **Příprava gelů**

Pro přípravu 1 gelu se použilo 1 kratší a 1 delší sklo, u nichž se před použitím odstranila mastnota a zbytkové nečistoty. Na delší sklo se položilo sklo kratší a takto

připravená skla se zasunula do zeleného stojánku s následným uzavřením dvířek. Zelený stojánek se umístil do průhledného stojánku tak, aby byla sestava zarovnaná s podložkou a aby kratší sklo směřovalo dopředu. Následně se pomocí destilované vody důkladně ověřilo, zda sestavená aparatura těsní. Touto kontrolou se zabránilo případnému pozdějšímu vytékání gelu. Dle molekulové hmotnosti sledovaného proteinu se zvolila příslušná koncentrace separačního gelu (Separating gel), jež se připravil postupným přidáním daných látek dle rozpisu pro jednotlivé koncentrace. V případě adhezní molekuly ICAM-1 se připravoval 8% gel (84kDa), pro P-selektin byl použit 10% gel (85-110kDa), viz Tabulka 1. Po přidání TEMEDu začal gel polymerizovat, bylo tedy třeba pracovat co nejrychleji. Pomocí pipety se gel aplikoval do výše asi jedné poloviny vrchního zeleného trámu stojánku. Následně byl po celé ploše převrstven izobutanolem saturovaným destilovanou vodou za účelem zamezení přístupu vzduchu, a tedy odstranění vzduchových bublin. Hladina gelu se díky tomu po celé délce zarovнала s okrajem skel. Gel se nechal polymerizovat minimálně 30 minut až hodinu, poté se vylil izobutanol a separační gel se důkladně promyl destilovanou vodou. Zbytky vody byly odstraněny gázou. Následně se připravil dle rozpisu krycí gel (Stacking gel), který byl pro všechny koncentrace separačního gelu vždy stejně koncentrovaný. Připravený krycí gel se ihned pipetou po celé délce skla nanasl na vrstvu separačního gelu tak, aby opět nebyly přítomné vzduchové bubliny. Do gelu se vložil hřebínek a gel se nechal zatuhnout, přičemž bylo nutné průběžně doplňovat pipetou krycí gel po stranách, aby se zamezilo přístupu vzduchu. Gel tuhl přibližně 1 hodinu. Jako pomůcka při posouzení dostatečného ztuhnutí gelu posloužila použitá špička z nanášení, která se nechala stát v kádince s přebytečným gelem.

### **Příprava vzorků**

Vzorky se připravily až během tuhnutí krycího gelu z toho důvodu, aby byly po co nejdelší dobu v chladu. Připravily se smísením vzorku se 7  $\mu$ l vzorkového pufru v mikrozkuhavce. Směs se promísila na třepačce, stočila na centrifuze a nechala se povařit 5 minut v termostatu při teplotě 95 °C. Takto připravené vzorky se poté nechaly ve stojanu vychladnout na laboratorní teplotu.

**Tabulka 1 - Příprava gelů**

	Separační gel		Krycí gel
	8% (ml)	10% (ml)	5% (ml)
Milli-Q voda	10,800	9,800	6,150
Separating gel buffer	5,000	5,000	-
Stacking gel buffer	-	-	2,500
Acrylamide-Bis Solution	4,000	5,000	1,250
10% SDS	0,200	0,200	0,100
10% APS	0,060	0,060	0,030
TEMED	0,030	0,030	0,015

Pozn. množství je vždy uvedeno pro 2 minigely

### **Nanesení vzorků a elektroforéza**

Po dostatečné polymerizaci krycího gelu se hřebínek opatrně vysunul a zkontrolovala se kvalita vzniklých jamek pro nanášení vzorků. Jamky se vypláchly elektroforetickým pufrem. Skla se vyjmula ze stojánku a vložila se do elektroforetické vany tak, aby kratší sklo směřovalo směrem dovnitř (k těsnění). Provedla se kontrola, zda takto sestavená aparatura dobře těsní nalitím elektroforetického pufru do vzniklého prostoru vany. V případě, že pufr pod skly neprotékal, mohly se začít nanášet vzorky.

Do první jamky v gelu se nanasl pipetou marker molekulových hmotností o objemu 5  $\mu$ l, do dalších jamek se pak již pipetovaly vzorky o objemech 10  $\mu$ l. Jamky se plnily ve směru zleva doprava. Po nanesení vzorků se elektroforetický pufr doplnil po rysku na elektroforetické vaně. Vana se uzavřela víkem s elektrodami, které se zasunuly do zdroje.

Na přístroji se nastavily dané podmínky pro elektroforetickou separaci proteinů:

- konstantní napětí - 200 V
- maximální proud - 15mA/gel
- doba elektroforézy - 1h 15 min

Spustila se elektroforéza. K zajištění nízké teploty v průběhu elektroforézy se vana obložila ledy.

Po uplynulém čase/po vyjetí čela, jež je viditelné díky bromfenolové modři vzorkového pufru se zdroj vypnul. Skla se vydělala z aparatury a opatrně se oddělila od sebe. Ideálně zůstal po oddělení gel na větším skle. Gel se očistil, nařízl po stranách a přenesl do misky s pufrům 2 (transferový pufr), kde se od skla odlepil.

#### **6.4.2 Blotování**

Blotování neboli přenos proteinů na membránu se uskutečnil tzv. polosuchou cestou („semi-dry“). Tento postup je výhodnější z hlediska homogenního elektrického pole, nižší spotřeby transferového pufru a též možnosti současného přenosu až 6 mini gelů. Tato metoda však není vhodná pro proteiny s vysokou molekulovou hmotností.

