

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biologických a lékařských věd



**MARKERY ZÁNĚTU A PROLIFERACE V SRDEČNÍ STĚĚ  
TRANSGENNÍHO MODELU MYŠÍ S VYSOKÝMI HLADINAMI  
SOLUBILNÍHO ENDOGLINU**

**MARKERS OF INFLAMMATION AND PROLIFERATION IN THE  
HEART OF A TRANSGENIC MOUSE MODEL EXPRESSING HIGH  
LEVELS OF SOLUBLE ENDOGLIN**

Rigorózní práce

Konzultantka rigorózní práce:

PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Mgr. Petra Boukalová

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

Datum:

Podpis:

„Na tomto místě bych velice ráda poděkovala PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za odborné vedení této práce, za cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala. A dále svým nejbližším, rodině a hlavně manželovi za podporu, pomoc a toleranci během mého studia.“

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Markery zánětu a proliferace v srdeční stěně transgenního modelu myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu

Rigorózní práce

Mgr. Petra Boukalová

Konzultantka práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Cíl práce: Cílem této rigorózní práce bylo sledovat expresi markerů zánětu a proliferace v srdeční stěně geneticky upravených myši vykazujících vysoké hladiny solubilního endoglinu. Bylo prokázáno, že molekula solubilního endoglinu hraje roli v mnoha kardiovaskulárních chorobách. Transgenní model myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu nám umožňuje studium jeho podílu na patogenezi těchto chorob.

Metody: Pro tuto práci byl použit transgenní model myši CBAx<sup>C57BL/6J</sup> s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu. Sledovali jsme expresi vybraných molekul (ICAM-1, VEGF, COX-2 a SOD-3) v srdeční stěně u této skupiny myši a porovnávali ji se skupinou kontrolní, která se skládala z myši s nízkou hladinou lidského solubilního endoglinu. Obě skupiny zvířat byly krmeny standardní dietou pro hlodavce do věku devíti měsíců. Pro detekci exprese byla zvolena metoda Western blot analýza. Pro rozdělení myši do skupin byla využita ELISA analýza.

Výsledky: Výsledky Western blot analýzy srdeční tkáně neukázaly signifikantní rozdíl v expresi vybraných markerů zánětu a proliferace u sledované skupiny myši v porovnání se skupinou kontrolní.

Závěr: Ze získaných výsledků lze usuzovat, že vysoká hladina solubilního endoglinu pravděpodobně nemá vliv na expresi molekul zánětu a proliferace - ICAM-1, VEGF, COX-2 a SOD-3 - v srdeční stěně u transgenního modelu myši krmených standardní dietou. Potvrzení této domněnky bude předmětem dalších studií.

## **Abstract**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Markers of inflammation and proliferation in the heart of a transgenic mouse model expressing high levels of soluble endoglin

Rigorous thesis

Mgr. Petra Boukalová

Consultant of rigorous thesis: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Background: The aim of this thesis was to investigate the expression of markers of inflammation and proliferation in the cardiac wall of genetically modified mice expressing high levels of soluble endoglin. It was shown that soluble endoglin molecule plays a role in many cardiovascular diseases. The transgenic mouse model with high levels of soluble endoglin allows us to study its contribution to the pathogenesis of these diseases.

Methods: For this work a transgenic mouse model on CBAxC57BL/6J background with high levels of human soluble endoglin was used. We observed the expression of selected molecules (ICAM-1, VEGF, COX-2 and SOD-3) in the heart wall of this group of mice compared to the control group of mice with low levels of human soluble endoglin. Both groups of animals were fed a chow diet till the age of nine months. Western blot analysis was used to detect the protein expression. ELISA analysis was used to allocate the mice in two relevant groups.

Results: The results of Western blot analysis of cardiac tissue showed no significant differences in the expressions of specific markers of inflammation and proliferation in the observed group of mice compared with the control group of mice.

Conclusion: The results suggest that the high level of soluble endoglin is unlikely to have influence on expression of molecules of inflammation and proliferation - ICAM-1, VEGF, COX-2 and SOD-3 - in the cardiac wall of a transgenic mouse model fed chow diet. Confirmation of this hypothesis will be the subject of further studies.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	STAVBA SRDCE .....	9
2.1.1	Stavba srdeční stěny .....	9
2.1.2	Cévy a nervy srdce .....	11
2.2	PATOLOGIE SRDCE.....	11
2.2.1	Selhání srdce .....	11
2.2.2	Nemoci srdce.....	12
2.2.3	Patogeneze aterosklerózy a její vztah k srdečnímu poškození .....	13
2.2.4	Vliv oxidačního stresu na kardiovaskulární poškození .....	14
2.3	VYBRANÉ MARKERY ZÁNĚTU, PROLIFERACE A OXIDAČNÍHO STRESU.....	14
2.3.1	ICAM-1.....	14
2.3.2	VEGF.....	15
2.3.3	COX-2 .....	16
2.3.4	SOD3 .....	17
2.4	ENDOGLIN.....	18
2.4.1	Tkáňový endoglin.....	19
2.4.2	Solubilní endoglin .....	21
3	CÍL PRÁCE.....	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
4.1	POUŽITÁ ZVÍŘATA.....	23
4.2	ELISA ANALÝZA HLADIN SOLUBILNÍHO ENDOGLINU .....	24
4.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ-HOMOGENIZACE.....	24
4.3.1	Stanovení koncentrace proteinů .....	25
4.4	WESTERN BLOT ANALÝZA .....	26
4.4.1	Gelová elektroforéza .....	26
4.4.2	Blotování.....	28
4.4.3	Imunodetekce .....	29
5	VÝSLEDKY.....	32
5.1	ELISA analýza .....	32

5.2	Western blot analýza .....	33
5.2.1	Exprese molekuly ICAM-1 .....	34
5.2.2	Exprese molekuly VEGF .....	35
5.2.3	Exprese molekuly COX-2 .....	36
5.2.4	Exprese molekuly SOD-3 .....	37
6	DISKUZE .....	38
7	ZÁVĚR .....	42
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	43
9	SEZNAM TABULEK .....	45
10	SEZNAM GRAFŮ .....	45
11	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	45
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	46

# 1 ÚVOD

Srdce je jeden z nejdůležitějších orgánů v organismu, ne-li ten nejdůležitější. Spolu s cévami vytváří kardiovaskulární systém, který prostřednictvím krve zajišťuje zásobení tkání kyslíkem a živinami a odvod odpadních látek z těla (Trojan et al., 2003).

V dnešní době již existuje široká škála metod, jak řešit vzniklé nemoci nebo vady postihující srdce, ale i tak jsou tyto situace zdrojem oprávněných obav, jak z řad pacientů, tak i lékařů, protože problémy související se srdcem stále patří k jedněm z nejzávažnějších zdravotních komplikací, které mohou v krajním případě ohrožovat i život pacienta.

Onemocnění kardiovaskulárního systému je vůbec na prvním místě v žebříčku příčin úmrtí. Způsobuje jich zhruba polovinu. A z toho polovina je zapříčiněna ischemickou chorobou srdeční (ÚZIS online: Zdravotnická statistika, 2013). Příčinou tohoto onemocnění je téměř vždy ateroskleróza, která způsobí zúžení průsvitu koronárních cév, které zásobují srdce kyslíkem, což způsobí ischemii, nedokrvení srdečního svalu.

I přesto, že existuje mnoho léčebných postupů, které řeší problémy týkající se kardiovaskulárního systému, tak i přesto je ještě stále mnoho věcí neobjasněných a je třeba se této problematice neustále věnovat.

Endoglin je molekula, která má úzký vztah ke kardiovaskulárním nemocem, včetně hereditární hemoragické teleangiektázie (Shovlin, 2010), preeklampsie (Gregory et al., 2014), aterosklerózy (Nachtigal et al., 2012) a rakoviny (Rosen et al., 2014). Prokázán byl i jeho vliv na fibrózu srdce, která je jednou z příčin srdečního selhání (Kapur et al., 2012). Rovněž solubilní forma endoglinu, jehož zvýšené hladiny byly detekovány v plazmě u různých patologických stavů souvisejících s kardiovaskulárním systémem, má podíl na vzniku těchto stavů. Za účelem bližšího studia jeho vlivu na patogenezi těchto chorob byl vytvořen geneticky upravený model myši vykazující vysoké hladiny solubilního endoglinu, jehož vliv na funkci endotelu byl pozorován v nedávné studii (Němečková et al., 2015).

Tato práce se zaměřuje na molekulu solubilního endoglinu a jeho vliv na expresi vybraných markerů zánětu a proliferace v srdeční stěně tohoto transgenního modelu myši.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 STAVBA SRDCE

Srdce spolu s cévami vytváří krevní oběh. Srdce funguje jako pumpa, která díky své kontrakční schopnosti zabezpečuje cirkulaci krve v organismu a spolu s cévami tak umožňuje výměnu látek mezi krví a tkáněmi nebo výměnu dýchacích plynů mezi krví a plicními alveoly (Trojan et al., 2003).

Srdce je dutý svalový orgán nacházející se v mediastinu, za hrudní kostí. Je uloženo v obalu zvaném perikard – osrdečník (Čihák, 1997). Je rozděleno na čtyři dutiny: pravou komoru a předsíň a levou komoru a předsíň. Svalovina předsíní je od svaloviny komor oddělena vazivovým srdečním skeletem, který tvoří bázi pro všechny čtyři srdeční chlopně, jejichž funkcí je propouštět krev pouze jedním směrem, tedy z předsíní do komor a z komor do velkých tepen (Trojan et al., 2003).

#### 2.1.1 Stavba srdeční stěny

Stěna srdce je tvořena třemi základními vrstvami, a to: endokardem, myokardem a epikardem.

##### ***Endokard***

Odpovídá vrstvě *tunica intima* cév. Jedná se o lesklou, hladkou, průsvitnou membránu, která vystýlá všechny srdeční dutiny. Je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk podloženou elasticko-muskulární vrstvou, složenou z elastických vláken s vloženými buňkami hladkého svalstva. Tato vrstva je řídkým vazivem připojena k myokardu. Ve vazivu probíhají cévy, vlákna převodního systému a senzitivní nervy (Čihák, 1997; Petrovický et al., 1995).

##### ***Myokard***

Je nejsilnější vrstvou stěny srdce. Jde o svalovou vrstvu tvořenou příčně pruhovanou svalovinou. Jednotlivé buňky, kardiomyocyty, jsou spolu navzájem spojeny a vytvářejí svazky srdeční svaloviny. Dělí se na myokard předsíní a myokard komor. Myokard předsíní je výrazně slabší a je tvořen dvěma vrstvami: povrchovou a hlubokou. Komorový myokard je tvořen třemi vrstvami: zevní, střední a vnitřní (Petrovický et al., 1995).

### ***Převodní systém srdeční***

Srdeční akce je tvořena rytmickými změnami, které se nazývají systola (stah) a diastola (ochabnutí) předsíní a komor. Tato činnost je realizována souborem specializovaných částí myokardu, které vytvářejí samy bez zevního podnětu vzruchy vedoucí ke kontrakci myokardu a rozvádějí je svalovinou srdeční.

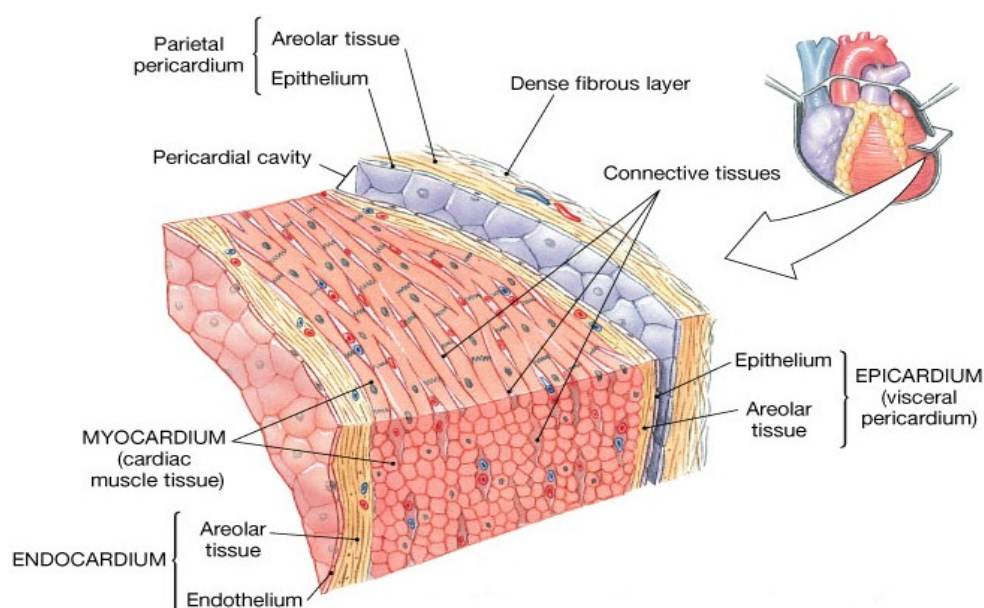
K převodnímu systému srdečnímu patří:

- sinusový uzel – základní útvar udávající rytmus srdce
- atrioventrikulární (síňokomorový) uzel
- spoje ze sinusového uzlu k atrioventrikulárnímu uzlu a do myokardu
- atrioventrikulární svazek
- raménka atrioventrikulárního svazku
- Purkyňova vlákna (Čihák, 1997; Petrovický et al., 1995).

