

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv glukózy na expresi endoglinu a biomarkerů endotelové dysfunkce u endotelových buněk

Adriana Adamcová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Katarína Tripská

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, ochotu a čas poskytnutý k vedení této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Kataríně Tripské za rady při sepisování této práce a pomoc s experimentální částí, za její přátelský přístup a trpělivost. Velké poděkování patří také mojí rodině za podporu a trpělivost během celého mého studia.

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

Hradec Králové, 2020

OBSAH

OBSAH	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Endotel	10
2.1.1 Fyziologická funkce endotelu	11
2.2 Endotelová dysfunkce (ED)	14
2.2.1 Příčiny vzniku ED	14
2.2.2 Projevy ED	16
2.3 Endoglin	18
2.3.1 Struktura endoglinu	20
2.3.2 Solubilní ENG	21
2.3.3 Funkce ENG a jeho vztah k dysfunkci endotelu	22
2.4 Adhezní molekuly	24
2.4.1 VCAM-1	26
2.4.2 ICAM-1	28
2.4.3 P/E-selektin	30
2.5 Diabetes mellitus	32
2.5.1 Definice	32
2.5.2 Typy DM	33

2.5.3	Hyperglykémie a její vliv v patogenezi diabetes mellitus a vztah k endotelové dysfunkci	35
2.6	PCR.....	39
2.6.1	Základní princip	39
2.6.2	Real-time PCR.....	41
2.7	Průtoková cytometrie	44
2.7.1	Základní princip	44
2.7.2	Typy průtokové cytometrie.....	48
3.	ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE	50
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
4.1	HAEC.....	51
4.2	Příprava vzorků	52
4.2.1	Rozmrazování buněk.....	52
4.2.2	Pasážování.....	53
4.2.3	Výměna média	55
4.3	PCR.....	57
4.4	Průtoková cytometrie	61
5.	VÝSLEDKY	63
5.1	PCR.....	63
5.1.1	mRNA exprese ENG	64
5.1.2	mRNA exprese eNOS.....	65
5.1.3	mRNA exprese VCAM-1.....	66
5.1.4	mRNA exprese HIF1 α	67
5.1.5	mRNA exprese KLF6	68
5.1.6	mRNA exprese RELA.....	69

5.1.7	mRNA exprese LXR	70
5.2	Průtoková cytometrie	71
5.2.1	Proteinová hladina ENG	71
5.2.2	Proteinová hladina VCAM-1.....	72
6.	DISKUSE.....	73
7.	ZÁVĚR.....	75
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	76
9.	SEZNAM TABULEK.....	80
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	81
11.	SEZNAM GRAFŮ	82
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	83

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce: Vliv glukózy na expresi endoglinu a biomarkerů endotelové dysfunkce u endotelových buněk

Autor: Adriana Adamcová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit expresi endoglinu a biomarkerů endotelové dysfunkce (eNOS, VCAM-1) u lidských aortálních endotelových buněk, které byly vystaveny působení oscilující glukózy.

Metody: Pro tuto práci byly použity lidské aortální endotelové buňky (HAEC), které byly po dobu 7 dní vystaveny působení média střídavě s normální (5 mM) a vysokou (2 mM) glukózou. K porovnání výsledků sloužila kontrolní skupina, která byla po celou dobu vystavena konstantní hladině normální glukózy. Genová exprese endoglinu, eNOS, VCAM-1, HIF1 α , KLF6, RELA a LXR byla změřena metodou real-time PCR. Pro změření proteinové hladiny endoglinu a VCAM-1 byla použita metoda průtokové cytometrie.

Výsledky: Metoda PCR prokázala signifikantní zvýšení mRNA expresi endoglinu, eNOS, VCAM-1, HIF1 α , RELA a LXR u buněk exponovaných vysoké hladině glukózy ve srovnání s kontrolní skupinou. Metodou průtokové cytometrie byl zaznamenán signifikantní rozdíl v proteinové hladině endoglinu i VCAM-1.

Závěr: Výsledky této diplomové práce prokázaly, že oscilující glukóza způsobuje změnu v expresi endoglinu a dalších biomarkerů endotelové dysfunkce a tím potenciálně sehrává roli v její patogenezi. Přesná role endoglinu ve vztahu k endotelové dysfunkci je předmětem dalších studií.

Klíčová slova: endoglin, endotel, endotelová dysfunkce, hyperglykémie, VCAM-1, ICAM-1, P/E-selektin, diabetes, PCR, průtoková cytometrie

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Effect of glucose treatment on endoglin and biomarkers of endothelial dysfunction in endothelial cells

Author: Adriana Adamcová

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

Background: The aim of this thesis was to evaluate the expression of endoglin and biomarkers of endothelial dysfunction (eNOS, VCAM-1) in aortic endothelial cells exposed to oscillating glucose.

Methods: Human aortic endothelial cells (HAECs) were treated with alternating normal (5 mM) and high (25mM) glucose for 7 days. The control group, was treated with a constant level of normal glucose. Gene expression of endoglin, eNOS, VCAM-1, HIF1 α , KLF6, RELA and LXR was measured by quantitative real-time PCR. Flow cytometry was used to detect endoglin and VCAM-1 protein levels.

Results: Treatment with high levels of glucose resulted in significantly increased expression of endoglin, eNOS, VCAM-1, HIF1 α , RELA and LXR by means of PCR. The flow cytometry method showed a significant difference in protein levels in both endoglin and VCAM-1.

Conclusions: The results of this diploma thesis showed that oscillating glucose increases the expression of endoglin and other biomarkers of endothelial dysfunction and thus potentially play a role in its pathogenesis. However, the exact role of endoglin with respect to endothelial dysfunction has to be further evaluated.

Keywords: Endoglin, endothelium, endothelial dysfunction, hyperglycemia, VCAM-1, ICAM-1, P / E-selectin, diabetes, PCR, flow cytometry

1. ÚVOD

Výskyt diabetu mellitu se celosvětově neustále zvyšuje. Nejčastější formou je diabetes mellitus 2. typu, který představuje až 90 % všech forem diabetu. Toto onemocnění zahrnuje hyperglykémii, inzulinovou rezistenci, uvolňování volných mastných kyselin a další metabolické abnormality, které vedou k poškození cévní stěny a způsobují endotelovou dysfunkci [1].

Endotel tvoří souvislou vrstvu buněk, která vystýlá vnitřní povrch cév. Dříve byl považován pouze za anatomickou bariéru oddělující krev od okolních tkání. Výzkum však prokázal, že endotel je důležitý metabolický „orgán“ s významným vlivem na řadu fyziologických i patologických funkcí [2],[3].

Nejdůležitější vazodilatační látkou produkovanou endotelem je oxid dusnatý. Nejznámějším vazokonstrikčním faktorem je endotelin-1 [3]. Nerovnováha mezi vazodilatačními a vazokonstrikčními faktory vede k rozvoji endotelové dysfunkce, která je spojována s řadou kardiovaskulárních onemocnění [4],[5]. V patogenezi endotelové dysfunkce hraje důležitou roli i oxidativní stres, který snižuje produkci oxidu dusnatého, vede ke vzniku zánětu, agregaci krevních destiček a dalším patologickým jevům [4],[6]. V procesu zánětu jsou důležité také adhezní molekuly, které regulují vstup leukocytů do subendotelového prostoru a podílí se tak na endotelové dysfunkci [7].

Endoglin je transmembránový glykoprotein exprimovaný převážně v endotelových buňkách [8]. K jeho expresi dochází za různých patologických jevů, jako je hypoxie a cévní poškození [9]. Endoglin je zapojen do signální dráhy prostřednictvím které stimuluje expresi endotelové syntázy oxidu dusnatého [8]. Ovlivňuje také angiogenezi, cévní permeabilitu, migraci a proliferaci endotelových buněk [10].

Působení endoglinu, jeho transkripčních faktorů a adhezních molekul na endotelové buňky pod vlivem vysokých koncentrací glukózy se věnuje tato diplomová práce.