Pro přenos již separovaných proteinů z gelu se použila PVDF (polyvinyliden difluoridová) membrána, jež se nastříhala tak, aby odpovídala velikosti gelu. S membránou se manipulovalo velmi opatrně, pomocí pinzety se odstranila horní a spodní krycí vrstva membrány. Membránu bylo třeba před použitím zaktivovat smočením v methanolu po dobu 15 sekund, pak 2 minuty v destilované vodě.

Podstatou blotování bylo sestavení "sandwiche", jehož spodní vrstvu tvořil silný filtrační papír namočený v blotovacím pufru a následně přenesený na anodu blotovacího přístroje. Tato vrstva se překryla aktivovanou membránou. Další vrstvu představoval gel, který se velmi opatrně a pokud možno co nejpřesněji přiložil na membránu. Poslední vrstvu tvořil opět navlhčený silný filtrační papír, po jehož povrchu se několikrát přešlo "válečkem", aby se vytlačily vzduchové bubliny.

Na takto připravený "sandwich" se umístila katoda a uzavřelo se víko blotovacího přístroje.

Pro přenos 4 gelů se nastavily tyto podmínky:

- maximální napětí - 25 V
- konstantní proud - 200 mA
- doba blotování - 75 min

Po přesně dodržení času přenosu se zdroj vypnul, víko katody se odstranilo a oddělily se jednotlivé části "sandwiche", přičemž se dále používala už jen membrána, na níž se během blotování přenesly separované proteiny z gelu. Membrána se pinzetou přenesla do vody, aby došlo k projasnění. Dále ji bylo možno použít buďto ihned k imunodetekci, nebo se nechala vysušit mezi filtračními papíry a uchovat při teplotě 2-8°C pro pozdější použití.

### **6.4.3 Imunodetekce, chemiluminiscenční detekce**

#### **Blokace nespecifických vazebných míst**

Před samotným blokováním se membrány nastříhaly dle oblasti sledovaných kDa tak, aby byly vzniklé membrány pokud možno co nejužší. Následně se membrány blokovaly při pokojové teplotě na třepačce po dobu 1 hodiny v 5% roztoku netučného mléka s obsahem TBS s 0,05 % TWEEN-20 (TBS-T). Tím došlo k zablokování nespecifických vazebných míst a zabránilo se tak pozdějšímu možnému navázání proteinů na nesprávná místa.

#### **Inkubace s primární protilátkou**

Během hodinové blokace vazebných míst se připravily vaničky z parafilmu dle rozměrů jednotlivých membrán a naředily se do zkumavek primární protilátky (specifické protilátky proti daným proteinům v myší tkáni) na potřebnou koncentraci 5% roztokem netučného mléka s obsahem TBS s 0,05% TWEEN-20. Obsah zkumavek bylo třeba před vylitím do vaničky vždy dostatečně protřepat.



Nastavení primárních protilátek:

- pro ICAM-1 - rabbit polyclonal anti-ICAM-1 v ředění 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- pro P-selektin - rabbit polyclonal to CD62P v ředění 1:200 (Abcam, Inc.)

K potvrzení stejné nanášky proteinů byla použita myší monoklonální protilátka - mouse monoclonal anti-GAPDH v ředění 1:10000 (Sigma-Aldrich).

Po uplynulé době blokování se membrána položila pomocí pinzety do vaničky s naředěnou primární protilátkou, přičemž nanesené proteiny musely směřovat do tekutiny. V případě potřeby se ještě upravily rohy parafilmu tak, aby vanička přesně kopírovala membránu. Víko s vaničkami se umístilo na kývačku do lednice.

Na závěr se po spuštění kývačky ještě zkontrolovalo, zda se všechny membrány dostatečně koupou v naředěné primární protilátce, aby nedošlo během inkubace k vyschnutí membrány. Poté se již nechaly membrány inkubovat přes noc v lednici.

#### **Inkubace se sekundární protilátkou**

Druhý den ráno se připravil čerstvý roztok TBS-T, v němž se membrány promyly nejprve 3x rychle, poté na třepačce 5x po 10 minutách. Po každém promytí se roztok vyměnil. Mezitím se připravily nové vaničky z parafilmu a do zkumavek se naředily sekundární protilátky (protilátky proti primárním protilátkám) značené křenovou peroxidázou s 5% roztokem netučného mléka v TBS-T. Křenová peroxidáza umožňuje detekci navázání primární protilátky na zkoumaný protein. Opět bylo nutné obsah před vylitím do vaničky důkladně protřepat.

Nastavení sekundárních protilátek:

- pro ICAM-1 - HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG - (Fab)<sup>2</sup> v ředění 1:1000 (Abcam, Inc.)
- pro P-selektin - HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG - (Fab)<sup>2</sup> v ředění 1:2000 (Abcam, Inc.)
- pro GAPDH - HRP-conjugated goat anti-mouse IgG v ředění 1:20000 (Sigma-Aldrich)

Po promytí se membrána pomocí pinzety vložila do vaničky s naředěnou sekundární protilátkou, nanesené proteiny opět směřovaly do roztoku. Bylo-li třeba, upravily se rohy parafilmu dle rozměru membrány. Při pokojové teplotě probíhala hodinová inkubace se sekundární protilátkou. Následovalo další promývání v TBS-T: nejdříve 3x rychle, poté opět na třepačce 5x po 10 minutách.