### ***Epikard***

Tvoří povlak povrchu srdce. S myokardem je spojen vazivem a tukovým vazivem, jímž probíhají kmeny tepen, žil a nervů srdce (Čihák, 1997).

**Obrázek 1:** Stavba srdeční stěny



parietal pericardium – parietální perikard, areolar tissue – řídké vazivo, epithelium – epitel, dense fibrous layer – kompaktní vrstva vaziva, pericardial cavity –

perikardiální dutina, connective tissue – pojivová tkáň, myocardium (cardiac muscle tissue) – myokard (srdeční svalová tkáň), endocardium – endokard, endothelium-endotel, epicardium (visceral pericardium) – epikard (viscerální perikard)

Převzato: < <http://www.guwsmedical.info/heart-failure/internal-anatomy-of-the-heart.html> > (vid. 10.12.2015)

### **2.1.2 Cévy a nervy srdce**

Cévy srdce se rozdělují na tepny, které zajišťují výživu srdečních stěn (věnčité tepny) a žíly, které krev ze srdečních stěn odvádějí (srdeční žíly).

Nervy přicházející k srdci ovlivňují frekvenci a intenzitu srdečních stahů, a tím výdej krve do cév – podle stávajících a měnících se potřeb organismu. Tento děj je realizován působením nervů na tkáň převodního systému, na věnčité tepny, eventuálně i přímo na myokard.

Nervy srdce patří k nervům autonomním a obsahují vlákna vedoucí do srdce, sympatická a parasympatická, i vlákna sensitivní, vedoucí podněty ze srdce do centrálního nervstva (Čihák, 1997).

## **2.2 PATOLOGIE SRDCE**

Srdce je orgán, který se podílí na zásobení organismu kyslíkem a na odvodu odpadních látek z těla. Tyto procesy mohou být narušeny z několika příčin. Jedná se o selhání srdce, cévního systému a vliv odchýlného složení krve. Nemoci vznikající z poruch krevního oběhu se nazývají nemocemi kardiovaskulárními a v současné době jsou ve vyspělých zemích nejčastějšími příčinami úmrtí (Mačák et al., 2004).

### **2.2.1 Selhání srdce**

Srdeční selhání je hlavní příčina morbidity a mortality, která celosvětově ovlivňuje více než 24 milionů lidí (Lloyd-Jones et al., 2009; Cowie et al., 1997; Davies et al., 2001). Při nedostatečné činnosti srdce dochází ke stavu, kdy srdce není schopno vypudit všechnu krev z levé komory srdeční a část objemu krve v komoře zůstává. Srdeční sval musí překonávat stále se zvyšující odpor, levá komora hypertrofuje a rozšiřuje se, dochází k excentrické hypertrofii. V souvislosti s touto hypertrofií se mluví o dekompenzované činnosti a o selhávání srdce neboli insuficienci. Ta se dělí na:

- insuficienci levého srdce – akutní nebo chronickou,
- insuficienci pravého srdce – akutní nebo chronickou.

Akutní probíhá rychle, k chronickému selhání dochází postupně (Mačák et al., 2004).

Příčin selhávání srdce je mnoho. Nejčastěji to bývá v souvislosti s ischemickou chorobou srdeční. V menším počtu pak v důsledku myokarditidy nebo kardiomyopatie a dále mohou být příčinami nemoci endokardu a chlopní (revmatická nebo infekční endokarditida, vrozené a získané chlopněvé vady) a dále pak i onemocnění perikardu (Mačák et al., 2004).

## 2.2.2 Nemoci srdce

### *Nemoci myokardu*

Nejčastějším onemocněním srdce je ischemická choroba, která rovněž patří k nejzávažnějším. Označuje se jí nepoměr mezi možnostmi zásobení kyslíkem a jeho skutečnou potřebou v srdečním svalu. Mezi příčiny ischemické choroby patří:

- snížený přítok krve věnčitými tepnami, které jsou postiženy aterosklerózou, trombózou, spazmem nebo shluky krevních destiček,
- snížené množství kyslíku v krvi,
- značně zvýšená činnost srdce.

V závislosti na stupni zúžení věnčitých tepen a na závažnosti poškození rozeznáváme čtyři typy ischemického onemocnění:

1. angina pectoris – vyvolána přechodnou ischemií srdeční svaloviny,
2. infarkt myokardu – nastává v případě, že ischemie srdečního svalu trvá delší dobu, na vině je většinou akutní vznik trombu v místě aterosklerotické koronární stenózy,
3. chronická ischemická choroba – vyvolána změnami na věnčitých tepnách – středně těžká až těžká ateroskleróza zužující cévy,
4. náhlá srdeční smrt – většinou navazuje na některé z předchozích onemocnění. (Mačák et al., 2004, Silbernagl et al., 2001).

### *Kardiomyopatie*

Jde o nezánettivé onemocnění srdce neznámé příčiny, které vzniká v důsledku primární abnormality myokardu. Dělí se na tři typy:

1. dilatovaný (kongestivní) – obě komory jsou hypertrofické a rozšířené a dochází zejména k poruše kontrakční schopnosti svaloviny,
2. hypertrofický – zbytnění svaloviny levé komory, především v oblasti mezikomorové přepážky, čímž dochází k zúžení výtokové části srdce,
3. restriktivní – postižen je převážně endokard, kdy dochází k jeho fibróze, což omezuje plnění levé komory krví (Mačák et al., 2004).

### **2.2.3 Patogeneze aterosklerózy a její vztah k srdečnímu poškození**

Ateroskleróza je chronické cévní zánětlivé onemocnění související s kardiovaskulárními dysfunkcemi, mezi něž patří infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris, náhlá srdeční smrt, mrtvice a periferní trombóza. Vznik aterosklerózy, aterogeneze, je iniciována poškozením endotelu vlivem oxidačního stresu spojeného s kardiovaskulárními rizikovými faktory jako diabetes mellitus, hypertenze, kouření, dyslipidemie, obezita a metabolický syndrom (Husain et al., 2015).

Poškození endotelu podporuje expresi adhezních molekul, které způsobují přilnutí cirkulujících krevních leukocytů (monocytů) a trombocytů k endotelu cévy. Monocyty pronikají do intimy a přeměňují se na makrofágy, které uvolňují reaktivní kyslíkové radikály. Aktivované makrofágy pohlcují lipidové částice a stávají se z nich pěnové buňky, které uvolňují cytokiny přitahující další leukocyty. Rovněž jsou aktivovány i buňky hladkého svalstva cév k proliferaci a migraci z medie do intimy a vychytáváním lipidových částic se z nich stávají také pěnové buňky, které tvorbou extracelulární matrix (kolagenu, elastinu, proteoglykanu) přispívají k tvorbě aterosklerotického plátu. Následkem ukládání aterosklerotických plátů je zúžení průsvitu cév, což může vést k ischemii, v případě srdečních koronárních cév pak k ischemické chorobě srdeční. Dalším následkem je ztuhnutí (kalcifikace) cévní stěny (Silbernagl et al., 2001).

Zánětlivé buňky a buňky hladké svaloviny cév produkují tzv. matrix metaloproteázy, které destabilizují plát a zvyšují riziko jeho prasknutí. Ruptura plátu vyvolá tvorbu trombů, způsobujících uzavření zbylého průsvitu cév. Následkem je pak embolizace, krvácení do plátů i do cévní stěny (Silbernagl et al., 2001; Moss et al., 2015).

## 2.2.4 Vliv oxidačního stresu na kardiovaskulární poškození

Oxidační stres je označován jako nerovnováha buněčných oxidantů (kyslíkových radikálů) a antioxidantů v organismu vedoucí k poškození buněk (Zafari et al., 1998; Matoušková et al., 2014). Může být příčinou i důsledkem mnoha cévních komplikací a slouží jako jeden z biomarkerů těchto onemocnění (Kim et al., 2014).

Aerobní organismy v důsledku aerobní respirace a oxidace substrátu produkují reaktivní formy kyslíku (ROS). Tyto mohou být odstraněny buď spontánně nebo pomocí superoxidových dismutáz. Kyslíkový radikál (superoxid) je pak přeměněn na kyslík a peroxid vodíku:



Nízké hladiny buď intracelulárních nebo extracelulárních ROS jsou nepostradatelné v mnoha biochemických procesech, včetně nitrobuněčné signalizace, obraně proti mikroorganismům a funkce buněk (Go et al., 2011; Lassegue et al., 2010; Ushio-Fukai 2009). Naproti tomu vysoké dávky nebo nedostatečně odstraněné ROS, zejména peroxidový anion, jsou příčinou oxidačního stresu, který se podílí na mnoha kardiovaskulárních onemocněních, včetně hypercholesterolémie, aterosklerózy, hypertenze, diabetu nebo srdečního selhání (Bogdan et al., 2000).

## 2.3 VYBRANÉ MARKERY ZÁNĚTU, PROLIFERACE A OXIDAČNÍHO STRESU

### 2.3.1 ICAM-1

ICAM-1 je zkratkou pro intracelulární adhezní molekulu. Termín adhezní molekuly označuje buněčné povrchové struktury, které umožňují buňkám k sobě přilnout. Buněčné adhezní molekuly (CAM) jsou mimo adheze schopny ovlivnit i pohyblivost buněk, signalizaci, diferenciaci, apoptózu a genovou transkripci (Ohene-Abuakwa et al., 2000).

ICAM-1 je transmembránový glykoprotein patřící do imunoglobulinové rodiny CAM (Roblendo et al., 2003). Bylo popsáno pět typů intracelulárních molekul ICAM (1-5). Z nich nejvíce prostudovanou je právě ICAM-1, vzhledem k její schopnosti ovlivnit adhezi leukocytů na endotel (Tian et al., 1997; Hermand et al., 2003; Toivanen et al., 2008; Lawson et al., 2009).

Je exprimován na povrchu různých typů buněk, např. na leukocytech, fibroblastech, na endotelových buňkách (Yang et al., 2005; Hayes et al., 2009). Skládá se z pěti extracelulárních imunoglobulinových částic, transmembránové části a malé intracelulární části obsahující 28 aminokyselin s COOH koncem (van de Stolpe et al., 1996).

ICAM-1 je velmi důležitý v interakci mezi endotelem a leukocyty, při migraci leukocytů v místě zánětu, při buněčné interakci v průběhu prezentace antigenu, kdy působí jako kofaktor buněčné stimulace prezentující antigen, při aktivaci T-lymfocytů a bakteriální patogenezi (Hubbard et al., 2000).

ICAM-1 za fyziologického stavu buď není vůbec přítomen nebo je přítomen v buňkách v nízkých koncentracích. Jeho exprese však může být stimulována prozánětlivými cytokiny, jako je tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukiny (IL-1, IL-11) a interferon  $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ) (Hubbard et al., 2000; Dustin et al., 1986; Spoelstra et al., 1999; Inoue et al., 2011; Hosokawa et al., 2006; Defrere et al., 2008; Thomson et al., 1999; Becker et al., 1991; Fonsatti et al., 1997; Whiteman et al., 2008; Jung et al., 2012). Cytokiny například mohou spustit proteolytické štěpení extracelulární domény ICAM-1, čímž vznikne biologicky aktivní fragment (sICAM-1) se schopností ovlivnit buněčnou funkci na mnoha úrovních (Kusterer et al., 1998; Rieckmann et al., 1995; Rothlein et al., 1991).

Rozpustná forma ICAM-1 (sICAM-1) je tvořena, jak již bylo zmíněno, buď proteolytickým štěpením z buněčné membrány, nebo přímo buňkami. sICAM-1 je přítomný v tělesných tekutinách jako je mozkomíšní mok, synoviální tekutina, sliny, moč a bronchiální sekret (Witkowska et al., 2004).

Hladina ICAM-1 je zvýšena u topických nebo generalizovaných zánětlivých stavů jako je ateroskleróza, alergické astma, septický šok, zánětlivé a alergické kožní onemocnění, infarkt, autoimunitní onemocnění nebo u malignit (Witkowska et al., 2004).

### **2.3.2 VEGF**

VEGF je zkratkou pro vaskulární endotelový růstový faktor. Je znám také jako faktor cévní permeability (VPF). Původně byl popsán jako specifický mitogen pro endotelové buňky (Ferrara et al., 1992). Je produkován mnoha typy buněk, jako jsou nádorové buňky (Boockock et al., 1995; Itakura et al., 2000), makrofágy (Sunderkotter

et al., 1994), krevní destičky (Verheul et al., 1997), keratinocyty (Frank et al., 1995) a renální buňky (Iijima et al., 1993).

Činnost VEGF není omezena jen na cévní systém, VEGF hraje roli v normálních fyziologických funkcích jako je tvorba kostí (Gerber et al., 1999), krvetvorba (Ferrara et al., 1998), hojení ran (Chintalgattu et al., 2003). Je také nejsilnější a primární endotelově specifický angiogenní růstový faktor, a to jak za fyziologických, tak i za patologických podmínek. VEGF signalizace je nutná pro normální vaskulární vývoj a homeostázu, ale také se aktivně zapojuje např. do progresu nádoru (Shibuya, 2008).

Signální dráha VEGF je často ovlivněna ROS. Exogenní ROS stimulují expresi VEGF u různých typů buněk, zatímco endotelovou buněčnou migraci a proliferaci indukovanou VEGF způsobuje intracelulární ROS (Ushio-Fukai et al., 2002; Ruef et al., 1997; Knighton et al., 1983; Chua et al., 1998; Wang et al., 2011).