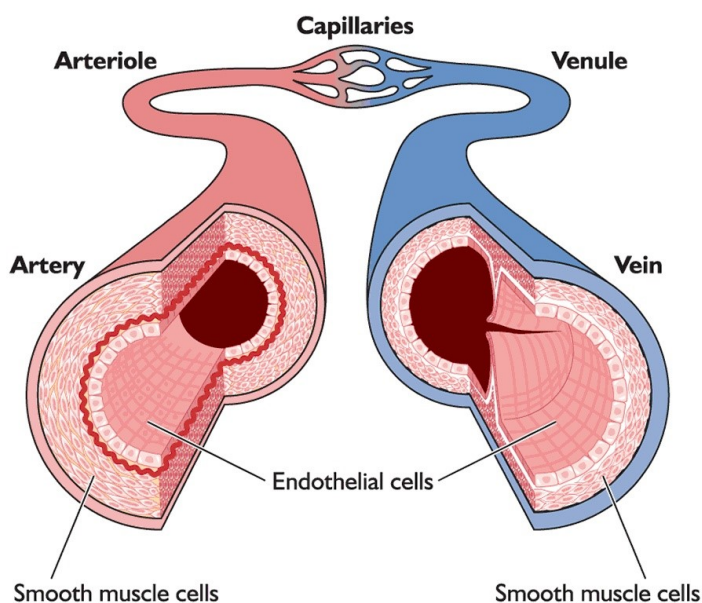
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Endotel

Endotel je „orgán“, který tvoří jednu souvislou vrstvu buněk a vystýlá vnitřní povrch cév [3]. Po mnoho let byl endotel vnímán pouze jako jednoduchá buněčná bariéra. Rozsáhlý výzkum v posledních letech však odhalil jeho komplexní roli. Endotel tvoří vysoce selektivní bariéru, je metabolicky aktivní a hraje významnou roli v udržení vaskulární homeostázy udržováním rovnováhy mezi vazokonstrikcí a vazodilatací [6]. Pochopení endotelové funkce a dysfunkce bylo důležitým bodem k zjištění, proč patologické stavy jako je arteriální hypertenze, hyperlipoproteinémie či diabetes mellitus vedou k uniformním cévním změnám [3].

Endotelové buňky jsou nepravidelného, podlouhlého tvaru a lemují celý oběhový systém od srdce až po ty nejmenší kapiláry (viz obr. č.1) [2],[5]. Jsou propojeny pevnými spoji a ukotveny k bazální membráně [11]. Role endotelu je uskutečňována prostřednictvím membránově-vázaných receptorů pro řadu molekul zahrnující proteiny, částice transportující lipidy, metabolity a hormony. Endotel se také podílí na zprostředkování různých interakcí a to prostřednictvím specifických proteinů a receptorů [5].

Obrázek 1: Endotel



Obrázek znázorňuje endotelovou vrstvu tvořenou jednou souvislou vrstvou endotelových buněk (endothelial cells), které lemují všechny krevní cévy. Pod endotelovými buňkami se nachází vrstva buněk hladkého svalstva (smooth muscle cells), které tvoří krevní cévu.

Převzato z: What are endothelial cells and their function [online] Dostupné na: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/GB/en/what-are-endothelial-cells-and-their-function [14.3.2020]

2.1.1 Fyziologická funkce endotelu

2.1.1.1 Permeabilita

Jednou z důležitých funkcí endotelu je řízení propustnosti mezi krví a okolními tkáněmi. Endotel řídí prostup buněčných i nebuněčných krevních částic [2]. Tekutiny a malé molekuly mohou pasivně prostupovat bariérou. Pro makromolekuly jsou za normálních podmínek endotelové spoje nepropustné. Ve stavu akutního či chronického zánětu dojde však k uvolnění těchto spojů, což zvětší mezibuněčný prostor a následně permeabilitu, která umožní abnormální extravazaci tekutin a makromolekul [11].

Pro prostup krevních částic - leukocytů jsou potřebné adhezní molekuly, jako např. mezibuněčná adhezní molekula (intercellular adhesion molecule- 1, ICAM-1) nebo cévní adhezní buněčná molekula (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) [2]. Tyto molekuly jsou exprimovány na povrchu endotelu a umožňují leukocytům prostoupit skrze cévní stěnu do místa zánětu či infekce [2],[5].

Mezi regulátory permeability patří cytokiny, růstové faktory, histamin či bradykinin [12]. Tyto faktory jsou produkovány především při akutním či chronickém zánětu [13]. Relativní rozsah propustnosti může být také nepřímo regulován krevním tlakem a výsledným průtokem krve. Zvýšený průtok krve, např. vlivem vazodilatace může zvyšovat cévní permeabilitu [12].

2.1.1.2 Hemostáza

Endotel hraje významnou roli pro správnou hemostatickou rovnováhu [5]. Za fyziologických podmínek je endotelový povrch antikoagulační a antitrombogenní a tím zabraňuje přilnutí a agregaci krevních destiček [11]. Prostřednictvím von Willebrandova faktoru (vWf), fibrinogenu, trombomodulinu, tkáňového faktoru, tromboxanu A a prostacyklinu se podílí na řízení hemostázy. Zasahuje také do procesu fibrinolýzy, kdy působením tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA), který je v endotelu syntetizován, vzniká z cirkulujícího plasminogenu klíčový enzym plasmin, který štěpí molekulu fibrinu [3], [2]. Důležitým způsobem, kterým endotelové buňky řídí proces koagulace je regulace exprese vazebných míst antikoagulačních a prokoagulačních faktorů na povrchu buňky. Nedávné studie ukazují, že změny v endotelových koagulačních vlastnostech mohou být vyvolány konečnými produkty pokročilé glykace (advanced glycation end products, AGEs), což jsou akumulované proteiny změněné glukózou (GLU) v cévách diabetiků. To značí, že by mohli mít potenciální význam v mechanismu periferního cévního onemocnění [5].

2.1.1.3 Angiogeneze

Další funkcí endotelu je ovlivnění angiogeneze a to prostřednictvím růstových faktorů - vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) či transformující růstový faktor-beta (TGF- β) [3]. Tyto faktory stimulují růst buněk hladké svaloviny jejímž následkem je hypertrofie cévní stěny. Naopak faktorem, který růst buněk inhibuje je oxid dusnatý (NO) [2].

2.1.1.4 Regulace cévního tonu

Endotel produkuje řadu vazodilatačních i vazokonstrikčních činitelů, prostřednictvím kterých řídí cévní tonus. Nejdůležitějším vazodilatačním činitelem je oxid dusnatý (NO) [3]. NO je syntetizován z aminokyseliny L-arginin prostřednictvím enzymu – endotelová NO syntáza (eNOS). Syntéza NO vyžaduje také mnoho dalších faktorů, jako je nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD) a další. Po syntéze NO difunduje přes

endotelovou membránu a vstupuje k hladkým svalovým buňkám, kde dále aktivuje enzym guanylát cyklázu (GC). Aktivace GC vede k tvorbě cyklického guanosin 3'5'-monofosfátu (cGMP), který jako druhý posel zprostředkovává biologické působení NO. Mezi signální molekuly aktivující eNOS se řadí například bradykinin, serotonin, adenosin nebo VEGF [4]. Hlavní biologickou funkcí NO je tedy vazodilatace, inhibice exprese adhezních molekul, inhibice adheze a agregace trombocytů a zamezení proliferativních procesů v cévní stěně [3], [2].

Kromě NO působí vazodilatačně také prostacyclin (PGI₂) [3]. Ten je uvolňován za podobných situací jako NO, tedy vlivem hypoxie, zvýšeným průtokem a řadou působků. Jejich účinek s NO se tedy navzájem potencuje [3], [2]. Prostacyclin působí v buňkách hladké svaloviny a v trombocytech prostřednictvím zvýšení hladiny cyklického 3'5'-adenosin monofosfátu (cAMP) [3].