### **Detekce na RTG filmy**

Již během promývání je nutné se připravovat na následující detekci, při níž je pak potřeba pracovat rychle. Připravila se rovná tvrdá podložka, na kterou se naskládaly nastříhané pásy z neprůhledných fólií (vždy jeden pro membránu), jež posloužily jako podložka membrány. Nastříhaly se dále pásy vyrobené z průhledných fólií a přichystala se kazeta. Před koncem promývání se připravila detekční činidla v takovém množství, aby stačila pro všechny membrány, přičemž se vždy smíchaly složky detekčního kitu (Thermo Fisher Scientific Inc.) v poměru 1:1 a poté se důkladně promísily. Díky detekční soupravě tak byla umožněna vizualizace výsledku reakce „detekovaný protein - primární protilátka - sekundární protilátka". Jedná se obvykle o enzym schopný po přidání specifického substrátu katalyzovat reakci. Podstatou chemiluminiscenční detekce, která byla pro tento experiment využita, je vznik světla v místě výskytu proteinu. Po skončení promývání se každá membrána pinzetou přenesla na pás položený na podložce. Pomocí pipety se na ni nanese předem stanovený objem daného detekčního činidla, tak aby pokryl celou plochu membrány. Velmi důležité bylo přesně dodržet stanovený čas, po který mělo detekční činidlo působit. Přebytečné detekční reagens se pak opatrně odsálo mírným zvednutím membrány a přiložením gázy k dolnímu okraji, membrána se pokryla průhlednou fólií a ihned uzavřela do kazety expoziční stranou vzhůru. Na závěr se membrány v kazetě upevnily lepící páskou a gázou se jemně vytlačily případné bubliny na povrchu expoziční strany membrány. Kazeta se poté odnesla do temné komory k vyvolání filmů, kde se do tří vaniček připravila vývojka, ustalovač a voda. Dále bylo nutné pracovat ve tmě, aby světlo neosvítilo RTG filmy (Foma, Czech Republic), jež by poté zčernaly. Z krabice s filmy se opatrně jeden film vyndal, v pravém dolním rohu se ustříhl "růžek" pro pozdější správnou orientaci a film se přiložil na membránu v kazetě. Kazeta se ihned zavřela a film se nechal exponovat. Doba první expozice se obvykle pohybovala

okolo 10-15 vteřin, poté se film z kazety přenesl do vývojky, kde se nechal vyvíjet. Čekalo se na objevení pruhu bandů, přičemž důležité bylo ve správný okamžik film z vývojky přenést do vody a poté do ustalovače. Dle intenzity výsledku se odhadla doba nutná pro další expozici. Na závěr se všechny filmy rozvěsily a nechaly se uschnout. Na suchých filmech se pak fixem vyznačilo, o jaký protein jde, a naznačily se oblasti jednotlivých kDa. Filmy jsou takto připraveny k vyhodnocení.

### **Stripping membrány**

Po ukončení detekce je možné provést stripování membrány (vymytí reakčních složek), díky němuž je pak možné na dané membráně zopakovat imunodetekci s libovolnou primární protilátkou. Membrána se pinzetou přenesl z kazety a ponoří se do tzv. stripping pufru, v němž se nechá inkubovat v termostatu při teplotě 55°C po dobu 30 minut.

Po uplynulé době se membrána promyje 2x rychle, poté 2x po 10 minutách v TBS-T na třepačce. Promytá membrána se položí na filtrační papír, kde se nechá vysušit. Na suché membráně se pak tužkou zaznamená, jaký protein zde byl původně detekován, a naznačí se jednotlivé kDa včetně oblasti, kde máme zkoumaný protein očekávat. Na závěr se membrána vloží mezi dva filtrační papíry, takto je skladována v lednici při teplotě 2-8°C a připravena pro další imunodetekci. V našem případě použito například pro ověření stejné nanášky proteinů (myší monoklonální protilátka GAPDH).

## **6.5 Vyhodnocení, statistická analýza**

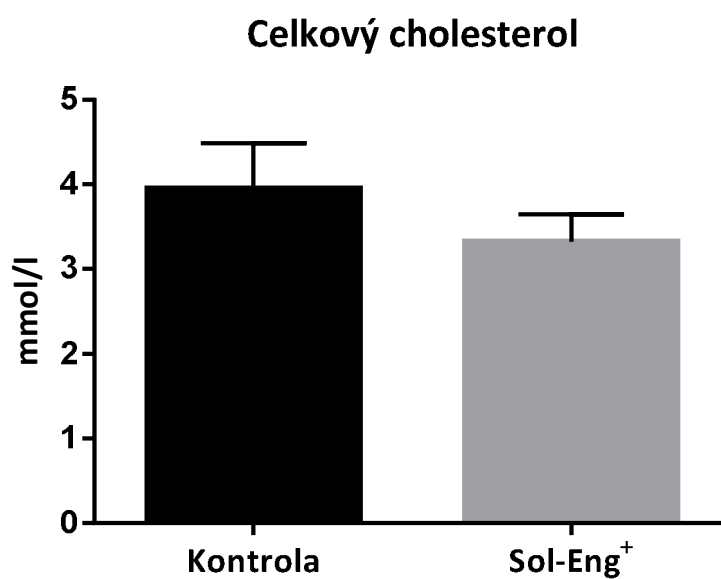
Pro vyhodnocení vyvolaných RTG filmů byla zvolena denzitometrická metoda. Pruhy bandů byly naskenovány pomocí programu Epson Perfection V5000 Photo (EPSON Inc., CA, USA) a semikvantitativně vyhodnoceny pomocí NIS-Elements software, version 4.0 (Laboratory Imaging, Czech Republic). Pro statistické vyhodnocení byl zvolen software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Všechny výsledky jsou vždy uvedeny jako průměr  $\pm$  standardní chyba průměru. Pro hodnocení statisticky významných změn mezi oběma sledovanými skupinami myší byl použit tzv. t-test, přičemž za statisticky významný ukazatel byla stanovena hladina  $p \leq 0,05$ .