Vztah mezi oxidačním stresem a angiogenezí je tedy ovlivněn signálními dráhami VEGF (Bir et al., 2012). Vztah mezi ROS a angiogenezí je podložen faktem, že peroxid vodíku indukuje expresi VEGF v buňkách hladké svaloviny cév a stejně tak endotelovými buňkami a tím podněcuje angiogenní odpověď (Chua et al., 1998; Ruef et al., 1997).

Existuje také souvislost VEGF s aterosklerózou (Yang et al., 2003). Produkce VEGF monocytárními buňkami a makrofágy je zvýšena oxidovanými LDL částicemi. Makrofágy tyto oxidované lipoproteiny o nízké hustotě pohlcují, což způsobuje vznik pěnových buněk v aterosklerotických lézích (Ross, 1993). VEGF také zvyšuje cévní propustnost a produkce VEGF pěnovými buňkami a makrofágy může zhoršit aterosklerózu tím, že zvyšuje propustnost cév pro částice LDL (Ramos et al., 1998).

### **2.3.3 COX-2**

Cyklooxygenáza (COX) je enzym, který zajišťuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny, prostacyklin a tromboxany. Je exprimována ve dvou isoformách: konstitutivní COX-1 a indukibilní COX-2 (Mitchell et al., 2006).

COX-1 je spojována s fyziologickými procesy jako ochrana gastrointestinálního traktu nebo agregace trombocytů. COX-2 je indukována cytokiny a mitogeny a podílí se na mechanismu zánětu, bolesti, angiogeneze a rakoviny (Nicholas et al., 2014).



COX-2 je jinak známý také jako prostaglandin-endoperoxid syntáza 2 (PTGS2). Jak již bylo zmíněno, podílí se na konverzi kyseliny arachidonové na prostaglandiny (Hla et al., 1992). Jedná se o homodimer, kdy každý monomer enzymu má peroxidázové a cyklooxygenázové aktivní místo. Obě tato místa se účastní konverze. Nejdříve cyklooxygenázové aktivní místo katalyzuje vznik prostaglandinu G2 (PGG2), který je v druhém kroku redukován za pomoci peroxidázy na prostaglandin H2 (PGH2). Ten je pak transformován tkáňově specifickými isomerázami na prostaglandiny (PGD2, PGE2, PGF<sub>2α</sub>), prostacyklin (PGI2) nebo tromboxan A2 (O'Banion, 1999).

Účinnost cyklooxygenáz a tím produkce prostaglandinů je inhibována nesteroidními protizánětlivými léky. Vzhledem k tomu, že COX-1 se vyskytuje v mnoha tkáních neustále a tvorba prostaglandinů právě touto isoformou COX má význam mimo jiné v ochraně žaludeční sliznice, má inhibice tohoto enzymu nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt a může přispět k tvorbě žaludečních vředů. Naproti tomu inhibice COX-2, která je inducibilní a její výskyt je zvýšen například při zánětu, nevykazuje tolik vedlejších nežádoucích účinků (Kurumbail et al., 2001).

Bohužel se však ukázalo, že inhibice COX může také podstatně zvýšit riziko kardiovaskulárních příhod. COX-2 je totiž rovněž producentem prostaglandinů, z nichž důležitou roli má prostacyklin. Jedná se o prostaglandin, který je tvořen cévním endotelem. Má vasodilatační účinky a také inhibuje agregaci krevních destiček. Působí tedy opačným mechanismem než tromboxan, který je tvořen COX-1 a který naopak agregaci destiček zvyšuje. Pokud je tedy inhibována COX-2, nevzniká prostacyklin a dochází ke zvýšené agregaci destiček, což má za následek vyšší riziko kardiovaskulárních příhod (Gryglewski et al., 1978).

### **2.3.4 SOD3**

Superoxid dismutáza (SOD) se řadí k antioxidačním enzymům, které jsou důležitou součástí obrany vůči oxidačnímu stresu. Mezi nejdůležitější enzymy patří právě superoxid dismutáza, dále kataláza, glutathion peroxidáza a glutathion reduktáza (Matoušková et al., 2014).

U lidí a jiných savců existují tři formy SOD. SOD1 se nachází v cytoplasmě, SOD2 v mitochondriích a SOD3 v extracelulárním prostoru. SOD1 a SOD3 obsahují

měď a zinek, zatímco SOD2 obsahuje mangan. SOD přispívají ke zmírnění oxidačního stresu a tím zabraňují poškození DNA, RNA, proteinů a lipidů (Skalická et al., 2012). Kovy, které SOD obsahují, jsou důležitou součástí enzymů, působí jako kofaktory, díky kterým jsou antioxidační enzymy aktivní a mohou tak katalyzovat oxido-redukční reakce (Fukai et al., 2011).

SOD3, extracelulární Cu/Zn obsahující SOD (ecSOD) je hlavní SOD v cévním extracelulárním prostoru. U většiny druhů se jedná o homotetramer, skládající se ze dvou disulfidicky spojených dimerů. Primárně je ve tkáních umístěn v extracelulární matrix a na povrchu buněk. Malá část je i v plazmě a extracelulárních tekutinách. V určitých tkáních se vyskytuje ve větší míře, např. v krevních cévách, plicích, ledvinách nebo v děloze, a v menší míře v srdci (Folz et al., 1994; Marklund, 1984; Ookawara et al., 1998; Stralin et al., 1995).

V cévní tkáni je SOD3 syntetizován především buňkami vaskulárního hladkého svalstva a fibroblasty (Stralin et al., 1995). V poraněné tkáni a u aterosklerózy se SOD3 nachází také v zánětlivých buňkách (Fukai et al., 1998; Luoma et al., 1998; Tan et al., 2006). Funkcí SOD3 je katalyzování dismutace  $O_2^{\bullet-}$  na  $H_2O_2$  (Go et al., 2011).

Cévní SOD3 je lokalizována ve vysokých koncentracích mezi endotelem a hladkým svalcem, kde NO stimuluje relaxaci hladkého svalstva (Oury et al., 1996). A vzhledem ke svému extracelulárnímu umístění hraje důležitou roli v zamezení destrukce  $NO^{\bullet}$  uvolněného z endotelu. SOD3 je tedy důležitý pro biologickou dostupnost NO. Četné patofyziologie, včetně aterosklerózy, jsou spojeny s poklesem tvorby a/nebo biologické aktivity  $NO^{\bullet}$  (Kojda et al., 1999). Za těchto podmínek, úbytek NO vede k poklesu exprese SOD3, protože eNOS je pozitivní regulátor exprese SOD3 (Fukai et al., 2000; Oppermann et al., 2008).

## 2.4 ENDOGLIN

Endoglin (jinak také označovaný CD105, TGF- $\beta$  receptor III) je membránový glykoprotein, patřící do rodiny TGF- $\beta$  proteinů (transformujících růstových faktorů) (Lopez-Novoa et al., 2010). Účastní se regulace signálních cest TGF- $\beta$  (Albert et al., 2001).

Endoglin je homodimer, který se skládá ze dvou podjednotek, které jsou vázány disulfidickou vazbou. Existují dvě isoformy endoglinu: L-isoforma a S-isoforma. Liší

se ve schopnosti fosforylace a regulace TGF- $\beta$  cest. Obecně se dá říci, že L-isoforma má pro-angiogenní efekt, zatímco S-isoforma má efekt opačný, antiangiogenní (Blanco et al., 2008).

Expresi endoglinu je soustředěna především v buňkách, které se nacházejí v cévní stěně. Jedná se především o endotelové buňky, dále monocyty, makrofágy a mezenchymální buňky, včetně fibroblastů a buněk hladkého svalstva cév (Conley et al., 2000). Expresi endoglinu zvyšují různé patologické stavy, např. hypoxie nebo poranění cévy (Sanchez-Elsner et al., 2002). Obecně, vývoj kardiovaskulárního systému, vývoj cév a cévní homeostáza silně ovlivňuje expresi endoglinu (Lopez-Novoa et al., 2010).

Je dokázáno, že endoglin hraje roli v řadě metabolických a kardiovaskulárních onemocnění jako je preeklampsie (De Vivo et al., 2008), hypertenze a diabetes mellitus (Lopez-Novoa et al., 2010, Blazques-Medela et al., 2010).

#### **2.4.1 Tkáňový endoglin**

Membránově vázaný endoglin je tvořen z větší extracelulární domény a kratší cytosolové domény (Gougos et al., 1990). V asociaci s transmembránovým serin/threonin kinázovým receptorem typu I (označený jako aktivin like kináza-ALK) a receptorem typu II, váže TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 3 isoformy a tvoří funkční receptorový komplex (Blanco et al., 2005; Santibanez et al., 2011).

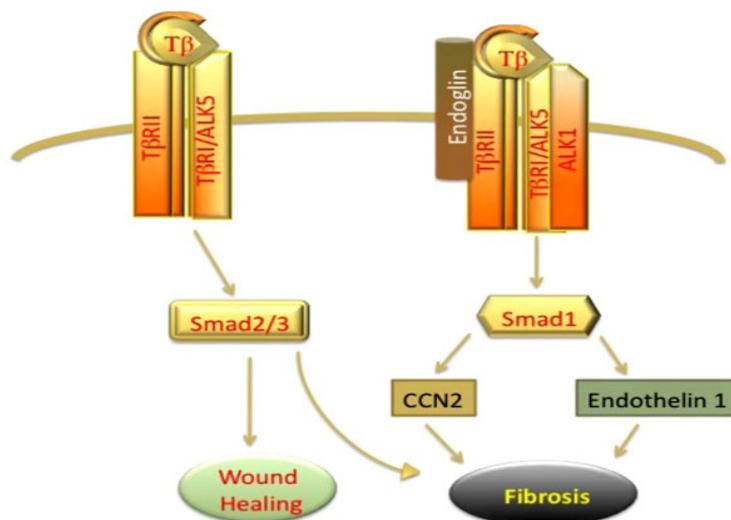
Endoglin nelze nazvat pravým receptorem, ale značně ovlivňuje aktivitu TGF- $\beta$ RII, ALK-1 a ALK-5 (Guerrero-Esteo et al., 2002). Studie ukázaly, že pravděpodobně ovlivňuje TGF- $\beta$  signalizaci modulací aktivity ALK a proteinů, které fungují jako intracelulární signální přenašeči a jsou označovány jako Smad proteiny (Tian et al., 2010; Santibanez et al., 2007).

Endoglin vystupuje jako koreceptor pro transformující růstový faktor  $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 je cytokin, který je součástí signalizační kaskády, která vede k hypertrofii kardiomyocytů a srdeční fibróze, procesům, které jsou označovány jako srdeční remodelace (Berk et al., 2007). TGF- $\beta$ 1 je profibrogenní cytokin, který přispívá k mnoha fibroproliferativním poruchám, včetně srdeční fibrózy spojené se srdečním selháváním (Leask, 2007). Odpovědí na angiotensin II je zvýšení exprese TGF- $\beta$ 1, což vede k přeměnám fibroblastů na myofibroblasty a vytváří proteiny extracelulární matrix, jako je kolagen typu I (Massague, 1998). Nadbytek kolagenu způsobuje

zvýšení tuhosti levé komory srdeční, porušuje kontraktilitu myocytů, narušuje elektrické propojení a zhoršuje tkáňovou hypoxii a tím podporuje srdeční selhání (Berk et al., 2007).

Po aktivaci TGF- $\beta$ 1 dochází k fosforylaci Smad proteinů. Konkrétně fosforylace Smad-2/3 vede k syntéze kolagenu typu I a fibróze (Leask, 2007; Massague, 1998).

**Obrázek 2:** Vliv endoglinu na fibrózu



TGF- $\beta$  aktivuje Smad2/3 a Smad1. Aktivace Smad2/3 podporuje hojení ran. Zvýšená hladina endoglinu ve fibroblastech podporuje Smad1 signalizaci, což vede ke zvýšené regulaci CCN2 (faktor spojený s fibrózou hrající roli při vytváření a udržování fibrotických lézí) a fibróze.

Převzato: <<http://benthamopen.com/FULLTEXT/TORJ-6-156>> (vid. 10.12.2015)

Endoglin je rovněž potřebný pro rozvoj buněk hladkého svalstva. Produkci extracelulární matrix ovlivňuje růst aterosklerotických lézí a produkci kolagenu ovlivňuje stabilitu plátu (Trostdorf et al., 2005).

Vzhledem k tomu, že se endoglin účastní řady patologických stavů, včetně aterosklerózy a srdečního selhávání, ukazuje se, že by mohl sloužit i jako jeden z biomarkerů chorob postihujících kardiovaskulární systém (Kapur et al., 2010; Němečková et al., 2015).

## 2.4.2 Solubilní endoglin

Solubilní endoglin (sENG) vzniká odštěpením koncové NH<sub>2</sub> části z membránově vázaného endoglinu (Venkatesha et al., 2006), který se nachází na různých buňkách, včetně endotelových. Štěpení se děje pomocí enzymu matrix metaloproteázy-14 (MMP-14) (Hawinkels et al., 2010; Valbuena-Diez et al., 2012).

sENG se účastní procesu aterosklerózy a je detekovatelný v krevním séru a cévách jak pacientů, tak experimentálních zvířat. Jeho exprese souvisí s migrací a proliferací buněk hladkého svalstva cév a také s regulací endotelových funkcí (sENG zvyšuje expresi adhezních molekul, počet leukocytů a zhoršuje cévní funkce, za které odpovídá endotel) (Walshe et al., 2009). Podporuje tedy endotelovou dysfunkci, která je rozhodujícím stupněm v rozvoji aterosklerózy (Davignon et al., 2004; Keaney, 2000; Najemnik et al., 1999).