Pro zachování rovnováhy vznikají v endotelu také látky s vazokonstrikčním působením. Nejdůležitějším je endotelin-1 (ET-1) [2]. ET-1 je peptid složený z 21 AMK a disponuje mitogenními i vazokonstrikčními vlastnostmi. K regulaci vaskulárního tonu přispívá prostřednictvím dvou hlavních receptorů – endotelin-A (ET-A) a endotelin-B (ET-B). Receptory ET-A jsou lokalizovány v cévním hladkém svalstvu a zprostředkovávají vazokonstrikci. Receptory ET-B způsobují vazokonstrikci na buňkách hladkého svalstva, ale zároveň jsou také umístěny na endotelových buňkách kde prostřednictvím NO přispívají k vazodilataci. Převážně ale působí ET-1 vlivem receptoru ET-A, tedy vazokonstrikčně [6].

Dalšími vazokonstrikčními působky jsou tromboxan A₂ (TXA₂), prostaglandin H₂ (PGH₂) a angiotensin II. TXA₂ a PGH₂ aktivují tromboxanové receptory destiček a hladké svaloviny cévní, čímž působí antagonisticky proti NO [3]. Důležitý je i angiotensin-konvertující enzym na povrchu endotelu, jehož vlivem dochází k přeměně angiotensinu I na vazokonstrikčně působící angiotensin II a který také degraduje dilatačně působící bradykinin [3], [2].

2.2 Endotelová dysfunkce (ED)

Endotelová dysfunkce (ED) může být charakterizována jako nerovnováha mezi vazodilatačními a vazokonstrikčními faktory [4]. Je asociována s většinou forem kardiovaskulárních onemocnění, jako je arteriální hypertenze, ischemická choroba srdeční, chronické srdeční selhání, diabetes mellitus, chronické ledvinové selhání a také závažné virové infekce [5]. Představuje časnou, morfologicky němou fázi aterosklerózy (AS) [2].

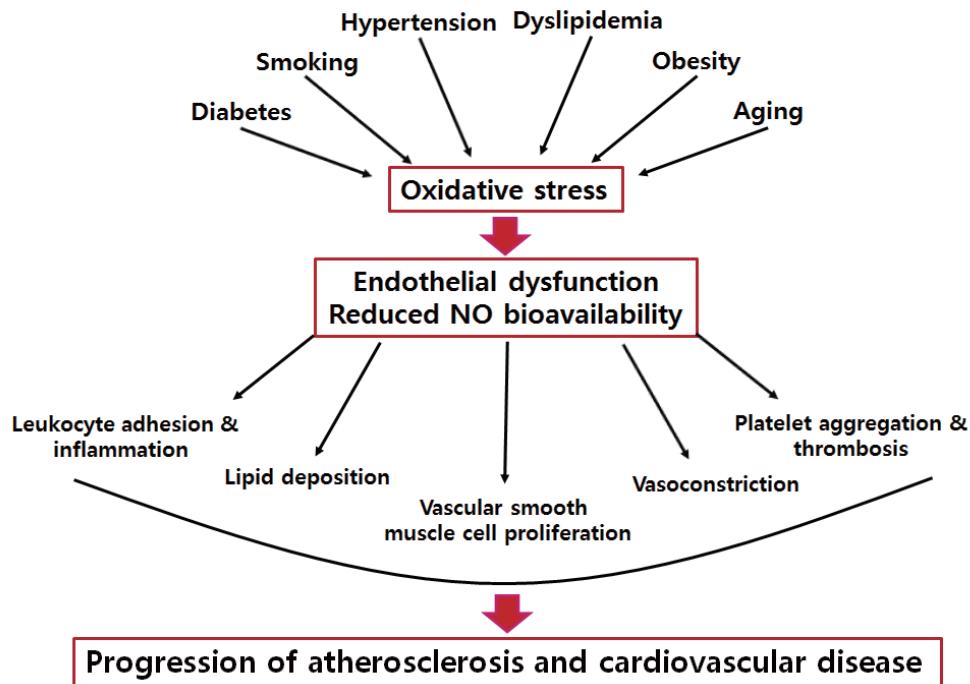
2.2.1 Příčiny vzniku ED

2.2.1.1 Oxidativní stres

Endotel, který jak je již zmíněno v předchozí kapitole, reguluje průchod makromolekul a cirkulujících buněk z krve do tkání, je hlavním cílem oxidativního stresu, který hraje klíčovou roli v patofyziologii cévních onemocnění [14]. Většina kardiovaskulárních (KVS) rizikových faktorů (viz obr.č.2) je spojena s up-regulací oxidativního stresu a reaktivních forem kyslíku (ROS), které podporují několik mechanismů, jako je inaktivace NO, tvorba peroxynitritu (ONOO⁻), stimulace exprese endotelinu a další [6].

ROS jsou vytvářeny v místech zánětu a zranění. V nízkých koncentracích působí jako signální molekuly účastnící se regulace základních buněčných aktivit, jako je buněčný růst a adaptace. Ve vysokých koncentracích můžou způsobit buněčné poškození až buněčnou smrt [14]. Významným zdrojem ROS jsou volné mastné kyseliny, jejichž hladina je signifikantně zvýšena při obezitě [4].

Obrázek 2: Působení oxidativního stresu



Obrázek popisuje rizikové faktory (diabetes, smoking - kouření, hypertenze, dyslipidémie, obezita, aging - stárnutí) vedoucí k oxidativnímu stresu a následné endotelové dysfunkci (endothelial dysfunction), při které dochází typicky ke snížení produkce NO (reduced NO bioavailability) a dalších jevů: leukocyte adhesion & inflammation – adheze leukocytů & zánět, lipid deposition – ukládání lipidů, vascular smooth muscle cell proliferation – proliferace vaskulárních hladkých svalových buněk, vasoconstriction – vazokonstrikce, platelet aggregation & thrombosis- agregace krevních destiček & trombóza. Výsledkem je progresse aterosklerózy a dalších KVS onemocnění (progression of atherosclerosis and cardiovascular disease)

Převzaté z: Endothelial dysfunction: Clinical implications in Cardiovascular disease and therapeutic Approaches [6].

2.2.1.2 Zánět

Zánět je dalším velmi důležitým mechanismem ED. Existuje přímý vztah mezi zánětem a oxidativním stresem. Za fyziologických podmínek endotel reguluje vaskulární zánět uvolňováním NO. Avšak dysfunkční endotel bude podporovat vznik ROS a tím zánět zhoršovat [6].

Existuje mnoho zánětlivých markerů spojených s ED a aterosklerózou. C-reaktivní protein (CRP) je bílkovina akutní fáze zánětu. Bylo publikováno, že CRP přímo přispívá k rané fázi aterosklerózy. Kromě toho CRP přímo ovlivňuje biologickou dostupnost NO, což vede k oxidativnímu stresu a tudíž ED [6].

Zánět je také spojován s nadměrnou expresí tumor nekrotizující faktoru-alfa (TNF- α) a interleukinu-1 (IL-1), který podporuje adhezenci a migraci leukocytů. Navíc tyto zánětlivé cytokiny indukují expresi adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1), E-selektinu a P-selektinu [6]. Tyto adhezní molekuly a cytokiny dále usnadňují přilnutí monocytů k endotelu, kumulaci v cévní stěně a jejich následnou přeměnu v makrofágy a pěnové buňky, které vedou ke vzniku aterosklerotického plátu [2].

2.2.1.3 Infekce

ED je také ovlivněna infekcí. Dle studií, infekční agens mohou predisponovat k ateroskleróze a jejím klinickým dopadům [6]. Působit mohou přímými či nepřímými mechanismy. Přímý účinek značí schopnost mikroorganismů infikovat vaskulární buňky, nepřímý pak zase v nevaskulárním místě podpořením tvorby cytokinů a jiných proteinů akutní fáze, což má za následek zrychlení procesu aterosklerózy [15].

Metodou detekce nukleových kyselin či antigenů byla v lidském aterosklerotickém plaku nalezena široká škála patogenů. Příkladem z virů je cytomegalovirus či herpes simplex, z bakterií potom Chlamydia pneumoniae či Helicobacter pylori [15].

2.2.2 Projevy ED

ED lze samo o sobě považovat za klinický syndrom, který je spojen se zvýšeným rizikem nežádoucích KVS příhod [16].