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1 Biochemická analýza

U obou skupin zkoumaných myší byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu v krvi. Výsledky jsou vyjádřeny v mmol/l, přičemž nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách při porovnání sledované skupiny (Sol-Eng<sup>+</sup>) s kontrolní skupinou (Kontrola) ( $3,947 \pm 0,539$  mmol/l vs.  $3,322 \pm 0,324$  mmol/l;  $p=0,3308$  - viz Graf 1).

**Graf 1 - Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší (mmol/l)**



Podání speciální diety s vysokým obsahem tuku a cholesterolu nevedlo k rozdíům v hladinách celkového cholesterolu mezi oběma skupinami myší.

## 7.2 Western blot analýza

Výsledky Western blot analýzy znázorňují expresi sledovaných zánětlivých markerů detekovaných v homogenátech myších aort, přičemž účelem bylo vyhodnotit změny v expresi těchto markerů mezi skupinou myší s vysokými hladinami solubilního endoglinu (Sol-Eng<sup>+</sup>) a kontrolní skupinou. Byla zaznamenána signifikantně zvýšená exprese adhezní molekuly ICAM-1 o 90 % u sledované skupiny myší (Sol-Eng<sup>+</sup>) v porovnání s kontrolní skupinou ( $100,00 \pm 20,73$  % vs.  $189,90 \pm 9,22$  %;  $p=0,0062$  - viz Graf 2). Dále byla porovnána exprese adhezní molekuly P-selektinu sledovanou skupinou myší, která byla taktéž signifikantně zvýšená o 47 % oproti kontrolní skupině ( $100,00 \pm 8,51$  % vs.  $146,80 \pm 7,16$  %;  $p=0,0027$  - viz Graf 3). Záznamy z detekce na RTG filmu jsou vyobrazeny na Obrázku 9 (ICAM-1) a Obrázku 10 (P-selektin). Detekci kontroly stejné nanášky proteinů pomocí GAPDH zobrazuje Obrázek 8.

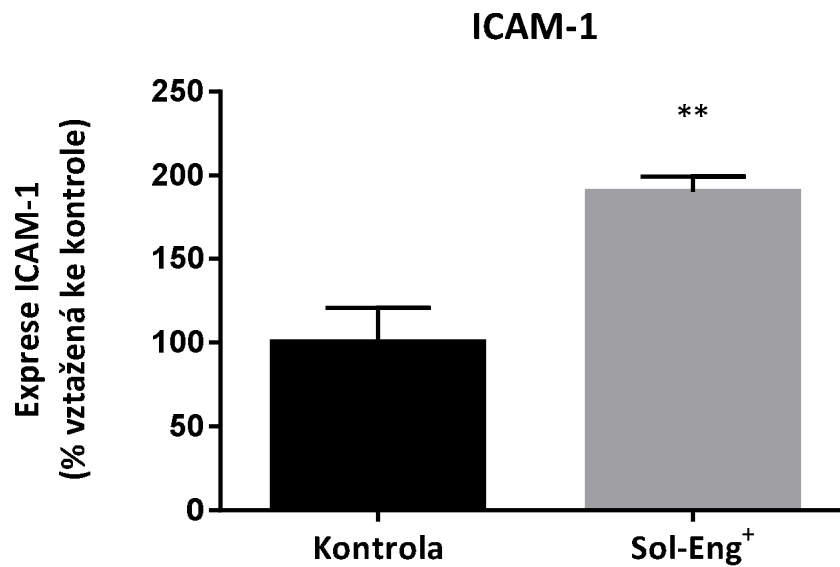
**Obrázek 8 - Kontrola nanášky proteinů GAPDH (30-40 kDa)**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

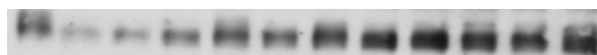
Zleva nanášena nejdříve kontrolní skupina: n= 1-7, dále nanášena sledovaná skupina: n= 8-12

**Graf 2 - Western blot analýza ICAM-1 (%)**



Expresi adhezní molekuly ICAM-1 sledovanou skupinou (Sol-Eng<sup>+</sup>), která byla o 90% zvýšená oproti expresi u kontrolní skupiny (\*\* $p < 0,01$ ).