Pravděpodobně se také účastní neoangiogeneze v již vytvořených aterosklerotických lézích, stabilizace aterosklerotického plátu a protizánětlivých reakcí a zlepšení endotelové dysfunkce. Předpokládá se, že zvýšená hladina sENG inhibuje TGF- $\beta$  signalizaci v cévní stěně, která by mohla představovat mechanismus důležitý pro rozvoj dysfunkce endotelu, aterosklerózy a nakonec i komplikací spojených s nemocemi koronárních cév (Nachtigal et al., 2012).

Zvýšená hladina sENG souvisí se strukturou aterosklerotického plátu a má tak vztah i k nestabilní angině pectoris, akutnímu infarktu myokardu a remodelaci srdce po infarktu (Cui et al., 2008). Ukazuje se, že sENG, na rozdíl od tkáňového endoglinu, tlumí TGF- $\beta$ 1 signalizaci, která se účastní procesu fibrózy (Kapur et al., 2012).

Pro studie, týkající se molekuly solubilního endoglinu a jeho patogenního vlivu, byl vytvořen transgenní model myši, který byl použit také v experimentální části této práce. Je specifický tím, že obsahuje gen pro lidský solubilní endoglin. Exprese tohoto genu způsobuje vysokou hladinu sENG v organismech myši a díky tomu nám může pomoci ve zkoumání funkce a významu molekuly sENG v patologických stavech (Němečková et al., 2015).

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo porovnat expresi vybraných molekul v srdeční stěně experimentálních zvířat pomocí metody Western blot. Jednalo se konkrétně o stanovení exprese molekul, které jsou markery zánětu a proliferace: ICAM-1, VEGF, COX-2 a SOD-3. Tyto markery nám mohou pomoci zhodnotit i funkci resp. dysfunkci endotelu, která úzce souvisí s mnoha kardiovaskulárními onemocněními, včetně aterosklerózy.

Pro porovnání byla vybrána skupina transgenních myší s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu (Sol-Eng<sup>+</sup>) a skupina kontrolní, která se skládala ze sourozeneckých myší skupiny Sol-Eng<sup>+</sup>, ale jejichž hladina solubilního endoglinu byla velmi nízká (nedekovatelná). Obě skupiny myší byly krmeny standardní laboratorní dietou.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 POUŽITÁ ZVÍŘATA

Pro účely výzkumu byl vytvořen speciální transgenní kmen myší CBAxC57BL/6J, jehož genetická informace byla upravena a to konkrétně tak, že do organismu myší byl vložen gen pro lidský solubilní endoglin. Tento kmen byl vytvořen Univerzitou v Salamance ve Španělsku (Genetically Modified Organisms Generation Unit). Vpravený gen do myšího organismu způsobil vysokou expresi molekuly sENG v myším organismu.

K experimentům byl použit transgenní model myších samic s vysokou hladinou sENG (Sol-Eng<sup>+</sup>) a sourozenské samice Sol-Eng<sup>+</sup> skupiny, u které byly naopak hladiny sENG nízké (tato skupina sloužila jako kontrolní). Obě skupiny byly tvořeny samicemi, které při ukončení experimentu dosáhly věku 9 měsíců. Skupina s vysokou hladinou sENG obsahovala 6 jedinců a kontrolní skupina 7 jedinců.

Obě skupiny myších samic byly chovány při konstantní teplotě a vlhkosti a byl u nich dodržován dvanácti hodinový světelný cyklus. Měly volný přístup k vodě a krmeny byly standardní laboratorní dietou.

Všechny experimenty byly prováděny v souladu se směrnicí Evropské unie (86/609/EEC) a používání laboratorních zvířat bylo schváleno Etickou komisí na ochranu zvířat proti krutosti Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Karlovy Univerzity v Praze a Bioetickou komisí Univerzity v Salamance.

Všechny zákroky byly prováděny v anestezii a dbalo se na to, aby bylo co nejvíce minimalizováno utrpení zvířat.

## 4.2 ELISA ANALÝZA HLADIN SOLUBILNÍHO ENDOGLINU

Pro zjištění hladiny solubilního endoglinu u samic transgenního kmene myši byla použita imunoanalytická metoda, tzv. ELISA analýza. Hodnoty byly zjištěny z plazmy odebrané ze špičky ocasu myši. Ke stanovení hladin solubilního endoglinu byl použit Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA). Podle výsledků analýzy byly myši rozděleny do dvou skupin, sledované s vysokou hladinou solubilního endoglinu (Sol-Eng<sup>+</sup>) a kontrolní skupiny s velmi nízkou hladinou solubilního endoglinu.

## 4.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ-HOMOGENIZACE

Western blot analýza je jednou z imunoanalytických metod, která se používá k identifikaci proteinu ze vzorku, který je ve formě buněčných či tkáňových lyzátů.

Ještě před samotnou analýzou bylo nutné si připravit vzorky, které byly předmětem naší studie. V našem případě to byla myši tkáň, konkrétně srdce. Odebranou část srdce jsme nejprve zvážili a poté dali do zkumavek. Tkáň bylo nutné uchovávat stále u ledu.

V dalším kroku byl ke tkáni přidán RIPA pufr, který způsobil potřebnou lýzu buněk. Množství RIPA pufru je dáno takto: na 1 gram tkáně připadne 20 ml RIPA pufru. Aby nedošlo k předčasnému rozkladu proteinů, bylo nutné přidat ke tkáni ještě inhibitory proteáz a fosfatáz. Množství inhibitorů se odvodilo od množství přidaného RIPA pufru a to konkrétně takto: na 1 ml RIPA pufru připadlo 10 $\mu$ l inhibitorů proteáz a fosfatáz.

Takto připravený obsah zkumavek jsme nůžkami nastříhali na co nejmenší části. Poté byla tkáň ještě mixována rotor-statorem do vzniku homogenní tekutiny.

Dále byly zkumavky s homogenní tekutinou centrifugovány. Centrifugu bylo třeba zapnout 30 minut před prací a nastavit otáčky (10000 RPM), teplotu (4°C) a čas (10 minut).

Po vyjmutí zkumavek z centrifugy jsme pipetou odsáli supernatant, tekutinu, která již sloužila jako náš výsledný vzorek, se kterým jsme dále pracovali.



### 4.3.1 Stanovení koncentrace proteinů

Protože předmětem našeho zkoumání byly proteiny ve vzorku, bylo nutné nejprve zjistit jejich přesnou koncentraci. K tomuto jsme využili spektrofotometrii, pomocí níž jsme zjistili nejprve absorbanci vzorku a z této hodnoty byla poté vypočtena koncentrace proteinu ve vzorku.

Než jsme ale začali proměřovat absorbance vzorků, bylo třeba nejprve stanovit kalibrační křivku standardu, roztoku o známé koncentraci. V našem případě se jednalo o roztok albuminu. Připravila se řada roztoků naředěného albuminu (v koncentraci od 0  $\mu\text{g/ml}$  do 1500  $\mu\text{g/ml}$ ), kterým byla proměřena absorbance, a ze získaných hodnot sestavena kalibrační křivka.

Z obou skupin vzorků (kontrolní skupiny i skupiny Sol-Eng+) byl vybrán jeden vzorek jako referenční. Z něj bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  a přidána voda v množství, aby vzniklo požadované ředění (10x, 20x, 30x, 50x).

Do jamek mikrotitrační destičky jsme nanесли 25  $\mu\text{l}$  vzorku i albuminu. Toto bylo třeba pipetovat v duplikátu. Dále byla nanesena směs reakčních činidel, která zapříčinila barevnou reakci. V našem případě vzniklo fialové zbarvení. Takto připravená mikrotitrační destička se vložila na 30 minut do termostatu, který byl nastaven na 37 °C.

Poté se proměřila absorbance. Cílem bylo najít takovou hodnotu, která se nejvíc blížila hodnotě středu kalibrační křivky albuminu. V našem případě tato hodnota odpovídala vzorku, který byl naředěn 30x.

Posledním krokem, vedoucím k získání koncentrace proteinů ve vzorku, bylo nanést do jamek druhé mikrotitrační destičky 25  $\mu\text{l}$  vzorku, albuminu, opět vše v duplikátu, přidat reagenty a takto destičku opět nechat inkubovat v termostatu při 37°C na 30 minut. Poté proměřit intenzitu zbarvení při vlnové délce 562 nm. Ze získaných hodnot jsme pomocí počítače vypočítali koncentraci proteinu a ředění, které bylo potřeba pro přípravu vzorků pro samotnou gelovou elektroforézu.

## 4.4 WESTERN BLOT ANALÝZA

Western blot analýza je imunoanalytická metoda, jejíž postup zahrnuje tři kroky:

- gelovou elektroforézu
- blotování
- imunodetekci.

### 4.4.1 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je prvním krokem analýzy, díky které dojde v elektrickém poli k separaci proteinů ve vzorku podle své molekulové hmotnosti.

#### *Příprava gelů*

Před samotnou elektroforézou bylo nutné si nejprve připravit separační a zaostřovací gel pomocí aparatury. Ta se skládala ze stojánku a z držáku skel, kam se vkládala čistá a osušená skla, jedno delší a jedno kratší, které se umístilo dopředu. Před samotným litím gelu bylo třeba ověřit těsnost aparatury pomocí destilované vody.

Pro gelovou elektroforézu je možné připravit separační gely různých koncentrací podle molekulové hmotnosti sledovaného proteinu. Pro naši práci jsme použili gely v koncentraci 8%, 10% a 12%. Zaostřovací gel má vždy stejnou koncentraci. Složení gelů je uvedeno v tabulce 1. Množství složek je uvedeno pro přípravu dvou gelů.

**Tabulka 1:** Složení gelů pro elektroforézu

		Separační gel			Zaostřovací gel
Složky gelu	8%	10%	12%		
Milli-Q voda	10,8	9,8	8,8	6,15	
Separating gel buffer	5	5	5	-	
Stacking gel buffer	-	-	-	2,5	
Akrylamid	4	5	6	1,25	
10% SDS	0,2	0,2	0,2	0,1	
10% APS	0,06	0,06	0,06	0,03	
TEMED	0,03	0,03	0,03	0,015	

Nejprve jsme připravili separační gel smísením všech potřebných složek, jako poslední se přidával TEMED, po jehož přidání začala polymerizace. Takto připravený roztok se mohl pipetovat mezi skla do výšky těsně pod okrajem kratšího sklíčka. Následně bylo třeba odstranit bubliny vzniklé pipetováním gelu mezi skla. Tohoto jsme docílili převrstvením gelu malým množstvím isobutanolu. Poté zhruba 60 minut trvala polymerizace. Jako kontrola, zda došlo ke ztuhnutí gelu, nám sloužil zbytek gelu v kádince. Po vytvoření gelu jsme isobutanol vylili.

Dalším krokem byla příprava zaostřovacího gelu. Postup byl stejný jako u separačního gelu. Po napipetování gelu jsme vložili hřeben, který vytváří v gelu jamky pro nanášení vzorků. Poté bylo ještě třeba, do doby než začal gel tuhnout, na koncích hřebene přidávat gel a zamezit vzniku bublin, které by mohly poškodit jamky. Gel se nechal tuhnout opět zhruba hodinu.

### ***Příprava vzorků***

Podle tabulky s koncentracemi proteinu jsme naředili vzorky do 0,5 ml mikrozkumavek. Celkový objem naředěného vzorku byl 60  $\mu$ l. Z tohoto objemu jsme odebrali 7  $\mu$ l a přidali 7  $\mu$ l nanášecího pufru (Sample buffer). Vzorek s pufrem jsme promíchali a nechali 5 minut v termobloku při teplotě 95°C. Poté se vzorek nechal vychladnout a takto byl připraven na nanášení do gelu.

### ***Aplikace vzorku na gel a elektroforéza***

Po uplynulé době potřebné k vytvoření gelu jsme vyndali hřeben a vzniklé jamky propláchli elektroforetickým pufrem. Takto připravené gely mezi skly jsme opatrně vyndali ze zeleného stojánku a přesunuli do držáku do elektroforetické vany. Komora vzniklá mezi skly se naplnila elektroforetickým pufrem.

Dalším krokem bylo pipetování vzorků do jamek v gelu. Do první jamky se nejprve napipetoval hmotnostní marker (standard o známých molekulových hmotnostech) v objemu 5  $\mu$ l. Objem pipetovaných vzorků byl 10  $\mu$ l. Poté se vana naplnila elektroforetickým pufrem, uzavřela se, připojila ke zdroji a bylo možné zahájit samotnou elektroforézu. Ta probíhala 75 minut při napětí 200 V a na každý gel bylo třeba nastavit proud o velikosti 15 mA. Takto připravenou elektroforetickou vanu jsme ještě z důvodu chlazení obložili chladícími destičkami.

Po uplynutí doby nastavené pro elektroforézu jsme vanu odpojili. Jako kontrola proběhnuté separace proteinů nám sloužil viditelný hmotnostní marker a bromfenolové čelo na spodním okraji gelu.

#### 4.4.2 Blotování

Pomocí tohoto kroku je docíleno přenosu proteinů z gelu na membránu. Pro blotování je možno použít buď polyvinyliden difluoridovou membránu (PVDF membrána) nebo nitrocelulóзовou membránu (NC membrána). V našem případě jsme použili PVDF membránu.