2.2.2.1 ED a ateroskleróza

Dysfunkční endotel způsobuje vyšší průnik aterogenních lipidů, zvýšenou expresi adhezních molekul a produkci cytokinů. Tím dochází ke kumulaci monocytů v cévní stěně, které se následně přeměňují na makrofágy [2]. Makrofágy pohlcují

oxidované LDL částice (low density lipoprotein, nízkodenzitní lipoprotein) a přeměňují se tak na pěnové buňky. Nahromaděním pěnových buněk vznikají tzv. tukové proužky, které jsou prvním makroskopickým projevem AS [17].

V další fázi aterogeneze hrají roli i buňky hladkého svalstva cévní stěny, které proliferují, migrují do subendotelového prostoru a vytváří mezibuněčnou hmotu. Tím vznikají tzv. fibrózní pláty [17].

Byla identifikována řada rizikových faktorů související s patogenezí aterosklerózy, včetně hypertenze, kouření, zvýšené hladiny cholesterolu, diabetu, obezity či věku. Všechny tyto rizikové faktory ovlivňují funkci endotelových buněk a vyúsťují v jejich zvýšenou permeabilitu, adhezi leukocytů a expresi prokoagulačních molekul [18].

AS je příčinou řady dalších KVS onemocnění, jako je ischemická choroba srdeční, infarkt myokardu, angina pectoris či různé poruchy srdečního rytmu [17].

2.2.2.2 ED a hypertenze

Hypertenze je velmi dobře známým rizikovým faktorem pro mnohá kardiovaskulární onemocnění. Již spousta studií odhalila zásadní roli endotelové dysfunkce u arteriální hypertenze [19]. Není však jasné, zda je hypertenze příčinou, nebo výsledkem endotelového poškození [5]. Hypertenze je spojována s nižšími hladinami NO a zvýšenou produkcí ROS. Snížení syntézy NO vede k vazokonstrikci. NO také usnadňuje vylučování sodíku, takže systémová inhibice syntázy NO podporuje zadržování vody a soli v těle. ROS též podporuje vazokonstrikci a také cévní hypertrofii [20].

2.2.2.3 ED a diabetes mellitus typu 2

U pacientů s diabetem se projevuje porucha vazodilatace závislá na endotelu. To částečně souvisí s častou asociací tohoto typu diabetu s dalšími kardiovaskulárními rizikovými faktory, včetně hypertenze, obezity či dyslipidémie. Vysoká nabídka GLU je spojena s produkcí ROS. Mechanismy vedoucí k endotelovému poškození u diabetu

zahrnují insulinovou rezistenci a hyperglykémii [5]. Podrobněji o vztahu endotelové dysfunkci k diabetu je věnována kapitola 2.5.

2.3 Endoglin

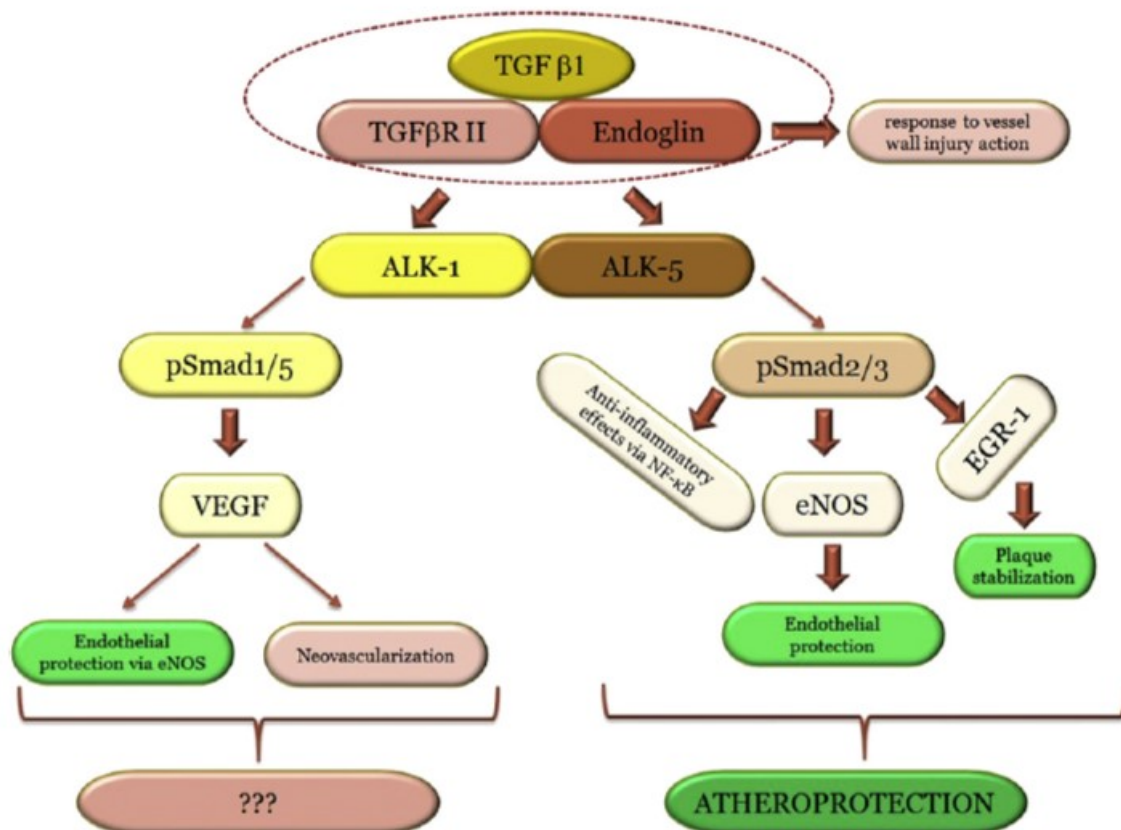
Endoglin (ENG), také označovaný jako CD105 nebo TGF- β receptor III je transmembránový glykoprotein exprimován převážně endotelovými buňkami cév [8]. Zdrojem ENG jsou i jiné typy buněk, jako například hladké svalové buňky, fibroblasty či makrofágy [21]. ENG hraje klíčovou roli při různých fyziologických i patologických procesech jako je angiogeneze, ateroskleróza, diabetes či hypertenze [22], [21]. Na angiogenezi se podílí regulací proliferace a migrací endotelových buněk [23].

ENG je vysoce exprimován v endotelových buňkách za různých patologických jevů jako je hypoxie, cévní poranění či probíhající angiogeneze v tkáních při hojení ran, infarktu a u široké škály nádorů [21], [9]. Exprese ENG je regulována řadou transkripčních faktorů včetně Krüpple-like faktoru 6 (KLF6), hypoxií indukovaného faktoru 1 α (hypoxia-induced factor 1 α , HIF-1 α), podjednotky nukleárního faktoru kapab (NF- κ B) fosforylovanou na uhlíku 65 (RELA), jaterního X jaderného receptoru (liver X nuclear receptor, LXR, faktor spojený s metabolismem cholesterolu), či stimulačního proteinu 1 (stimulating protein 1, Sp1) [8], [9]. Vzájemná interakce mezi Sp1 a KLF6 transkripčními faktory je považována za rozhodující pro zprostředkování transkripční aktivity ENG po poškození cév [9].