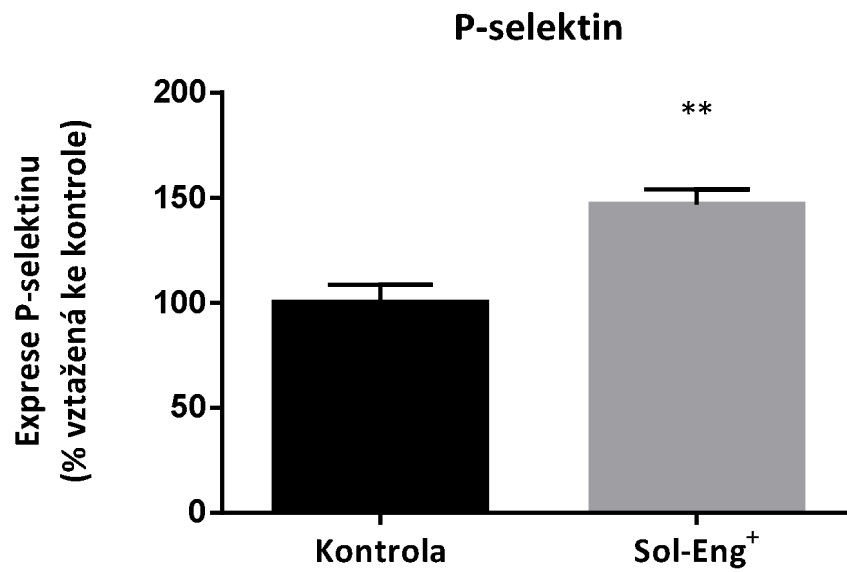
**Obrázek 9 - Detekce ICAM-1 (85-110 kDa) na RTG filmu**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Zleva nanášena nejdříve kontrolní skupina: n= 1-7, dále nanášena sledovaná skupina: n= 8-12

**Graf 3 - Western blot analýza P-selektinu (%)**



Expres adhezní molekuly P-selektinu sledovanou skupinou (Sol-Eng<sup>+</sup>), která odpovídala 147% exprese kontroly (\*\*p<0,01).

**Obrázek 10 - Detekce P-selektinu (84 kDa) na RTG filmu**



Zleva nanášena nejdříve kontrolní skupina: n= 1-7, dále nanášena sledovaná skupina: n= 8-12

## 8. DISKUZE

Ústředním tématem této diplomové práce je role cévního endotelu za fyziologického stavu, soubor změn endotelových funkcí v případě poškození endotelové výstelky a následného rozvoje dysfunkce endotelu. Řada studií se zabývala spojitostí endotelové dysfunkce s expresí netkáňové, tzv. sérové formy endoglinu, která je podle některých dostupných literárních zdrojů považována za jakýsi marker patologických stavů kardiovaskulárního systému. Existuje tedy řada onemocnění souvisejících se solubilním endoglinem, přičemž za hlavní nemoc s jeho zvýšenými hladinami je považována preeklampsie, závažný stav vznikající v těhotenství. K projevům tohoto onemocnění patří mimo jiné též endotelová dysfunkce (Blaha et al., 2008; Ikemoto et al., 2012; Venkatesha et al., 2006). Zvýšené hladiny sledovaného markeru byly prokázány rovněž ve studii s hypercholesterolemickými pacienty (Blann et al., 1996; Blaha et al., 2008). Na základě těchto výsledků se autoři studie přiklání k hypotéze o souvislosti zvýšených hladin sENG s rozvojem endotelové dysfunkce. Zvýšené hodnoty sENG u těchto pacientů korelovaly se zvýšenou hladinou cholesterolu (Blann et al., 1996). Jiné studie hovoří o detekci solubilního endoglinu ve spojitosti se zvýšenou propustností cévní stěny, k níž dochází následkem poškozeného endotelu (Venkatesha et al., 2006).

Na základě těchto dostupných dat se tedy předpokládalo, že vysoké hladiny solubilního endoglinu mají vliv na endotel ve smyslu indukce jeho dysfunkce. V návaznosti na tuto hypotézu byla provedena studie na aortách transgenních myší, kterým byl do organismu inkorporován gen pro expresi lidského endoglinu, který je ze tkáně následně proteolyticky štěpen a objevuje se v cirkulaci jako lidský sENG. Sledovanou skupinu tvořily myši exprimující vysoké hladiny lidského sENG (Sol-Eng<sup>+</sup>). Tato skupina byla současně porovnáвана s kontrolní skupinou myší, které vykazovaly nízké hladiny daného markeru. Oběma zkoumaným skupinám myší byla podávána tzv. chow diet neboli standardní dieta pro hlodavce. Studie prokázala, že u sledované skupiny myší (Sol-Eng<sup>+</sup>) došlo k rozvoji mírné hypertenze a proteinurie ve srovnání s kontrolní skupinou. Nebyla však potvrzena hypotéza o tom, že vysoké hladiny solubilního endoglinu mají samy o sobě vliv na indukci endotelové dysfunkce (Nemeckova et al., 2015). Na základě této studie byla tedy naznačena možnost vlivu



zvýšeného solubilního endoglinu až v kombinaci s jiným rizikovým faktorem na změnu endotelové funkce.

Z tohoto tvrzení jsme tedy vycházeli v naší studii na aortách stejného kmene transgenních myší schopných exprese lidského endoglinu. Stejně jako v předchozí studii byly zkoumány dvě skupiny myší lišící se mezi sebou pouze hladinami lidského sENG. Byla tedy opět porovnávána sledovaná skupina s vysokými hladinami sENG (Sol-Eng<sup>+</sup>) s kontrolní skupinou vykazující velmi nízké (nedetekovatelné) hladiny sledovaného markeru. Oproti předchozí studii, kdy byla zvířata na standardní dietě, byla pro účely našeho experimentu zvířatům podávána speciální dieta - vysokocholesterolová (tvořena z 1,25% cholesterolem a ze 40% tukem). Předpokládalo se, že díky této speciální dietě bude rizikové působení zvýšeného solubilního endoglinu na funkci cévního endotelu markantnější.