Pro přenos proteinů z gelu na membránu lze použít dvě metody. Jedná se buď o tzv. polosuchou (semi-dry), nebo mokrou cestu. My jsme v průběhu naší práce použili obě varianty. Pro přenos proteinů s nižší molekulovou hmotností jsme využívali polosuchou cestu a pro proteiny s vyšší molekulovou hmotností se ukázala jako vhodnější varianta mokrá cesta.

Pro obě varianty přenosu bylo třeba si nejdříve připravit membránu. Tu jsme nejprve nastříhali podle velikosti gelu. Takto připravenou membránu bylo třeba zaktivovat tím, že se namočila nejdříve na 15 sekund do methanolu a poté na 2 minuty do destilované vody.

##### *Polosuchá cesta*

Pro tuto variantu blotování jsme použili přístroj Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Ten je tvořen jako soustava anody (spodní díl) a katody (horní díl). Pomocí elektrického pole pak dojde k přenosu proteinů z gelu na membránu.

Na anodu jsme položili silný filtrační papír, který jsme předtím namočili do transferového pufru. Na tento filtrační papír jsme položili zaktivovanou PVDF membránu. Držáky, ve kterých byla umístěna skla s gelem, jsme vyjmuly z elektroforetické vany. Skla jsme vyndali a opatrně od sebe oddělili, abychom nepoškodili gel a nejlépe tak, aby nám gel zůstal na delším skle. Poté jsme oddělili zaostřovací gel a sklo jsme ponořili do transferového pufru a namáčením jsme docílili oddělení gelu od skla. Gel jsme pomocí plastové destičky přenesli na membránu a překryli dalším silným filtračním papírem namočeným v transferovém pufru. Poté jsme přiklopili katodu, přístroj uzavřeli víkem a zapojili ke zdroji. Pro přenos jsme nastavili tyto podmínky:

- napětí – 25 V
- proud – hodnota dle počtu blotovaných gelů (200 mA/4 gely)
- čas – 75 minut pro přenos 4 gelů.

Po uplynutí stanovené doby jsme přístroj odpojili od zdroje, sundali víko a katodu a opatrně odstranili gel. Membránu jsme vložili do vody, aby nevysychala. Takto byla připravena k imunodetekci.

### ***Mokrá cesta***

Tato varianta blotování se ukázala jako vhodnější pro přenos proteinů s vyšší molekulovou hmotností. K tomuto jsme využili přístroj Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). Ten se skládal z vany, elektrodového modulu, kazety, do které se vkládal gel s membránou spolu s navlhčenými filtračními papíry a pěnovými podložkami, a chladicí jednotky.

Při tomto blotování bylo nutné všechny komponenty, se kterými jsme pracovali, neustále namáčet a zvlhčovat v transferovém pufru. Kazetu jsme si položili černou stranou dolů. Na ní jsme položili zvlhčenou pěnovou podložku, na ní zvlhčený silný filtrační papír, na něj gel, poté membránu a opět filtrační papír a pěnovou podložku. Kazetu jsme uzavřeli a vložili do modulu do vany a přidali chladicí jednotku. Vanu jsme naplnili elektroforetickým pufrem, uzavřeli víkem a připojili ke zdroji. Nastavení pro mokrou cestu bylo následující:

- napětí – 75 V
- proud – 300 mA
- čas – 90 minut.

Po proběhlém přenosu jsme odpojili zdroj, vyjmuli modul s kazetou, otevřeli, sejmuli pěnovou podložku, filtrační papír a membránu vložili do destilované vody, stejně jako u polosuché cesty. Membránu jsme si nastříhali na proužky podle molekulových hmotností stanovovaných proteinů.

### **4.4.3 Imunodetekce**

Posledním krokem analýzy byla imunodetekce, během níž dochází k navázání protilátek (primárních a sekundárních) na námi stanovovaný protein. Navázaná sekundární protilátka je značená enzymem, který je schopen po reakci s chemiluminiscenčním činidlem vyvolat luminiscenci. Tato reakce umožní po přiložení fotografického filmu vytvořit obraz navázaných protilátek. Podle intenzity luminiscence lze vyhodnotit množství stanovovaného proteinu, které je úměrné vzniklému signálu.

### ***Blokování***

Před samotnou detekcí je třeba ještě zablokovat nescifická vazebná místa na membráně. K tomuto jsme použili 5 % roztok sušeného nízkotučného mléka. Tento roztok bylo nutné si nejprve připravit rozpuštěním sušeného mléka v TBS-T roztoku a takto připravený nechat alespoň hodinu míchat. V takto připraveném blokačním činidle jsme nastříhané proužky membrány nechali hodinu blokovat při pokojové teplotě na třepačce.

### ***Inkubace s primárními protilátkami***

Po hodině blokace jsme membrány vložili do roztoku primární protilátky rozpuštěné v 5% roztoku mléka, umístili na kývačku do lednice a nechali přes noc inkubovat. Nastavení primárních protilátek pro jednotlivé proteiny bylo následující:

- Rabbit anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, USA): v ředění 1:500
- Mouse anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, USA): v ředění 1:500
- Rabbit anti-COX-2 (Proteintech, USA): v ředění 1:500
- Mouse anti-SOD-3 (Abcam, UK): v ředění 1:1000
- Mouse anti-GAPDH (pro potvrzení jednotné nanášky proteinů, Sigma-Aldrich, USA): v ředění 1:10000

### ***Promývání***

Druhý den jsme kývačku vyndali z lednice a membrány promyli v roztoku TBS-T. Nejprve třikrát rychle a poté šestkrát po deseti minutách. Tímto jsme zajistili vymytí nenavázané primární protilátky. Během promývání jsme si naředili sekundární protilátky v roztoku mléka.

### ***Inkubace se sekundárními protilátkami***

Sekundární protilátky byly v našem případě značeny křenovou peroxidázou, která způsobuje požadovanou chemiluminiscenci. Takto označená sekundární protilátka se váže na primární protilátku.

Po promytí jsme membrány přesunuli do vaniček s napipetovanými sekundárními protilátkami a nechali hodinu při pokojové teplotě inkubovat na kývačce. Nastavení sekundárních protilátek pro jednotlivé markery bylo následující:

- ICAM-1: Goat Anti-Rabbit IgG-(Fab')<sub>2</sub> (HRP) (Abcam, UK) v ředění 1:1000

- VEGF: Goat Anti-Mouse IgG-peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) v ředění 1:1000
- COX-2: Goat Anti-Rabbit IgG-(Fab')<sub>2</sub> (HRP) (Abcam, UK) v ředění 1:5000
- SOD-3: Goat Anti-Mouse IgG-peroxidase (Sigma - Aldrich, USA) v ředění 1:2000
- GAPDH: Goat Anti-Mouse IgG-peroxidase (Sigma - Aldrich, USA) v ředění 1:20000

Po inkubaci se sekundárními protilátkami jsme membrány promývali stejným způsobem jako po inkubaci s primárními protilátkami.

### ***Detekce***

Na detekci jsme potřebovali detekční roztok (síla roztoku dle sledovaného markeru), který jsme připravili smícháním složky 1 a 2 v takovém množství, aby byla celá membrána pokrytá. Po přesně stanoveném čase jsme slili detekční roztok z membrány, odsáli pomocí buničiny zbylý roztok, membránu jsme vložili do průhledné fólie a poté do kazety.

Další kroky bylo nutné konat v temné komoře. Díky reakci křenové peroxidázy s detekčním činidlem jsme vzniklou chemiluminiscenční reakci v místě hledaného proteinu mohli zachytit na přiloženém fotografickém filmu.

Nejprve jsme si připravili roztok vývojky a ustalovače a vodu na oplachování vyvolaných filmů. Poté jsme mohli přistoupit k samotnému vyvolávání, které už probíhalo za tmy. Vyjmuli jsme film, upravili velikost podle potřeby, otevřeli kazetu a přiložili film na membrány ve fólii a nechali exponovat. Doba expozice se lišila dle sledovaného proteinu.

### ***Vyhodnocení***

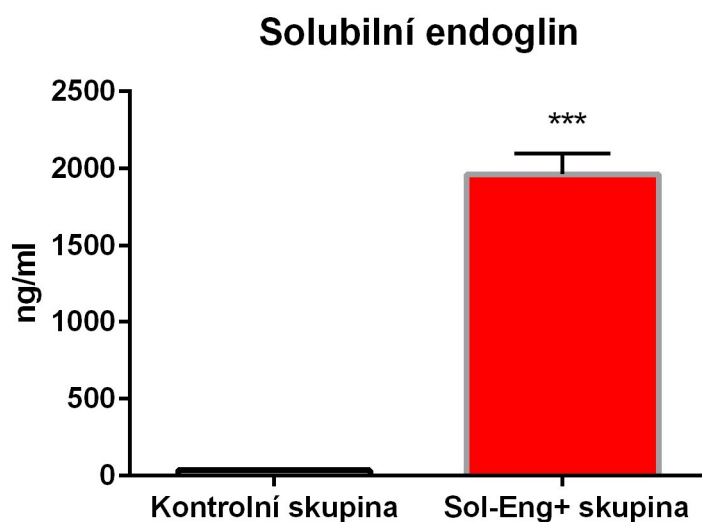
Pro vyhodnocení filmů bylo použito denzitometrické metody. Hodnocení je semikvantitativní, tedy je srovnávána intenzita bandů a nezjišťujeme přesné množství sledovaného proteinu. Výsledky z tohoto hodnocení byly poté zpracovány programem GraphPad Prism 6.0.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 ELISA analýza

U samic transgenního modelu myší byla provedena ELISA analýza, která nám poskytla informaci o expresi lidského solubilního endoglinu. Hodnoty u Sol-Eng<sup>+</sup> skupiny byly signifikantně vyšší než u skupiny kontrolní ( $36,66 \pm 1,187 \mu\text{g/ml}$  vs.  $1964 \pm 135,6 \mu\text{g/ml}$ ). Výsledek analýzy je zobrazen v grafu 1.

**Graf 1:** Hladina solubilního endoglinu u transgenního modelu myší v porovnání se skupinou kontrolní



Výsledek ukázal signifikantní rozdíl mezi skupinou transgenních Sol-Eng<sup>+</sup> myší a skupinou kontrolní ( $p \leq 0,0001$ ).



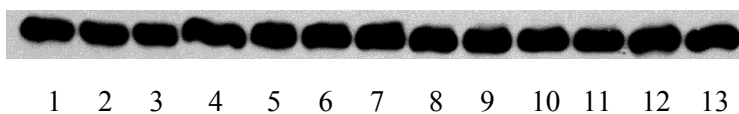
## 5.2 Western blot analýza

Western blot analýza nám poskytla informace o expresi vybraných molekul v srdeční stěně transgenního modelu myši Sol-Eng<sup>+</sup> s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu. Tuto skupinu Sol-Eng<sup>+</sup> jsme porovnávali se skupinou kontrolní, která měla oproti skupině sledované hladinu endoglinu velmi nízkou.

Výsledky získané Western blot analýzou byly dále hodnoceny statisticky. K tomuto účelu byl použit počítačový program GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Výsledky jsou prezentovány jako průměrná hodnota exprese proteinu v procentech  $\pm$  S.E.M., což je standardní chyba průměru. Pro statisticky důležité změny mezi sledovanými skupinami myši byl použit tzv. t-test a hladina  $p \leq 0,05$  byla stanovena jako statisticky významný ukazatel.

Pro potvrzení jednotné nanášky proteinů jsme detekovali GAPDH protein. Fotografie RTG snímku je na obrázku 3 (1-7 kontrolní skupina, 8-13 Sol-Eng<sup>+</sup>).

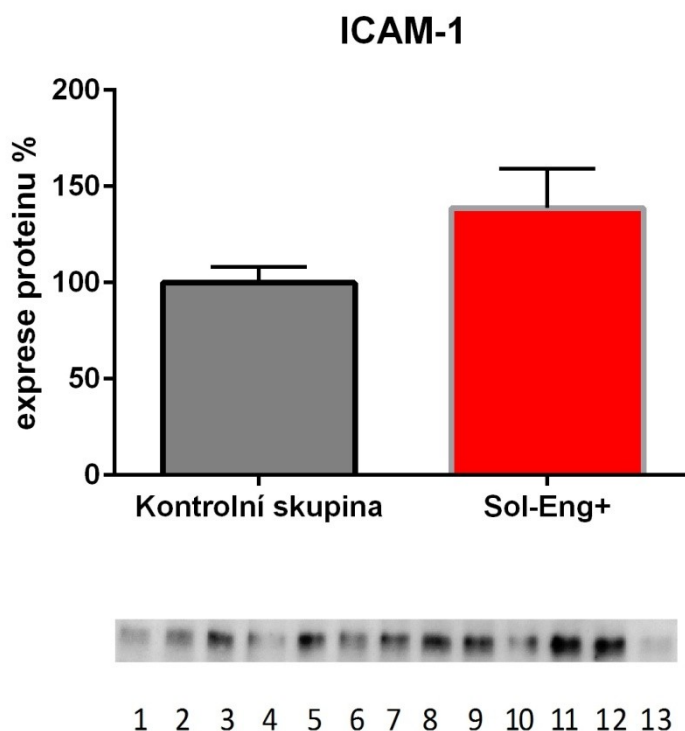


**Obrázek 3:** Foto RTG detekce proteinu GAPDH (37 kDa)

### 5.2.1 Exprese molekuly ICAM-1

V případě molekuly ICAM-1 nedošlo k signifikantnímu rozdílu v expresi mezi skupinou kontrolní a skupinou Sol-Eng<sup>+</sup> ( $100,00 \pm 8,248$  vs.  $138,8 \pm 20,45$ ;  $p=0,0893$ ). Grafické znázornění exprese molekuly ICAM-1 u obou skupin je v grafu 2.