ENG hraje důležitou roli v regulaci TGF- β signální dráhy kdy je schopen modulovat vazbu a signalizaci ligandu spojením s TGF receptory typu I a II a vytvářet tak funkční receptorový komplex (viz obr.č.3) [21], [9]. U lidí byly popsány 3 izoformy TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3), které si jsou strukturálně i funkčně velmi podobné a svou funkci vykonávají vazbou na specifické receptory typu I, II a III [24]. Co se týče receptoru typu III, v podstatě byly popsány dva typy, a to ENG a betaglykan, který ale není exprimován ve velkých cévách a jeho role v procesu aterogeneze zatím není jasná [9]. Receptory I a II jsou serin/threonin kinázy [25]. Je známo 7 typů TGF- β receptoru I, známé jako ALK (activin-like kinase, kináza podobná aktivinu) [23]. ENG moduluje vazbu a signalizaci ligandu asociací s ALK-1 a ALK-5. Tyto receptory typu I aktivují

signální dráhu přes proteiny Smad1/5/8 prostřednictvím ALK-1, nebo Smad2/3 prostřednictvím ALK-5 [25]. Rodina proteinů Smad jsou transkripční faktory, pomocí nichž je signál veden do jádra buněk kde je regulována genová exprese [10]. Dráha ENG/ALK-1/Smad1/5 stimuluje migraci a proliferaci endotelových buněk. Naopak aktivace dráhy ENG/ALK-5/Smad2 aktivitu endotelových buněk inhibuje, blokuje angiogenezi a zabráněním migrace a proliferace udržuje endotel v pokojovém stavu. Kromě toho má ENG inhibiční účinky na TGF- β /ALK-5/Smad3 buněčnou odpověď, což má za následek opačné účinky na endotelové buňky ve srovnání se signalizací skrze Smad2 [9]. ENG a ALK-1 jsou navíc schopni vázat a zprostředkovávat proliferační signál kostního morfogenetického proteinu 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9), který je také známý jako růstový diferenační faktor 2 (growth differentiation factor 2, GDF2) a to s mnohem vyšší afinitou než u TGF- β 1 [10].

Obrázek 3: TGF- β signalizace



Obrázek znázorňuje TGF- β signální dráhu. ENG tvoří funkční komplex s TGF- β 1 a TGF- β II. Tento komplex může dále aktivovat signální dráhu prostřednictvím ALK-1 nebo ALK-5. Aktivace

signální dráhy ALK-1/Smad1/5 je spojována se zvýšenou expresí VEGF podílející se na neovaskularizaci (Neovascularization) a protekci endotelu vlivem zvýšení exprese eNOS (endothelial protection via eNOS). Role této dráhy ve vztahu k aterogenezi není zcela jasná. Aktivace signální dráhy ALK-5/Smad2/3 je spojována se zvýšenou expresí eNOS, protizánětlivým efektem inhibicí NF- κ B (anti-inflammatory effects via NF- κ B) a aktivací transkripčního faktoru časná odezvy růstu (early growth response-1, EGR-1). Tato dráha by mohla prezentovat ateroprotektivní působení (atheroprotecion).

Převzaté z: *The role of endoglin in atherosclerosis* [9].

2.3.1 Struktura endoglinu

ENG je homodimer složený ze dvou disulfidově vázaných podjednotek o velikosti 95kDa (viz obr.č.4) [23]. Skládá se z dlouhé extracelulární domény obsahující 561 aminokyselin, hydrofobní transmembránové domény a krátké cytosolické domény [21]. Cytosolická doména je konstitučně fosforylovaná a může tak být v odpovědi na TGF- β zacílena serin/threonin kinázami, přestože ENG sám vnitřní kinázovou aktivitu nemá [25],[9]. Ukázalo se, že stav fosforylace ENG může ovlivnit jeho subcelulární lokalizaci a buněčnou migraci [9].

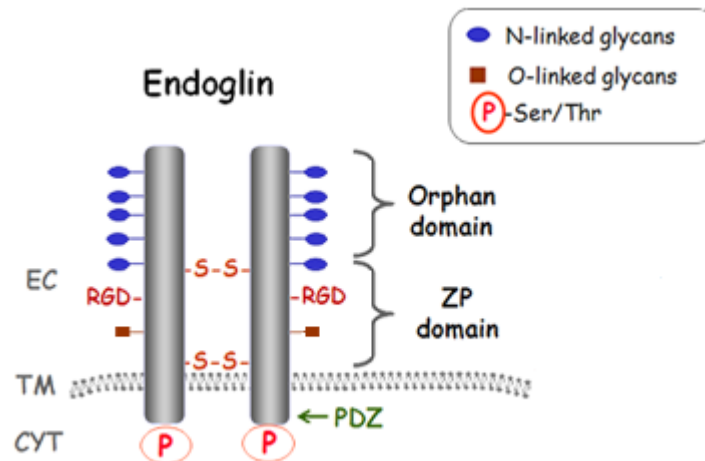
Lidský ENG také obsahuje peptidovou sekvenci Arg-Gly-Asp (arginin – glycin – kyselina asparagová, RGD motiv), která je známá jako místo pro buněčné rozpoznávání řady adhezních proteinů přítomných v extracelulární matrix. Tato sekvence chybí u myší, prasat i potkanů [25].

Existují dvě izoformy, objeveny jak v lidských, tak v myších tkáních: dlouhý (long, L-) ENG a krátký (short, S-) ENG. Proteiny S-ENG a L-ENG se vzájemně liší z hlediska jejich cytosolických zbytků, kdy S-ENG obsahuje 14 AMK a L-ENG obsahuje 47 AMK. L-ENG je dominantně exprimovanou izoformou a podněcuje signalizaci prostřednictvím ALK-1 dráhy zatímco S-ENG podněcuje spíše ALK-5 signalizaci [23]. Obě tyto izoformy jsou schopné vázat ligand ale liší se v úrovni fosforylace a v jejich schopnosti regulovat určité odezvy závislé na TGF- β [9].

Strukturálně se ENG řadí do rodiny *zona pellucida* (ZP) proteinů pro kterou je typická doména 260 AMK zbytků v jejich extracelulární části. Terminální NH-2 doména

naproti tomu nevykazuje žádnou významnou homologii k jakékoli proteinové rodině/doméně a proto je pojmenována jako *orphan domain* („osiřelá“ doména) [25].

Obrázek 4: Struktura ENG



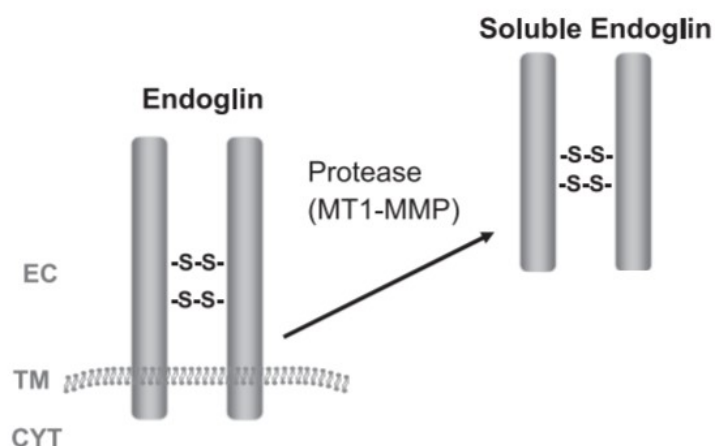
Obrázek zobrazuje strukturu ENG. ENG je dimer složený ze dvou stejných jednotek a spojený disulfidickou vazbou (-S-S-). Skládá se z dlouhé extracelulární domény (EC), která obsahuje ZP doménu o velikosti 260 AMK (ZP domain) a orphan doménu (orphan domain) na terminálním konci. Jsou zde zobrazena i místa N- a O-glykosylace (popis v pravém horním rohu) v extracelulární části. Pod extracelulární doménou se nachází transmembránová část (TM) a pod ní je cytosolická část (CYT) která je fosforylována (P) na místech serin/threonin zbytků.

Převzaté z: *The physiological role of endoglin in the cardiovascular system* [25].

2.3.2 Solubilní ENG

Solubilní ENG (sENG) vzniká proteolytickým štěpením nedaleko TM části membránově vázaného ENG za různých patologických stavů působením matrixové metaloproteinázy-14 (matrix metalloproteinase-14, MMP-14, MT1-MMP) jako hlavní proteázy uvolňující sENG do krevního oběhu (viz obr.č.5) [8]. Zvýšené hladiny cirkulujícího sENG byly nalezeny při různých patologických stavech související s kardiovaskulárním systémem jako je hypertenze, preeklampsie, diabetes mellitus II. typu, ateroskleróza či hypercholesterolémie. Předpokládá se tak, že vysoké hladiny sENG by mohly být považovány za biomarker související s rozvojem ED [22].