Vzhledem k tomu, že byla dle dostupných dat prokázána klíčová role řady adhezních molekul v procesu rozvoje zánětlivé reakce jako odpovědi na poškození cévní stěny (Frenette et al., 1996), zaměřili jsme se v naší studii na hodnocení exprese vybraných adhezních molekul, konkrétně ICAM-1 a P-selektinu ve vztahu k hladinám sENG obou zkoumaných skupin myší.

Pokud jde o molekulu ICAM-1, jejíž exprese jsou kromě endotelových buněk schopny též buňky hladké svaloviny nebo makrofágy (Cybulsky et al., 1999; Dejana et al., 1997), byla prokázána spojitost zvýšené exprese tohoto mediátoru se zánětlivými působky. Role ICAM-1 je tedy v případě poškození cévní stěny a následného rozvoje endotelové dysfunkce nezpochybnitelná (Ahmad et al., 1998; Dustin et al., 1986). Zvýšené hladiny této molekuly byly detekovány i u dalších zánětlivých stavů - ať už lokálních, nebo generalizovaných (alergické astma, septický šok, autoimunitní choroby, zánětlivé a alergické kožní choroby, či infarkt) (Fotis et al., 2012).

Studie prováděná na transgenních myších se standardní dietou neprokázala statisticky významné rozdíly v expresi molekuly ICAM-1 mezi oběma zkoumanými skupinami myší (Nemeckova et al., 2015).

Nám v naší studii prováděné na stejném kmeni transgenních myší, které však dostávaly speciální vysokocholesterolovou dietu, vyšla signifikantně zvýšená exprese adhezní molekuly ICAM-1 o 90% v porovnání s kontrolní skupinou.

Druhým námi hodnoceným proteinem v tomto experimentu je adhezní molekula ze skupiny selektinů - P-selektin. Bylo zjištěno, že exprese této molekuly je vždy vyvolána konkrétním zánětlivým podnětem, tím může být působení molekuly histaminu nebo trombinu. Přítomnost molekuly P-selektinu je dle dostupných zdrojů vázána na aktivované endotelové buňky, přičemž detekovatelná byla například na endotelu aterosklerotických lézí. Další studie však prokázaly přítomnost tohoto mediátoru i v krevních destičkách. Exprese P-selektinu tedy není limitována jen na endotelové buňky (Jang et al., 1994; Wood et al., 1993; Yao et al., 1996).

V naší studii jsme se zaměřili na detekci a následné vyhodnocení exprese adhezní molekuly P-selektinu v aortě transgenních myší s vysokými hladinami sérového endoglinu po podávání vysokocholesterolové diety. Současně byla opět sledována exprese tohoto markeru kontrolní skupinou vykazující nízké hladiny sENG. Zajímalo nás, zda budou prokázány významné statistické rozdíly v expresi P-selektinu při porovnání obou skupin myší.

Vyhodnocením našeho měření bylo zjištěno, že exprese molekuly P-selektinu sledovanou skupinou (Sol-Eng<sup>+</sup>) představuje 147 % exprese kontrolní skupinou, jde tedy o expresi signifikantně vyšší. Byla tedy jako v případě hodnocení exprese ICAM-1 potvrzena spojitost vysokých hladin sérového endoglinu se zvýšenou expresí prozánětlivé adhezní molekuly.

U obou sledovaných skupin transgenních myší byla též provedena biochemická analýza se stanovením hladiny celkového cholesterolu v krvi, přičemž získané výsledky analýzy neprokázaly statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách mezi oběma zkoumanými skupinami myší.

Vzhledem k tomu, že předchozí studie provedená na myších se standardní dietou korelaci zvýšených hladin sENG se zvýšenou expresí adhezních molekul neprokázala (Nemeckova et al., 2015), závěrem naší studie je tedy tvrzení, že pravděpodobně nikoli samotné zvýšení hladiny sérového endoglinu, ale až v kombinaci

s vysokocholesterolovou dietou solubilní endoglin ovlivňuje endotel ve smyslu indukce zánětu.

## 9. ZÁVĚR

V diplomové práci byla nejdříve teoreticky popsána souvislost exprese zánětlivých markerů ICAM-1 a P-selektinu s reakcí endotelu na poškození cévní stěny za fyziologických podmínek ale též za stavu endotelové dysfunkce. Byla rovněž naznačena role sérového endoglinu, podle řady literárních zdrojů jakéhosi markeru, u řady patologických stavů kardiovaskulárního systému.

Pomocí Western blot analýzy byla experimentálně detekována a následně vyhodnocena exprese výše zmíněných zánětlivých markerů v aortě transgenních myší, které vykazovaly vysoké plazmatické hladiny lidského sérového endoglinu, po podávání speciální diety s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Současně byla sledována exprese těchto markerů u transgenních myší s nízkými hladinami lidského sérového endoglinu, u nichž byla nasazena rovněž tato speciální dieta. Získaná data byla semikvantitativně vyhodnocena a porovnána mezi oběma sledovanými skupinami transgenních myší s těmito výsledky:

- Expese adhezní molekuly ICAM-1 sledovanou skupinou byla signifikantně zvýšená o 90 % v porovnání s kontrolní skupinou.
- Expese adhezní molekuly P-selektinu sledovanou skupinou byla signifikantně zvýšená o 47 % v porovnání s kontrolní skupinou.

Podání diety s vysokým obsahem tuku a cholesterolu nevedlo k rozdílům v hladinách celkového cholesterolu mezi oběma skupinami myší.