**Graf 2:** Exprese proteinu ICAM-1



**Obrázek 4:** Foto RTG snímku detekce ICAM-1 (110 kDa)

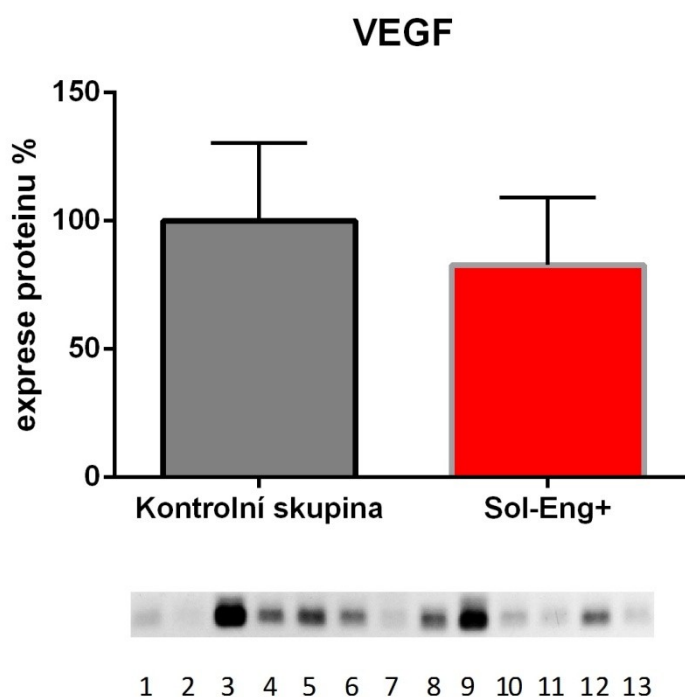
Vzorky číslo 1 – 7 patří ke kontrolní skupině, vzorky 8 – 13 ke skupině Sol-Eng<sup>+</sup>.

V porovnání se skupinou kontrolní, nedošlo u skupiny myši s vysokou hladinou sENG k signifikantnímu rozdílu v expresi molekuly ICAM-1 ( $p=0,0893$ ).

### 5.2.2 Exprese molekuly VEGF

V případě exprese molekuly VEGF nám rovněž Western blot analýza a následně její statistické zhodnocení neukázala signifikantní rozdíl v expresi mezi skupinou kontrolní a skupinou Sol-Eng<sup>+</sup> ( $100,0 \pm 30,20$  vs.  $82,65 \pm 26,23$ ;  $p=0,6783$ ). Grafické zobrazení exprese VEGF u obou skupin je v grafu 3.

**Graf 3:** Exprese proteinu VEGF



**Obrázek 5:** Foto RTG filmu detekce VEGF (25 kDa)

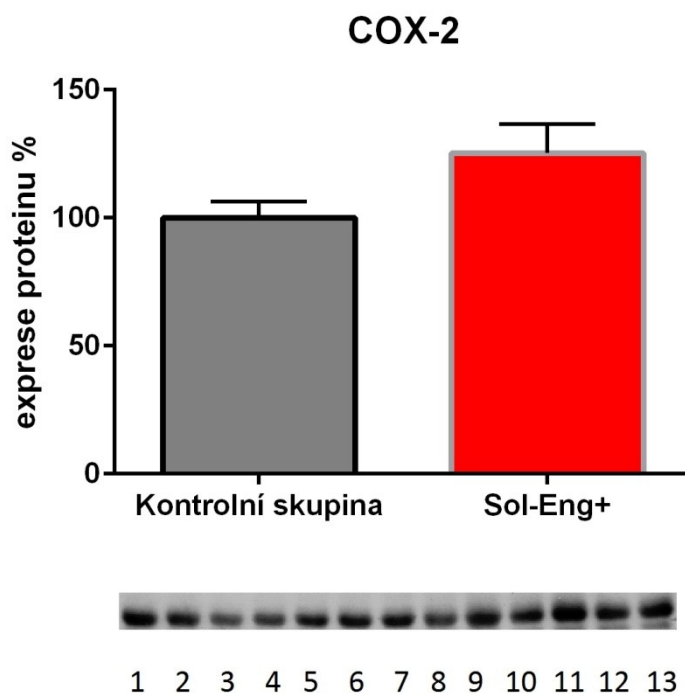
Vzorky číslo 1 – 7 patří ke skupině kontrolní, vzorky 8 – 13 ke skupině Sol-Eng<sup>+</sup>.

V porovnání se skupinou kontrolní nedošlo u sledované skupiny myši s vysokou hladinou solubilního endoglinu k signifikantní změně exprese molekuly VEGF ( $p=0,6783$ ).

### 5.2.3 Expres molekuly COX-2

V případě molekuly COX-2 se také neukázal signifikantní rozdíl v expresi molekuly mezi skupinou kontrolní a skupinou sledovanou Sol-Eng<sup>+</sup> ( $100,0 \pm 6,35$  vs.  $125,4 \pm 11,38$ ;  $p=0,0679$ ). Grafické zobrazení výsledku Western blot analýzy je v grafu 4.

**Graf 4:** Expres proteinu COX-2



**Obrázek 6:** Foto RTG snímku detekce COX-2 (55 kDa)

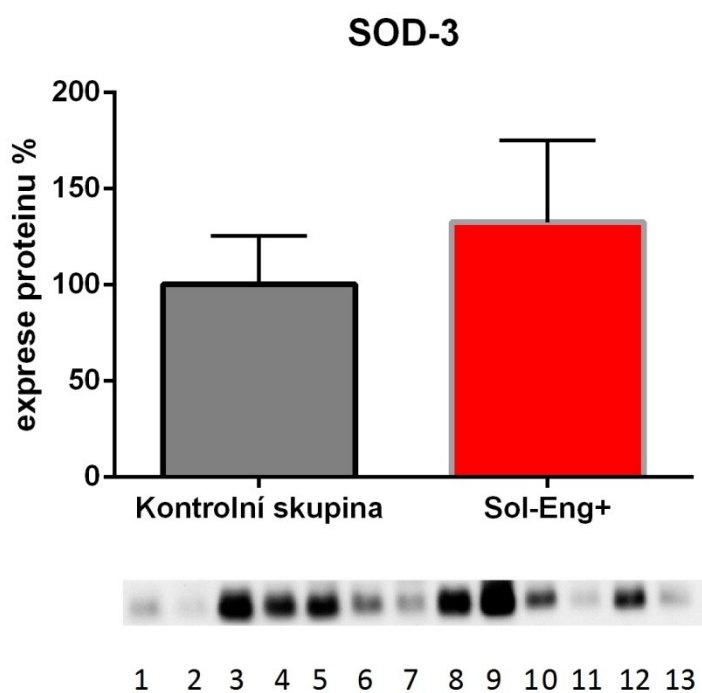
Vzorky číslo 1 – 7 patří ke skupině kontrolní, vzorky 8 – 13 ke skupině Sol-Eng<sup>+</sup>.

U skupiny myši s vysokou hladinou solubilního endoglinu nedošlo v porovnání se skupinou kontrolní k signifikantní změně v expresi molekuly COX-2 ( $p=0,0679$ ).

## 5.2.4 Expres molekuly SOD-3

V případě molekuly SOD-3 jsme také nezaznamenali signifikantní rozdíl v expresi molekuly mezi skupinou kontrolní a skupinou Sol-Eng<sup>+</sup> ( $100,0 \pm 25,29$  vs.  $132,4 \pm 42,61$ ;  $p=0,5118$ ). Grafické zobrazení výsledku je v grafu 5.

**Graf 5:** Expres proteinu SOD-3



**Obrázek 7:** Foto RTG snímku detekce SOD-3 (26 kDa)

Vzorky číslo 1 – 7 patří ke skupině kontrolní, vzorky 8 – 13 ke skupině Sol-Eng<sup>+</sup>.

Ani u poslední stanovované molekuly nedošlo k signifikantnímu rozdílu v expresi molekuly SOD-3 v porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu ( $p=0,5118$ ).

## 6 DISKUZE

Studiem solubilního endoglinu a jeho vlivu na vaskulární poškození se zabývala nedávná studie, jejíž součástí byla analýza exprese vybraných molekul v aortách transgenního kmene myši. Studie, která se zabývala expresí markerů souvisejících s endotelovou dysfunkcí v aortách transgenních Sol-Eng<sup>+</sup> myši, nezaznamenala rozdíl v expresi ve srovnání s kontrolní skupinou myši bez vysokých hladin solubilního endoglinu. Závěry studie ukázaly, že přítomnost zvýšené hladiny lidského solubilního endoglinu v plazmě nemá vliv na expresi membránového endoglinu, adhezních molekul nebo eNOS v endotelu aort u transgenních Sol-Eng<sup>+</sup> myši, které byly krmeny standardní dietou. Studie naznačila, že vysoká hladina sENG sama o sobě nemůže vyvolávat změny endotelových funkcí. Není však vyloučeno, že by se tak nemohlo stát v případě, že by sENG působil na endotel v kombinaci s hypercholesterolémií a nebo zánětem (Němečková et al., 2015).

Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny solubilního endoglinu lze detekovat u řady kardiovaskulárních onemocnění, včetně aterosklerózy (Nachtigal et al., 2012). Rovněž byla zvýšená hladina solubilního endoglinu detekována u žen s preeklampsií a koreluje se závažností tohoto onemocnění. Solubilní endoglin pravděpodobně přispívá k patogenezi preeklampsie tím, že narušuje vazbu TGF-β1 na receptory a tudíž i samotnou signalizaci tohoto cytokinu, včetně jeho účinků na aktivaci eNOS (narušuje vazodilataci cévy). Tento předpoklad naznačuje, že sEng dereguluje TGF-β signalizaci v cévách a může hrát roli v cévní dysfunkci (Venkatesha et al., 2006).

Další studie, zabývající se souvislostí endoglinu a srdečního selhání, přišla se zajímavými výsledky. Vycházela z toho, že sENG má úzký vztah s klinickými projevy srdečního selhání. Tato domněnka se potvrdila s tím, že sENG omezuje TGF-β1 signalizaci a snižuje tak syntézu kolagenu typu I v srdečních fibroblastech a dále, že přítomnost sENG tlumí srdeční fibrózu *in vivo* u modelu srdečního selhání. Oproti tomu se potvrdilo, že tkáňový endoglin se naopak podílí na TGF-β1 zprostředkované srdeční fibróze a dále, že omezení jeho exprese může utlumit srdeční fibrózu, zachovat srdeční funkce a zvýšit tak možnost přežití u srdečního selhání. Tyto výsledky ukazují nejen na roli sENG v srdečních fibroblastech, ale i na možný nový terapeutický přístup pro jedince se srdečním selháním (Kapur et al., 2012).

Kromě již zmíněného přímého podílu endoglinu na mechanismu srdečního selhání, je o něm současně uvažováno i jako o biomarkeru této závažné patologie.

Tato myšlenka vychází z výsledku studie, ve které byla srovnávána skupina pacientů s akutním infarktem myokardu (AIM) a přítomností nízkých hladin solubilního endoglinu se skupinou kontrolní. Výsledkem bylo, že hladina endoglinu ve skupině pacientů s AIM korelovala se zvýšenou mortalitou v této skupině ve srovnání se skupinou kontrolní (Cruz-Gonzales et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že existuje přesvědčivý důkaz, že exprese sENG zprostředkovává mechanismem zpětné vazby zmírnění fibrózy, je možné, že podáním sENG by se dala ovlivnit fibróza po AIM a mohlo by se dosáhnout reparativní fibrózy a vyhnout se tak post-infarktové ruptuře, tvorbě aneurysmu nebo obojímu. (Benjamin, 2012).

Z výše zmíněných publikací je tedy patrné, jaký význam lze přikládat studiu endoglinu, a to jak jeho tkáňové formy, tak také solubilní formy, jenž bylo součástí této práce.

ICAM-1 (intracelulární adhezní molekula) je glykoprotein, který interaguje s leukocytárními receptory (LFA-1 a Mac-1) a je klíčovou molekulou pro adhezi leukocytů a transmigraci (TEM) leukocytů pod endotel cévy (Ding et al., 1999; Smith et al., 1989; Henderson et al., 2001; Lyck et al., 2003), což je důležitým krokem v jejich pohybu do místa zánětu, poranění a imunitní reakce (Springer, 1994). Tyto kroky jsou regulovány krevním tokem, chemokiny a endotelem indukovanými adhezními molekulami (Cinamon et al., 2001).

Za fyziologického stavu exprimuje cévní endotel nízké hladiny ICAM-1, ale zánětlivé podněty mohou výrazně zvýšit expresi ICAM-1 (Dustin et al., 1986; Dustin et al., 1988). Během akutních a chronických zánětlivých onemocnění jsou buňky endotelu aktivovány a exprimují vysoké hladiny ICAM-1 a dalších adhezních molekul (Haskard, 1995; Ross, 1999; Iiyama et al., 1999).