Obrázek 5: sENG



Obrázek znázorňuje vznik sENG (soluble endoglin, pravá strana obrázku) z membránově vázaného ENG (endoglin, levá strana obrázku) působením matrixové metaloproteinázy (protease, MT1-MMP), která odštěpí extracelulární doménu ENG.

Převzaté z: *The physiological role of endoglin in the cardiovascular systém* [25].

Zajímavé je, že sENG má potencionálně opačné účinky na endotel oproti membránově vázanému ENG. sENG totiž inhibuje vazodilataci závislou na eNOS a zvyšuje expresi adhezních molekul [26]. Toto je pravděpodobně výsledkem narušení vazby TGF- β 1 na jeho receptor a následným narušením signální dráhy, včetně účinků na aktivaci eNOS. Stále ovšem není jasné, zda sENG představuje pouhý biomarker, nebo je mechanicky zapojen do vaskulární patologie vlivem indukce ED [27].

2.3.3 Funkce ENG a jeho vztah k dysfunkci endotelu

Jak je již popsáno výše, endotelová syntáza NO (eNOS) je klíčový enzym pro produkci NO, který je velmi důležitý pro ochranu a správnou funkci endotelu a jeho snížená exprese je spojená se vznikem ED. Bylo popsáno, že exprese ENG silně souvisí s expresí eNOS [9]. ENG je zapojen do signalizace Smad2/3, která vyúsťuje právě v regulaci exprese a správné funkce eNOS v endotelových buňkách. ENG by tak mohl být považován za vazoprotektivní, nebo endotel-protektivní agens [8].

Na druhé straně můžou membránový ENG a sENG působit jako ligandy pro integriny leukocytů [8]. Integrinem zprostředkovaná adheze je zahrnuta v procesu hemostázy, trombózy a zánětu čili v procesech, ve kterých hraje endotel zásadní roli.

Existuje několik publikací ukazujících na vazbu ENG na leukocytové integriny a následnou extravazaci leukocytů, jakožto funkce ENG nezávislá na TGF- β dráze. Exprese ENG je totiž výrazná v endotelových buňkách tkání s probíhajícím zánětem a s přidruženým infiltrátem zánětlivých buněk. Navíc byla zvýšena exprese ENG v kapilárách, ve kterých dochází k infiltraci leukocytů do orgánů [10].

Srovnávací studie odhalily rozdíl ve funkci u jednotlivých izoform ENG. S-ENG má antiangiogenní efekt, naproti tomu L-ENG disponuje proangiogenním efektem [25]. Navíc také S-ENG v porovnání s L-ENG snižuje expresi eNOS [9].

ENG je spojován s několika proteiny, které jsou zapojeny do adheze endotelových buněk, proliferace, migrace, angiogeneze a vaskulární permeability. Jsou to například integriny, VEGF receptor typu 2 (VEGFR-2) nebo vaskulární endotelový kadherin (vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin) [10].

Stále také není známá definitivní role ENG v procesu aterogeneze. Exprese ENG v krevních cévách se zdá být součástí procesu neoangiogeneze, protizánětlivého působení a zlepšování endotelové dysfunkce. Naproti tomu uvolňování sENG vlivem aterosklerózy, hypertenze, diabetu či preeklampsie vede pravděpodobně k indukci endotelové dysfunkce a prozánětlivého působení [9]. Bylo zjištěno, že exprese ENG v pokročilých aterosklerotických placích byla snížena, zatímco hladiny sENG byly zvýšeny [8].

2.4 Adhezní molekuly

Všechny buňky neustále interagují se svým okolním prostředím, zejména se specifickými molekulami a dalšími buňkami v jejich bezprostřední blízkosti. Buněčné adhezní molekuly (cellular adhesion molecules, CAMs) jsou nedílnou regulační součástí těchto interakcí. Jak již vypovídá jejich název, CAMs podporují tyto adhezní interakce vytvořením vazeb mezi sousedními buňkami nebo mezi buňkami a extracelulární matrix. Některé adhezivní interakce jsou stabilní a mají dlouhou životnost, například mezi svalovými buňkami. Jiné adhezní interakce jsou přechodnější a slabší, jako je interakce leukocytů s endotelem (viz obr.č.6) [28]. CAMs jsou látky proteinového charakteru a jsou exprimovány na buněčném povrchu všech tkání [7].

CAMs fungují jako receptory, jenž ovlivňují intracelulární dráhy a jsou tak zásadní pro celou řadu biologických procesů, jako je organogeneze, migrace, buněčný růst a diferenciací, buněčná smrt či homeostatické procesy jako například zachování integrity endotelu. CAMs také hrají zásadní roli při vzniku zánětu. Jsou spojovány s endotelovou dysfunkcí a účastní se patogeneze řady onemocnění jako je ateroskleróza, ischemická choroba srdeční či diabetes mellitus [7], [28]. Solubilní formy CAMs jsou uvolňovány do cirkulující krve a jejich hladiny by tak mohly být považovány za markery ED [7]. Nádorové buňky navíc využívají CAMs ke svému růstu a šíření po celém těle [29].

Ačkoli redukce či blokáda funkce specifické CAM je možným terapeutickým způsobem jak omezit infiltraci či aktivaci zánětlivých buněk pro účel zmírnění zánětu, tento přístup je komplikován skutečností, že většina CAMs jsou exprimována na více než jednom typu buněk, dále většina buněk exprimuje na svém povrchu více než jednu CAM a také že několik molekul může fungovat jako ligand pro jednu CAM [29].

CAMs jsou klasifikovány do pěti základních skupin: integriny, CAMs imunoglobulinového typu, kadheriny, selektiny a muciny.

Integriny jsou glykoproteiny složené z α a β řetězce. Podílí se na adhezi leukocytů, usnadňují přisednutí krevních destiček na membránu poškozených krevních cév a dalších procesů důležitých pro hemostázu a opravu poškozených cév.

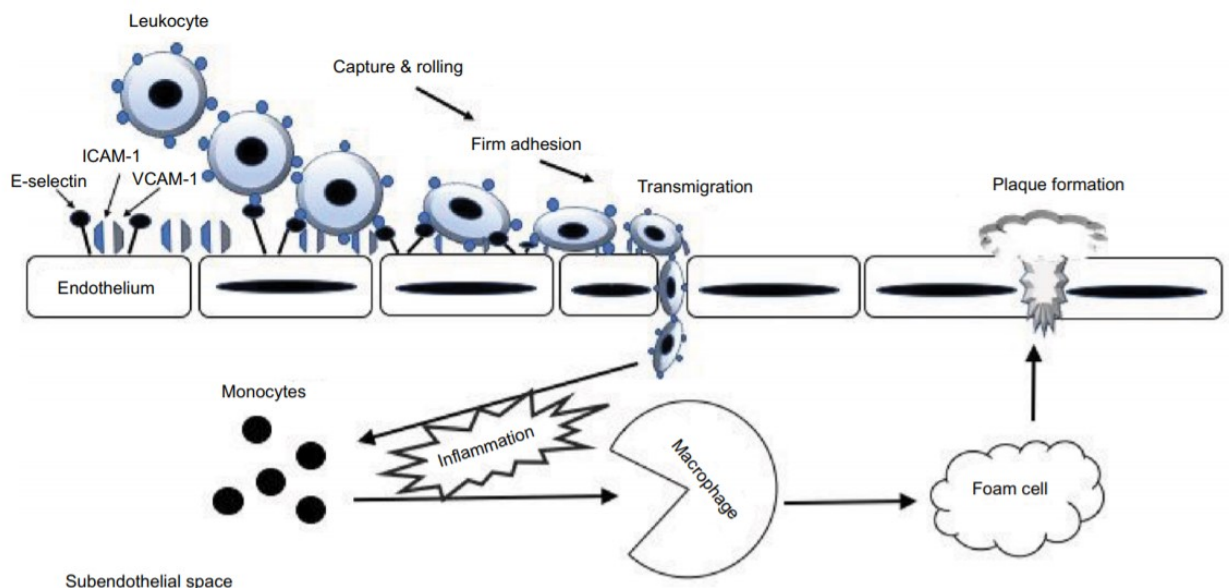
Imunoglobulinové CAMs zahrnují řadu adhezních molekul, z nichž jsou pro nás nejdůležitější ICAM-1 a VCAM-1, které budou popsány později.