Výsledky této studie poukazují na spojitost zvýšených hladin lidského sérového endoglinu a vysokocholesterolové diety ve smyslu zvýšené exprese zánětlivých markerů (adhezních molekul) ICAM-1 a P-selektinu, a tedy na potenciálně vyplývající funkční změnu endotelu ve smyslu indukce zánětu. Skutečný dopad těchto změn na funkční parametry cévy je však v současné době předmětem dalšího výzkumu.

## 10. POUŽITÉ ZKRATKY

ALK1	activin receptor like kináza 1
ALK5	activin receptor like kináza 5
AMK	aminokyselina
APS	peroxodisíran amonný
CD105	endoglin
Co-SMAD	komediatorové SMAD proteiny
ENG	endoglin
eNOS	endoteliální NO syntáza
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
ICAM-1	leukocytární adhezní molekula (intercellular cell adhesion molecule)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-8	interleukin-8
I-SMAD	inhibiční SMAD proteiny
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1 (monocyte chemotactic protein-1)
MMP-14	neboli MT1-MMP membránově vázaná metaloproteináza (membrane-type metalloprotease-1)
NO	oxid dusnatý
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PDGF	růstový faktor destiček (platelet-derived growth factor)
PECAM-1	destičková endoteliální adhezní molekula (platelet endothelial cell adhesion molecule)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS-polykrylamidová gelová elektroforéza
sENG	sérový (solubilní) endoglin

sICAM-1	sérová forma ICAM-1
R-SMAD	receptory regulované SMAD proteiny
SMAD	intracelulární signální proteiny účastnící se transdukce signálu
TBS	tris pufr hydrochlorid
TEMED	tetrametyletylendiamin
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TGF- $\beta$ R	receptor pro transformující růstový faktor
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumour necrosis factor)
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	buněčná adhezní molekula (vascular cell adhesion molecule)

## 11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Příprava gelů.....	38
--------------------------------	----

## 12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Struktura arteriální stěny.....	11
Obrázek 2 - Ateroskleróza - porovnání arterií .....	14
Obrázek 3 - Prostup leukocytu endotelem za účasti zánětlivých mediátorů .....	18
Obrázek 4 - Vznik a důsledky dysfunkčního endotelu.....	23
Obrázek 5 - Struktura endoglinu.....	25
Obrázek 6 - TGF- $\beta$ signální dráha .....	29
Obrázek 7 - Vznik sérového ENG odštěpením z jeho tkáňové formy .....	32
Obrázek 8 - Kontrola nanášky proteinů GAPDH (30-40 kDa) .....	45
Obrázek 9 - Detekce ICAM-1 (85-110 kDa) na RTG filmu.....	46
Obrázek 10 - Detekce P-selektinu (84 kDa) na RTG filmu .....	47

## 13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší (mmol/l).....	44
Graf 2 - Western blot analýza ICAM-1 (%) .....	46
Graf 3 - Western blot analýza P-selektinu (%).....	47

## 14. POUŽITÁ LITERATURA

**Ahmad M., Theofanidis P. and Medford R. M., 1998.** Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 273, 4616-21.

**Barbara N. P., Wrana J. L. and Letarte M., 1999.** Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 274, 584-94.

**Blaha M., Cermanova M., Blaha V., Jarolim P. et al., 2008.** Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 197, 264-70.

**Blanco F. J., Grande M. T., Langa C., Oujo B. et al., 2008.** S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 103, 1383-92.

**Blann A. D., Wang J. M., Wilson P. B. and Kumar S., 1996.** Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 120, 221-6.

**Blazquez-Medela A. M., Garcia-Ortiz L., Gomez-Marcos M. A., Recio-Rodriguez J. I. et al., 2010.** Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8, 86.

**Bobik A., 2006.** Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1712-20.

**Conley B. A., Smith J. D., Guerrero-Esteo M., Bernabeu C. et al., 2000.** Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153, 323-35.

**Cybulsky M. I., Lichtman A. H., Hajra L. and Iiyama K., 1999.** Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta* 286, 207-18.

**Češka R., 1999.** Cholesterol a ateroskleróza - léčba hyperlipidemií. 2. vydání. Praha : MAXDORF, 9-43.

**Češka R., 2005.** Cholesterol a ateroskleróza - léčba dyslipidemií. 1. vydání. Praha : TRITON, 343.

**Davies M. J., Gordon J. L., Gearing A. J., Pigott R. et al., 1993.** The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 171, 223-9.

**De Vivo A., Baviera G., Giordano D., Todarello G. et al., 2008.** Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87, 837-42.

**Dejana E., Valiron O., Navarro P. and Lampugnani M. G., 1997.** Intercellular junctions in the endothelium and the control of vascular permeability. *Ann N Y Acad Sci* 811, 36-43; discussion 43-4.

**Dustin M. L., Rothlein R., Bhan A. K., Dinarello C. A. et al., 1986.** Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137, 245-54.