VEGF je endotelový angiogenní růstový faktor, který je nutný pro normální cévní vývoj a homeostázu, ale účastní se i řady patogenezí. Expresi VEGF v různých typech buněk indukují exogenní ROS, přičemž VEGF indukuje buněčnou migraci a proliferaci zvýšením intracelulárních ROS (Ushio-Fukai et al., 2002; Ruef et al., 1997; Knighton et al., 1983; Chua et al., 1998; Wang et al., 2011).

Řada studií prokázala vzájemný vztah mezi ROS a angiogenezí.  $H_2O_2$  indukuje expresi VEGF v buňkách hladké svaloviny cév a v buňkách endotelu a tím podporuje angiogenní odezvu (Ruef et al., 1997; Chua et al., 1998). Současně VEGF dále

stimuluje produkci ROS prostřednictvím aktivace NADPH oxidázy v endotelových buňkách (Ushio-Fukai et al., 2004).

Cyklooxygenáza-2 je inducibilní isoforma enzymu COX, která je odpovědná za zvýšené hladiny prostaglandinů produkovaných během zánětu a imunitních odpovědí a zprostředkovává řadu biologických reakcí, které jsou zapojeny do patofyziologie cév (Kanayama et al., 2007).

COX-2 je za normálních podmínek přítomen ve velmi nízkých hladinách. Rapidně se jeho hladina zvyšuje prostřednictvím různých stimulů, jako jsou prozánětlivé cytokiny (např. interleukin-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ ), růstové faktory a nádorové promotory, což vede k neregulované expresi COX-2 a syntéze prostaglandinů spojených se zánětem (včetně aterosklerózy a jejích komplikací) a karcinogenezi (Fitzgerald, 2003; Koki et al., 2002; Smith et al., 2001).

Studie zabývající se vztahem COX-2 a tkáňového endoglinu došla k závěru, že endoglin je zapojen do regulace COX-2 aktivity. Bylo prokázáno, že snížená hladina endoglinu ve spojení s porušenou produkcí NO, může být odpovědná, alespoň z části, za zvýšenou expresi a aktivitu COX-2 (Breyer et al., 2000).

Superoxid dismutázy jsou hlavní antioxidační obranné systémy proti superoxidovému aniontu ( $O_2^{\bullet-}$ ), který hraje významnou roli v patogenezi u mnoha kardiovaskulárních nemocí, včetně hypertenze a aterosklerózy, u které hraje SOD potenciální ochrannou roli (Fukai et al., 1998). Vysoká exprese SOD3 v arteriální stěně může zabránit škodlivým účinkům  $O_2^{\bullet-}$ , ale i tvorbě peroxynitritu z NO. Toto potvrdilo i několik studií, např. studie buněčných kultur došla k závěru, že SOD3 zapříčinila markantní snížení oxidace LDL u endotelových buněk (Laukkanen et al., 2000; Takatsu et al., 2001).

Studie zabývající se vztahem SOD3 a výskytem infarktu myokardu zjistila vyšší výskyt související s nízkou hladinou SOD3 (Wang et al., 1998).

Pro účely studia vlivu solubilního endoglinu na srdce bylo předmětem této práce posoudit expresi výše popsaných molekul (ICAM-1, VEGF, COX-2 a SOD-3) v srdeční tkáni. Cílem bylo zhodnotit vliv sENG na markery zánětu, proliferace, případně oxidačního stresu, v srdeční stěně u transgenního modelu myši s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu v porovnání se skupinou kontrolní vykazující nízké hladiny tohoto markeru. Výsledky této práce vliv solubilního endoglinu na srdce neprokázaly. Konečné závěry týkající se možných patologických



vlivů solubilního endoglinu na srdeční tkáň však bude vhodné učinit až po potvrzení výsledků dalšími metodami.

## 7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat expresi vybraných molekul, které jsou markery zánětu a proliferace, v srdeční stěně samic geneticky upraveného modelu myší s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu a u skupiny myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu, která sloužila jako skupina kontrolní. Obě skupiny myší byly krmeny standardní dietou po dobu devíti měsíců.

Pomocí Western blot analýzy jsme získali informace o expresi proteinů ICAM-1, VEGF, COX-2 a SOD-3 v srdeční tkáni transgenních myší. Výsledky statistického vyhodnocení neukázaly signifikantně významný rozdíl v expresi těchto markerů při srovnání obou skupin myší.

Z těchto výsledků lze usuzovat, že zvýšené plazmatické hodnoty lidského solubilního endoglinu výrazně neovlivňují expresi markerů zánětu, proliferace, případně oxidačního stresu v srdeční stěně Sol-Eng<sup>+</sup> myší. Závěry této dílčí studie však bude potřeba potvrdit dalšími metodami, případně studiem dalších specifických markerů.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIM	akutní infarkt myokardu
ALK-1	aktivin receptor-like kináza 1 (activin receptor-like kinase)
ALK-5	aktivin receptor-like kináza 5 (activin receptor-like kinase)
APS	persíran amonný
CAM	buněčné adhezní molekuly (cell adhesion molecules)
CD 105	endoglin
CCN2	pojivový tkáňový růstový faktor (connective tissue growth factor)
COX	cyklooxygenáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	imunoanalytická metoda (enzyme-linked immunosorbent assay)
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula
IL	interleukiny
INF- $\gamma$	interferon $\gamma$
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low-density lipoprotein)
LFA-1	lymfocytární antigen 1 (lymphocyte function-associated antigen 1)
Mac-1	makrofágový antigen 1 (macrophage-1 antigen)
MMP-14	matrix metaloproteáza 14 (matrix metalloproteinase-14)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NC	nitrocelulóza
NO	oxid dusnatý
PGD2	prostaglandin D2
PGE2,	prostaglandin E2
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	prostaglandin F2 $\alpha$

PGG2	prostaglandin G2
PTGS2	prostaglandin-endoperoxid syntáza 2
PGH2	prostaglandin H2
PGI2	prostacyklin
PVDF	polyvinyliden difluorid
RIPA	pufr používaný k lýze buněk (radio immuno precipitation assay )
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
sENG	solubilní endoglin
SOD	superoxid dismutáza
TBS-T	tris pufr hydrochlorid a Tween 20 (polyoxyetylenesorbitan-monolaurate)
TEM	transendotelová migrace
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor beta)
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VPF	faktor cévní permeability (vascular permeability factor)

## **9 SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Složení gelů pro elektroforézu

## **10 SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1: Hladina solubilního endoglinu u transgenního modelu myši v porovnání se skupinou kontrolní

Graf 2: Exprese proteinu ICAM-1

Graf 3: Exprese proteinu VEGF

Graf 4: Exprese proteinu COX-2

Graf 5: Exprese proteinu SOD-3

## **11 SEZNAM OBRÁZKŮ:**

Obrázek 1: Stavba srdeční stěny

Obrázek 2: Vliv endoglinu na fibrózu

Obrázek 3: Foto RTG detekce proteinu GAPDH

Obrázek 4: Foto RTG snímku detekce ICAM-1

Obrázek 5: Foto RTG filmu detekce VEGF

Obrázek 6: Foto RTG snímku detekce COX-2

Obrázek 7: Foto RTG snímku detekce SOD-3

## 12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Albert, M., A., Danielson, E., Rifai, N., Ridker, P., M. 2001. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*. 286: 64-70.

Becker, J., C., Dummer, R., Hartmann, A., A., Burg, G., Schmidt, R., E. 1991. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 147: 4398-401.

Benjamin, I., J., 2012. Targeting endoglin, an auxiliary TGF- $\beta$  coreceptor, to prevent fibrosis and heart failure. *Circulation*. 125(22): 2689-2691.

Berk, B., C., Fujiwara, K., Lehoux, S., 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 117: 568- 575.

Bir, S., C., Kolluru, G., K., Fang, K., Kevil, C., G. 2012. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Semin Cell Dev Biol*. 23(7): 745-757.

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

Blanco, F., J., Santibanez, J., F., Guerrero-Esteo, M., et al., 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol*. 204: 574-84.

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

Boocock, C., A., Charnock-Jones, D., S., Sharkey, A., M. et al. 1995. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 87: 506-516.

Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*. 12: 64-76.

Breyer, M., D., Breyer, R., M. 2000. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279: F12–F23.

Cinamon, G., Shinder, V., Alon, R. 2001. Wall shear forces promote lymphocyte migration across inflamed vascular endothelium presenting apical chemokines. *Nat Immunol.* 2: 515-522.

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

Cowie, M., R., Mosterd, A., Wood, D., A., Deckers, J., W., Poole-Wilson, P., A., Sutton, G., C., Grobbee, D., E., 1997. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J.* 18: 208– 225.

Cruz-Gonzalez, I., Pabon, P., Rodriguez-Barbero, A., Martin-Moreiras, J., Pericacho, M., Sanchez, P., L., Ramirez, V., Sanchez-Ledesma, M., Martin-Herrero, F., Jimenez-Candil, J., Maree, A., O., Sanchez-Rodriguez, A., Martin-Luengo, C., Lopez-Novoa, J., M., 2008. Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 12: 955–961.

Cui, S., Lu, S., Z., Chen, Y., D., et al., 2008. Relationship among soluble CD105, hypersensitive C-reactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study. *Chin Med J (Engl).* 121: 128-32.

Čihák, R., 1997. *Anatomie 3.* 1.vyd. Praha: Grada Publishing, s.r.o. 672 s. ISBN 80-7169-140-2. 8-46.

Davies, M., K., Hobbs, F., D., R., Davis, R., C., Kenkre, J., E., Roalfe, A., K., Wosornu, D., Lancashire, R., J., 2001. Prevalence of left ventricular systolic dysfunction and heart failure in the Echographic Heart of England Screening Study: a population based study. *Lancet.* 358: 439– 444.

Davignon, J., Ganz, P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 109: III27–32.

- Defrere, S., Donnez, J., Moulin, P., Befahy, P., Gonzalez-Ramos, R., Lousse, J., C., et al. 2008. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human endometrial stromal and epithelial cells is regulated by interferon- $\gamma$  but not iron. *Gynecol Obstet Invest.* 65:145–54.
- De Vivo, A., Baviera, G., Giordano, D., et al. 2008. Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 87:837-42.
- Ding, Z., M., Babensee, J., E., Simon, S., I., et al. 1999. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol.* 163: 5029-5038.
- Dustin, M., L., Rothlein, R., Bhan, A., K., Dinarello, C., A., Springer, T., A. 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.
- Dustin, M., L., Springer, T., A. 1988. Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol.* 107: 321-331.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H. et al. 1998. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 380: 439–442.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. et al. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 13:18–32.
- FitzGerald, G., A., 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2(11): 879-890.
- Folz, R., J., Crapo, J., D. 1994. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics.* 22: 162–171.
- Fonsatti, E., Altomonte, M., Coral, S., Cattarossi, I., Nicotra, M., R., Gasparollo, A., et al. 1997. Tumor-derived interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) up-regulates the release of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) by endothelial cells. *Br J Cancer.* 76 :1255–61.



- Frank, S., Hubner, G., Breier, G. et al. 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.* 270: 12607–12613.
- Fukai, T., Galis, Z., S., Meng, X., P., Parthasarathy, S., Harrison, D., G. 1998. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 101: 2101–2111.
- Fukai, T., Siegfried, M., R., Ushio-Fukai, M., Cheng, Y., Kojda G., Harrison, D., G. 2000. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 105: 1631-1639.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M. 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 15(6):1583–1606.
- Gerber, H., P., Vu, T., H., Ryan, A., M. et al. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 5: 623–628.
- Go, Y., M., Jones D., P. 2011. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2011 50(4): 495–509.
- Gougos, A., Letarte, M., 1990. Primary structure of endoglin, an rgd-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem.* 265: 8361–8364.
- Gregory, A., L., Xu, G., Sotov, V., Letarte, M., 2014. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta.* 35 Suppl: S93-9.
- Gryglewski, R., J., Dembínska-Kieć, A., Korbut, R. 1978. A possible role of thromboxane A2 (TXA2) and prostacyclin (PGI2) in circulation. *Acta Biol Med Ger.* 37(5-6): 715-23.
- Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A., Bernabeu, C. 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* 277: 29197-209.
- Haskard, D., O. 1995. Cell adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 7: 229-234.

- Hawinkels, L., J., Kuiper, P., Wiercinska, E., Verspaget, H., W., Liu, Z., Pardali, E., et al., 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 70: 4141–4150.
- Hayes, S., H., Seigel, G., M. 2009. Immunoreactivity of ICAM-1 in human tumors, metastases and normal tissues. *Int J Clin Exp Pathol*, 2: 553–60.
- Henderson, R., B., Lim, L., H., Tessier, P., A., et al. 2001. The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med.* 194: 219-226.
- Hermand, P., Gane, P., Huet, M., Jallu, V., Kaplan, C., Sonneborn, H., H., et al. 2003. Red cell ICAM-4 is a novel ligand for platelet-activated alpha IIbeta 3 integrin. *J Biol Chem.* 278: 4892–8.
- Hla, T., Neilson, K. 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (16): 7384–8.
- Hosokawa, Y., Hosokawa, I., Ozaki, K., Nakae, H., Matsuo, T. 2006. Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 144: 494–502.
- Hubbard, A., K., Rothlein, R. 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 28: 1379-1386.
- Husain, K., Hernandez, W., Ansari, R., Ferder, L., 2015. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem.* 6(3): 209–217.
- Chintalgattu, V., Nair, D., M., Katwa, L., C. 2003. Cardiac myofibroblasts: A novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol.* 35: 277–286.
- Chua, C., C., Hamdy, R., C., Chua, B., H. 1998. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 25(8): 891–897.

Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., et al. 1999. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res.* 85: 199-207.

Iijima, K., Yoshikawa, N., Connolly, D., T. et al. 1993. Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. *Kidney Int.* 44: 959–966.

Inoue, T., Kobayashi, K., Inoguchi, T., Sonoda, N., Fujii, M., Maeda, Y., et al. 2011. Reduced expression of adipose triglyceride lipase enhances tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells via protein kinase C-dependent activation of nuclear factor $\kappa$ B. *J Biol Chem.* 286: 32045–53.

Itakura, J., Ishiwata, T., Shen, B. et al. 2000. Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 85: 27–34.

Jung, J., Ko, S., H., Yoo, D., Y., Lee, J., Y., Kim, Y., J., Choi, S., M., et al. 2012. 5,7-Dihydroxy-3,4,6-trimethoxyflavone inhibits intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 via the Akt and nuclear factor- $\kappa$ B-dependent pathway, leading to suppression of adhesion of monocytes and eosinophils to bronchial epithelial cells. *Immunology.* 137: 98–113.

Kanayama, M., Yamaguchi, S., Shibata, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Nagai, R., Arai, H., Takahashi, K., Uchida, K. 2007. Identification of a Serum Component That Regulates Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Cooperation with 4-Hydroxy-2-nonenal. *J Biol Chem.* 282: 24166-24174.

Kapur, N., K., Heffernan, K., S., Yunis, A., A., Parpos, P., Kiernan, M., S., Sahasrabudhe, N., A., Kimmelstiel, C., D., Kass, D., A., Karas, R., H., Mendelsohn, M., E., 2010. Usefulness of soluble endoglin as a non-invasive measure of left ventricular filling pressure in heart failure. *Am J Cardiol.* 106: 1770– 1776.

Kapur, N., K., Wilson, S., Yunis, A., A., Qiao, X., Mackey, E., Paruchuri, V., Baker, C., Aronovitz, M., J., Karumanchi, S., A., Letarte, M., Kass, D., A., Mendelsohn, M.,

- E., Karas, R., H., 2012. Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation*. 125: 2728-2738.
- Keaney, J., F., Jr. 2000. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. 21: 99–166.
- Kim, Young-Woong, Byzova, T. V. 2014. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 123(5): 625–631.
- Knighton, D., R., Hunt, T., K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B., J., Werb, Z., Banda, M., J. 1983. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science*. 221(4617): 1283–1285.
- Kojda, G., Harrison, D. 1999. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 43: 562–571.
- Koki, A., Khan, N., K., Woerner, B., M., Dannenberg, A., J., Olson, L., Seibert, K., Edwards, D., Hardy, M., Isakson, P., Masferrer, J., L. 2002. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol*. 507: 177-84.
- Kurumbail, R., G., Kiefer, J., R., Marnett, L., J. 2001. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 11 (6): 752–60.
- Kusterer, K., Bojunga, J., Enghofer, M., Heidenthal, E., Usadel, K., H., Kolb, H., et al. 1998. Soluble ICAM-1 reduces leukocyte adhesion to vascular endothelium in ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol*. 275: G377–G80.
- Lassegue, B., Griending K., K. 2010. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30: 653–661.
- Laukkanen, M., O., Lehtolainen, P., Turunen, P., Aittomaki, S., Oikari, P., Marklund, S., L., Yla-Herttuala, S. 2000. Rabbit extracellular superoxide dismutase: expression and effect on LDL oxidation. *Gene*. 254: 173–179.
- Lawson, C., Wolf, S. 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 61 :22–32.

Leask, A., 2007. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res.* 74: 207–212.

Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T., B., Flegal, K., Ford, E., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Marelli, A., McDermott, M., Mozaffarian, D., Nichol, G., O'Donnell, C., Roger, V., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Steinberger, J., Thom, T., Wong, N., Wylie-Rosett, J., Hong, Y., 2009. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 119: e21–e181.

Loenders, B., Van Mechelen, E., Nicolai, S., Buysens, N., Van Osselaer, N., Jorens, P., G., Willems, J., Herman, A., G., Slegers, H. 1998. Localization of extracellular superoxide dismutase in rat lung: neutrophils and macrophages as carriers of the enzyme. *Free Radic Biol Med.* 24: 1097–1106.

Lopez-Novoa, J., M., Bernabeu, C. 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299: H959-74.

Lyck, R., Reiss, Y., Gerwin, N., et al. 2003. T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells. *Blood.* 102: 3675-3683.

Mačák, J., Mačáková, J., 2004. *Patologie.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.,s. 348 s. ISBN 80-247-0785-3. 155-168.

Marklund, S., L. 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 222: 649–655.

Massague, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67: 753–791.

Matoušková, M., Ruttkay-Nedecký, B., Kizek, R. 2014. Antioxidační enzymy – biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies.* 3: 53-56.

- Mitchell, J., A., Warner, T., D. 2006. Review COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 5(1): 75-86.
- Moss, M. E., Jaffe, I. Z. 2015. Mineralocorticoid Receptors in the Pathophysiology of Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Front Endocrinol.* 6: 153.
- Nachtigal, P., Zemankova-Vecerova, L., Rathouska, J., Strasky, Z., 2012. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 224(1) :4-11.
- Najemnik, C., Sinzinger, H., Kritz, H. 1999. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca.* 26: 148–153.
- Nemeckova, I., Serwaczak, A., Oujó, B., Jezkova, K., Rathouska, J., Fikrova, P., Varejkova, M., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J., M., Chlopicki, S., Nachtigal, P. 2015. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One.* 10(3): e0119665.
- Nicholas, S., Kirkby, M., H., Lundberg, W., R., Wright, T., D., Warner, M., J., Paul-Clark, J., Mitchell, A. 2014. COX-2 Protects against Atherosclerosis Independently of Local Vascular Prostacyclin: Identification of COX-2 Associated Pathways Implicate Rgl1 and Lymphocyte Networks. *PLoS One.* 9(6): e98165.
- O'Banion, M.,K. 1999. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol.* 13 (1): 45–82.
- Ohene-Abuakwa, Y., Pignatelli, M. 2000. Adhesion Molecules as Diagnostic Tools in Tumor Pathology. *Int J Surg Pathol.* 8: 191–200.
- Oppermann, M. Balz, V. Adams, V., Dao, V., T., Bas, M., Suvorava, T., Kojda, G. 2008. Pharmacologic induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in-vivo. *J Cell Mol Med.* 13(7): 1271-1278.
- Ookawara, T., Imazeki, N., Matsubara, O., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Nakao, C., Sato, Y., Ohno, H. 1998. Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol.* 275: C840-C847.

- Oury, T., D., Day, B., J., Crapo, J., D. 1996. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest.* 75: 617-636.
- Petrovický, P., Eliška, O., Elišková, M., 1995. *Systematická, topografická a klinická anatomie, VII. Srdce a cévní systém.* Praha: Vydavatelství Karolinum. 207 s. ISBN 80-7184-108-0. 21-33.
- Ramos, M., A., Kuzuya, M., Esaki, T. et al. 1998. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 1188–1196.
- Rieckmann, P., Michel, U., Albrecht, M., Bruck, W., Wockel, L., Felgenhauer, K. 1995. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 60: 9–15.
- Robledo, O., Papaioannou, A., Ochietti, B., Beauchemin, C., Legault, D., Cantin, A., King, P., D., Daniel, C., Alakhov, V., Y., Potworowski, E., F., St-Pierre, Y. 2003. ICAM-1 isoforms: specific activity and sensitivity to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur J Immunol*, 33: 1351–60.
- Rosen, L., S., Gordon, M., S., Robert, F., Matei, D., E., 2014. Endoglin for targeted cancer treatment. *Curr Oncol Rep.* 16: 365.
- Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature.* 362: 801–9.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340: 115-126.
- Rothlein, R. , Mainolfi, E., A., Czajkowski, M., Marlin, D. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol.* 147: 3788–93.
- Ruef, J., Hu, Z., Y., Yin, L., Y., et al. 1997. Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ Res.* 81(1) :24–33.

- Sanchez-Elsner, T., Botella, L., M., Velasco, B., et al. 2002. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem.* 277: 43799-808.
- Santibanez, J., F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., et al. 2007. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol.* 210: 456-68.
- Santibanez, J., F., Quintanilla, M., Bernabeu, C., 2011. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 121: 233-51.
- Shibuya, M. 2008. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 41(4): 278–286.
- Shovlin, C., L., 2010. Hereditary haemorrhagic teleangiectasia: pathophysiology, diagnostic and treatment. *Blood Rev.* 24: 203-19.
- Silbernagl, S., Lang, F., 2001. *Atlas patofyziologie člověka.* 1.vyd. Praha: Grada Publishing, s.r.o. 404 s. ISBN 80-7169-968-3. 220-238.
- Skalicka, Z., F., Zolzer, F., Beranek, L., Racek, J. 2012. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology.* 117: 111-114.
- Smith, C., W., Marlin, S., D., Rothlein, R., Toman, C., Anderson, D., C. 1989. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest.* 83: 2008-2017.
- Smith, W., L., Langenbach, R. 2001. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest.* 107(12): 1491-5.
- Spoelstra, F., M, Postma, D., S., Hovenga, H., Noordhoek, J., A., Kauffman, H., F. 1999. Interferon- $\gamma$  and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. *Eur Respir J.* 14: 759–66.



- Springer, T., A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76: 301-314.
- Stralin, P., Karlsson, K., Johansson, B., O., Marklund, S., L. 1995. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15: 2032–2036.
- Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M. et al. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 55: 410–422.
- Takatsu, H., Tasaki, H., Kim, H., N., Ueda, S., Tsutsui, M., Yamashita, K., Toyokawa, T., Morimoto, Y., Nakashima, Y., Adachi, T. 2001. Overexpression of EC-SOD suppresses endothelial-cell-mediated LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*. 285: 84–91.
- Tan, R.,J., Lee, J.,S., Manni, M., L., Fattman, C., L., Tobolewski, J., M., Zheng, M., Kolls, J., K., Martin, T., R., Oury, T., D. 2006. Inflammatory cells as a source of airspace extracellular superoxide dismutase after pulmonary injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 34: 226–232.
- Tian, F., Zhou, A., X., Smits, A., M., et al. 2010. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 392: 283-8.
- Tian, L., Yoshihara, Y., Mizuno, T., Mori, K., Gahmberg, C., G. 1997. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol*. 158: 928–36.
- Thomson, A., J., Greer, M., R., Young, A., Boswell, .F, Telfer, J., F., Cameron, I., T., et al. 1999. Expression of intercellular adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-2 in human endometrium: regulation by interferon- $\gamma$ . *Mol Hum Reprod*. 5: 64–70.
- Toivanen, A., Ihanus, E., Mattila, M., Lutz, H., U., Gahmberg, C., G. 2008. Importance of molecular studies on major blood groups–intercellular adhesion molecule-4, a blood group antigen involved in multiple cellular interactions. *Biochim Biophys Acta*. 1780 :456–66.

- Trojan, S., Langmeier, M., Hrachovina, V. and Kittnar, O., 2003. *Lékařská fyziologie*. 4.vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 772 s. ISBN 80-247-0512-5. Kapitola 6: Fyziologie oběhu krve a lymfy. 179-185.
- Trostdorf, F., Buchkremer, M., Harmjanz, A., et al. 2005. Fibrous cap thickness and smooth muscle cells apoptosis in high-grade carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 29: 528-35.
- Ushio-Fukai, M. 2009. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal*. 11:1289–1299.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R., W. 2004. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem*. 264(1-2): 85–97.
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S., I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M., T., Pagano, P., J., Johnson, C., Alexander, R., W. 2002. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*. 91(12): 1160-7.
- Valbuena-Diez, A., C., Blanco, F., J., Oujo, B., Langa, C., Gonzalez-Nunez, M., Llano, E., et al., 2012. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. 126: 2612–2624.
- Van de Stolpe, A., van der Saag, P., T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*. 74: 13-33.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y., M., et al. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 12: 642–649.
- Verheul, H., M., Hoekman, K., Luykx-de Bakker, S. et al. 1997. Platelet: Transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 3: 2187–2190.
- Walshe, T., E., Dole, V., S., Maharaj, A., S., Patten, I., S., Wagner, D., D., D'Amore, P., A. 2009. Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29: 1185–1192.

Wang, X., L. Adachi, T., Sim, A., S., Wilcken, D., E. 1998. Plasma extracellular superoxide dismutase levels in an Australian population with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 1915–1921.

Wang, Y., Zang, Q., S., Liu, Z., et al. 2011. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301(3): C695–C704.

Whiteman, S., C, Spiteri, M., A. 2008. IFN- $\gamma$  regulation of ICAM-1 receptors in bronchial epithelial cells: soluble ICAM-1 release inhibits human rhinovirus infection. *J Inflamm.* 5:8.

Witkowska, A., M., Borawska, M., H. 2004. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw.* 15: 91-98.

Yang, L., Froio, R., M., Sciuto, T., E., Dvorak, A., M., Alon, R., Lusinskas, F., W. 2005. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood*, 106: 584–92.

Yang, P., Y., Rui, Y., C., Jin, Y., X. et al. 2003. Antisense oligodeoxynucleotide inhibits vascular endothelial growth factor expression in U937 foam cells. *Acta Pharmacol Sin.* 24: 610–614.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. 1998. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 32: 488–495.

Zdravotnická statistika, Zemřelí 2013. [online]. [cit. 2015-11-29] Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/zemreli>