Kadheriny jsou rodina CAMs závislých na vápníku. Patří tu E-, N-, P-, T – či VE-kadherin, přičemž vaskulární endotelové buňky exprimují VE-kadherin. Podílejí se na udržování integrity tkáně, mezibuněčné komunikaci či angiogenezi.

Selektiny jsou skupina, která se váže na sacharidové zbytky na povrchu sousedních buněk. Zahrnuje E-selektin, exprimovaný na endotelových buňkách a P-selektin exprimovaný endotelovými buňkami i destičkami.

Mezi muciny (glykoproteiny) s vysokou molekulovou hmotností se řadí např. epitelový mucin. Jsou vázány na povrch buněk či vylučovány epitelovými buňkami dýchacího či gastrointestinálního traktu a hrají roli v obraně proti cizorodým organismům [28].

Obrázek 6: Adheze leukocytů a jejich přestup přes endotel



Obrázek znázorňuje proces adheze a prostupu leukocytu přes endotel. V levé části obrázku vidíme cirkulující leukocyt (leukocyte) a pod ním jsou zobrazeny adhezní molekuly, které mají vliv na následnou adhezi leukocytu (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1). Selektiny jsou zapojeny do prvních dvou kroků kaskády. Interakcí s P/E-selektiny je umožněno zachycení (capture) leukocytu na stěnu endotelu a následné pohybování (rolling) podél endotelu. Následuje krok

přilnutí (firm adhesion) zprostředkované molekuly ICAM-1 a VCAM-1 a následná transmigrace (transmigration) přes poškozenou cévní stěnu do subendotelového prostoru (subendothelial space). Zde dochází vlivem zánětu (inflammation) ke kumulaci monocytů (monocytes), jejich přeměnu na makrofágy (macrophage) a poté na pěnové buňky (foam cell), které vedou ke vzniku aterosklerotického plátu (plaque formation).

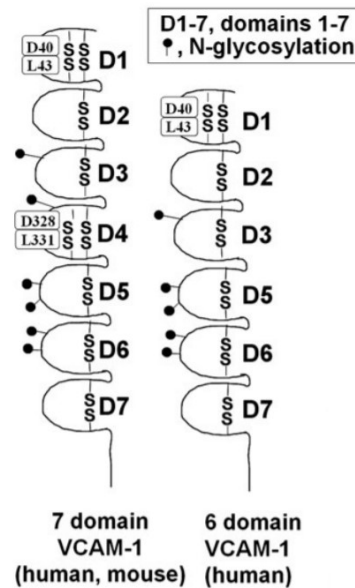
Převzaté z: Cell adhesion molecules and exercise [30].

Pro účely této diplomové práce jsou důležité zejména molekuly ICAM-1, VCAM-1, P-selektin a E-selektin, které jsou dále podrobněji popsány.

2.4.1 VCAM-1

Jak je již zmíněno v kapitole 2.4., VCAM-1 je členem nadrodiny imunoglobulinových proteinů. Jeho struktura zahrnuje několik extracelulárních imunoglobulinových domén představujících smyčky spojené disulfidickými vazbami, dále transmembránovou doménu, a nakonec cytoplazmatickou doménu složenou z 19 AMK s karboxylovými konci [31]. Transmembránová doména napomáhá ukotvení molekuly k plazmatické membráně, cytoplazmatická doména se zase účastní buněčné signalizace [28]. U lidí existují dvě formy VCAM-1 (viz obr č.7): VCAM-1 se sedmi extracelulárními domény, nebo VCAM-1 se šesti domény, který postrádá doménu č.4. [31].

Obrázek 7: Struktura VCAM-1 a jeho varianty



Obrázek znázorňuje možné struktury VCAM-1. Vlevo molekula obsahuje sedm domén, očíslovaných D1-D7. Vytváří smyčky a jsou spojeny disulfidickými vazbami (-S-S-). Tato varianta se nachází u lidí i myší (7 domain, human, mouse). Vpravo je molekula se šesti domény, která se vyskytuje pouze u lidí (6 domain, human). D40, L43 značí AMK na které se vážou integriny, o nichž je psáno níže v kapitole.

Převzaté z: *Vascular cell adhesion molecule-1. Expression and signaling during disease: Regulation by reactive oxygen species and antioxidants* [31].

Obecně je VCAM-1 exprimován na luminální a laterální straně endotelových buněk při zánětu [32]. Exprese je indukována cytokiny produkovanými ve tkáních, ROS, oxidovanými lipoproteiny o nízké hustotě (oxidized low density lipoprotein, oxLDL), vysokými koncentracemi GLU, nebo mikrobiální stimulací [31]. U silného zánětu či při chronických stavech je VCAM-1 exprimován také na povrchu dalších buněk, včetně tkáňových makrofágů, dendritických buněk, fibroblastů, myoblastů, Kuppferových buněk i nádorových buněk [33].

Exprese je regulována transkripčním nukleárním faktorem kappa B (NF-κB), aktivátorovým proteinem 1 (activator protein 1, Ap-1), specifickým proteinem 1 (specific protein, SP-1) a regulačním interferonovým faktorem 1. Uvádí se, že vysoké koncentrace ROS mohou aktivovat NF-κB a následně indukovat expresi VCAM-1 v aortálních endotelových buňkách [31].

VCAM-1 je hlavní regulátor adheze leukocytů a jejich migrace do subendotelového prostoru. Toto vykonává prostřednictvím interakce s integrinem $\alpha 4\beta 1$. Tento integrin je exprimovaný na povrchu leukocytů a adheruje k VCAM-1 na povrchu endotelových buněk. Váže se na doménu 1 a/nebo 4 [33]. Integrin $\alpha 4\beta 7$ se také váže na VCAM-1, ale s menší afinitou než na ostatní adhezivní molekuly [31]. Adheze leukocytů je popsána na obr.č.6 v předešlé kapitole.

VCAM-1 hraje roli při kardiovaskulárních onemocněních ale i embryonálním vývoji KVS systému. VCAM-1 je první adhezní molekula, která je exprimovaná před vývojem aterosklerotických plaků. V pokročilých stádiích aterosklerózy je exprimována i hladkosvalovými buňkami [31].

Studie založené na kultivaci endotelových buněk s vysokou koncentrací GLU jasně ukázaly nadprodukcii adhezních molekul, což naznačuje možnou patogenezi mezi hyperglykemií a aterosklerózou u diabetu mellitu [34]. Adhezní molekuly, které se sledují pro souvislost s diabetem jsou právě VCAM-1, ICAM-1 a P-/E-selektin.

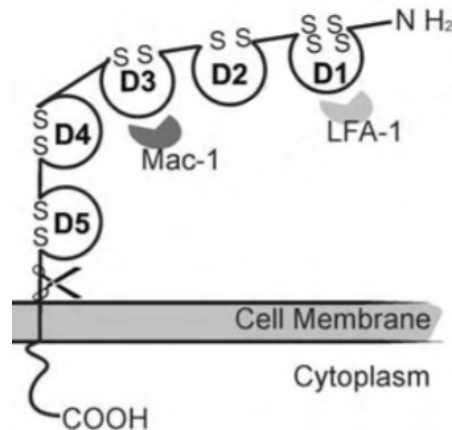
2.4.2 ICAM-1

ICAM-1 je stejně jako VCAM-1 transmembránový protein z nadrodiny imunoglobulinů. Jeho molekulová hmotnost je 80-114 kDa, podle stupně glykosylace. Neglykosylovaný ICAM-1 má 60kDa [18]. Je lokalizovaný na apikálním i bazolaterálním povrchu endotelových buněk, což je ideální poloha pro usnadnění transendotelové migrace leukocytů [29]. Jeho extracelulární část je složena z 453 AMK, které formují pět imunoglobulinových domén spojených disulfidickými vazbami (viz obr.č.8). Extracelulární část je připojena na hydrofobní transmembránovou část a krátkou cytoplazmatickou část. Tento cytoplazmatický konec je dlouhý pouze 28 AMK a postrádá jakoukoli vnitřní kinázovou aktivitu či doménu pro interakci s proteiny, skrze které by mohl přijímat signalizační molekuly. Má ale tyrozinový zbytek, který se signalizace účastní. [18].