- Fejfar Z. and Přerovský I., 2002.** Klinická fyziologie krevního oběhu. 3. přepracované a rozšířené vydání. Praha : Galén, 47-61.
- Fernandez-L. A., Sanz-Rodriguez F., Blanco F. J., Bernabeu C. et al., 2006.** Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. Clin Med Res 4, 66-78.
- Fernandez-Ruiz E., St-Jacques S., Bellon T., Letarte M. et al., 1993.** Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. Cytogenet Cell Genet 64, 204-7.
- Fotis L., Giannakopoulos D., Stamogiannou L. and Xatzipsalti M., 2012.** Intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in children. Do they play a role in the progression of atherosclerosis? Hormones (Athens) 11, 140-6
- Frenette P. S., Mayadas T. N., Rayburn H., Hynes R. O. et al., 1996.** Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. Cell 84, 563-74.
- Goumans M. J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A. et al., 2002.** Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. EMBO J 21, 1743-53.
- Hawinkels L. J., Kuiper P., Wiercinska E., Verspaget H. W. et al., 2010.** Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. Cancer Res 70, 4141-50.
- Hill G. E. and Whitten C. W., 1997.** The role of the vascular endothelium in inflammatory syndromes, atherogenesis, and the propagation of disease. J Cardiothorac Vasc Anesth 11, 316-21.
- Cheifetz S., Bellon T., Cales C., Vera S. et al., 1992.** Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. J Biol Chem 267, 19027-30.
- Ikemoto T., Hojo Y., Kondo H., Takahashi N. et al., 2012.** Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. Heart Vessels 27, 344-51.
- Jang Y., Lincoff A. M., Plow E. F. and Topol E. J., 1994.** Cell adhesion molecules in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 24, 1591-601.
- Keaney J. F., Jr., 2000.** Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. Mol Aspects Med 21, 99-166.
- Koleva R. I., Conley B. A., Romero D., Riley K. S. et al., 2006.** Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. J Biol Chem 281, 25110-23.
- Lebrin F., Deckers M., Bertolino P. and Ten Dijke P., 2005.** TGF-beta receptor function in the endothelium. Cardiovasc Res 65, 599-608.
- Li C., Hampson I. N., Hampson L., Kumar P. et al., 2000.** CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. FASEB J 14, 55-64.

- Lopez-Novoa J. M. and Bernabeu C., 2010.** The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H959-74.
- Lukacs N. W., Strieter R. M., Elnor V., Evanoff H. L. et al., 1995.** Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86, 2767-73.
- Mallat Z. and Tedgui A., 2002.** The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* 13, 523-9.
- Merkunová A. and Orel M., 2008.** Anatomie a fyziologie člověka - pro humanitní obory. 1. vydání. Praha : Grada, 95.
- Nachtigal P., Pospisilova N., Vecerova L., Micuda S. et al., 2009.** Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* 16, 265-74.
- Nachtigal P., Zemankova Vecerova L., Rathouska J. and Strasky Z., 2012.** The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 224, 4-11.
- Nakashima Y., Raines E. W., Plump A. S., Breslow J. L. et al., 1998.** Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 842-51.
- Nemeckova I., Serwaczak A., Oujó B., Jezkova K. et al., 2015.** High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One* 10, in press.
- Perez-Gomez E., Eleno N., Lopez-Novoa J. M., Ramirez J. R. et al., 2005.** Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 24, 4450-61.
- Perušičová J. and Češka R., 2009.** Kardiabetes. *Kardiovaskulární choroby & Diabetes mellitus*. 1. vydání. Brno : Facta Medica, 19.
- Pospisilova N., Semecky V., Jamborova G., Pospeschova K. et al., 2006.** Endoglin expression in hyper-cholesterolemia and after atorvastatin treatment in apoE-deficient mice. *J Pharm Pharm Sci* 9, 388-97.
- Qu R., Silver M. M. and Letarte M., 1998.** Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* 292, 333-43.
- Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M. et al., 2011.** Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 64, 53-9.
- Santibanez J. F., Letamendia A., Perez-Barriocanal F., Silvestri C. et al., 2007.** Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210, 456-68.
- Shi Y. and Massagué J., 2003.** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Scholz D., Devaux B., Hirche A., Pötzsch B. et al., 1996.** Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res* 284, 415-23.

- Strasky Z., Vecerova L., Rathouska J., Slanarova M. et al., 2011.** Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J* 75, 1747-55.
- Svačina Š., 2010.** Poruchy metabolismu a výživy. 1. vydání. Praha : Galén, 289-306.
- Šteiner I., 1994.** Kardiovaskulární patologie - Učební text pro posluchače lékařské fakulty. 1. vydání. Praha : Karolinum, 29-35.
- Šteiner I., 2010.** Kardiopatologie pro patology i kardiology. 1. vydání. Praha : Galén, 23-25.
- Toporsian M., Gros R., Kabir M. G., Vera S. et al., 2005.** A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96, 684-92.
- Tracey K. J. and Cerami A., 1992.** Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels. *Proc Soc Exp Biol Med* 200, 233-9.
- Valbuena-Diez A. C., Blanco F. J., Oujo B., Langa C. et al., 2012.** Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* 126, 2612-2624.
- Venkatesha S., Toporsian M., Lam C., Hanai J. et al., 2006.** Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12, 642-9.
- Vrablík M., 2009.** Endoteliální dysfunkce - první a ovlivnitelné stádium aterosklerózy. *Practicus* 8, 28-30.
- Vrablík M., Janotová M., Motyková E., Prusíková M., 2011.** Endoteliální dysfunkce - první stádium aterosklerózy. *Med. praxi* 8, 119-122.
- Widimský J., 2002.** Léčba dyslipidemií u pacientů s ICHS nebo jiným onemocněním aterosklerotické etiologie a u nemocných s diabetes mellitus. 1. vydání. Praha : TRITON, 11-31.
- Wood K. M., Cadogan M. D., Ramshaw A. L. and Parums D. V., 1993.** The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopathology* 22, 437-44.
- Yao L., Pan J., Setiadi H., Patel K. D. et al., 1996.** Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* 184, 81-92