Ukázalo se, že ICAM-1 existuje i v solubilní formě (sICAM-1) v krevním oběhu následkem proteolytického štěpení neutrofilovými proteázami [29]. Tento sICAM-1 obsahuje extracelulární doménu membránově vázaného ICAM-1, ale chybí doména

transmembránová a cytoplazmatická. Zvýšené hladiny sICAM-1 byly zjištěny v séru pacientů s KVS, nádorovými a autoimunitními onemocněními. Řada studií proto zkoumá možné použití sICAM-1 jako biomarkeru KVS chorob [18].

Obrázek 8: Struktura ICAM-1



Obrázek znázorňuje strukturu ICAM-1. D1-D5 zobrazují jeho imunoglobulinové domény vyčnívající nad buněčnou membránou (cell membrane) a spojené disulfidickými vazbami (S S). Jsou zde také zobrazeny ligandy Mac-1 vázající se na třetí doménu a LFA-1 vázající se na první doménu. Znak nůžek označuje místo štěpení pro vznik sICAM-1.

Převzaté z: ICAM-1 signaling in endothelial cells [18].

ICAM-1 je exprimován na endotelových ale i epitelových buňkách, lymfocytech, monocitech, eosinofilech, hematopoetických buňkách, jaterních buňkách či na fibroblastech [7]. Na rozdíl od VCAM-1 je v nízkých hladinách konstitutivně přítomný na endotelových buňkách ale jeho exprese je zvyšována stimulací buněk zánětlivými cytokiny jako je IL-1, TNF- α a interferon γ (IFN- γ) [35],[29]. Nejdůležitějšími ligandy pro ICAM-1 jsou na leukocytech exprimovány β_2 -integriny – antigen spojený s funkcí lymfocytů 1 (lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1), který ICAM-1 váže prostřednictvím své první imunoglobulinové domény. Dále je také důležitý antigen makrofágu 1 (macrophage-1 antigen, Mac1) vázající se na třetí imunoglobulinovou doménu [7], [35].

ICAM-1 hraje důležitou roli při odpovědích jak vrozené, tak adaptivní imunitní reakce. Podílí se na migraci leukocytů přes endotel do místa zánětu i na interakci mezi

buňkami prezentující antigen a T-buňkami [18]. Zvýšená exprese ICAM-1 při zánětu vede k adhezenci leukocytů na endotel, což je nezbytný krok pro jejich následnou migraci do místa zánětu [7]. Tento proces je popsán na obr.č.6.

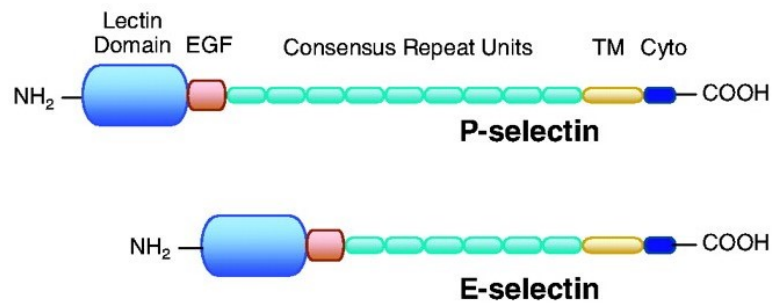
ICAM-1 je spojován stejně jako VCAM-1 s KVS onemocněním. Bylo též prokázáno, že dochází ke zvýšení hladiny ICAM-1 v lidských aortálních buňkách kultivovaných ve vysoké hladině GLU. Tato data ukazují na vysokou GLU jako na silný induktor adheze leukocytů na endotelové buňky v závislosti na up-regulaci ICAM-1, VCAM-1 a selektinů [34].

2.4.3 P/E-selektin

Selektiny jsou transmembránové lektiny závislé na vápenatých iontech (Ca^{2+}), které se vážou na specifické sacharidové skupiny na povrchu endotelových buněk [36], [28]. Exprese E-selektinu je omezena na endotelové buňky, kde funguje jako ligand pro leukocyty [28]. Je také konstitutivně exprimován na povrchu endotelových buněk kostní dřeně a kůže. V mnoha orgánech ale musí být k expresi E-selektinu endotelové buňky stimulovány TNF- α , IL-1 β nebo lipopolysacharidy (LPS) [36]. P-selektin je exprimován endotelovými buňkami i krevními destičkami [28]. Je také uložen v granulích, odkud může být rychle mobilizován na buněčný povrch v reakci na zánětlivé stimuly, jako je trombin, histaminové faktory, volné radikály a cytokiny [7].

Oba selektiny se skládají z N-terminální lektinové domény závislé na Ca^{2+} , domény podobné epidermálnímu růstovému faktoru (epidermal growth factor-like, EGF-like), série opakujících se extracelulárních domén, transmembránové domény a cytoplazmatického konce (viz obr.č.9) [36], [7]. Studie naznačují, že lektinová i EGF-like doména jsou zapojeny do buněčné adheze a můžou určit specifičnost vazby ligandu [7].

Obrázek 9: Struktura P/E-selektinu



Na obrázku je zobrazena struktura obou selektinů. Vlevo je vidět terminální lektinová doména (lectin domain), pod ní se nachází EGF-like doména (EGF), série opakujících se domén (consensus repeat units), transmembránová doména (TM) a cytoplazmatický konec (Cyto).

Převzaté z: *Distinct kinetic and mechanical properties govern selectin-leukocyte interactions* [online]. Dostupné na: <https://jcs.biologists.org/content/117/12/2503> [19.3.2020]

Selektiny jsou rozhodující pro interakci leukocytů s endotelovými buňkami. Umožňují fázi rolování leukocytu po povrchu endotelu, jako předpoklad pro pevné přilnutí a následnou transendoteliální migraci z krevního řečiště do místa zánětu [28]. Toto rolování je umožněno interakcí selektinů s jejich glykosylovanými ligandy [36]. Za ligand P-selektinu je považován P-selektin glykoproteinový ligand 1 (PSGL-1). U E-selektinu je to buď PSGL-1 nebo E-selektin ligand 1 (ESL-1) [7].

Tyto selektiny jsou spojovány se vznikem patologického zánětu a trombózou. Pacienti se zánětlivými a trombotickými poruchami obvykle mají vyšší hladiny aktivovaných destiček exprimujících P-selektin [36]. Tyto destičky jsou také hlavním zdrojem cirkulujícího P-selektinu. E-selektin může být také uvolňován do krve, a to proteolytickým štěpením nebo uvolněním z buněčného povrchu aktivovanými buňkami [37].

Stejně jako VCAM-1 a ICAM-1, selektiny jsou studovány ve spojitosti s výskytem diabetu mellitu II. typu. Solubilní formy selektinů jakožto biomarkery, byly hlášeny v případech mikroangiopatických změn pozorovaných u pacientů s diabetem mellitem II. typu [38].

2.5 Diabetes mellitus

2.5.1 Definice

Diabetes mellitus (DM) je onemocnění charakterizované absolutním či relativním nedostatkem inzulínu [39]. Lze ho považovat za obecný termín pro skupinu metabolických poruch s hlavním rysem chronické hyperglykémie pramenící buď z narušené sekrece inzulínu (INZ), nebo snížené účinnosti INZ, nejčastěji však obojí [40].

Chronická hyperglykémie způsobuje dlouhodobé poškození, dysfunkci až selhání různých orgánů [41]. Ovlivňuje endotelovou funkci jak ve velkých krevních cévách, tak v drobných cévách tedy mikrocirkulaci. Makrovaskulární onemocnění se podobá aterosklerotickým lézím jak morfologicky, tak funkčně. Mikrovaskulární komplikace se projevuje jako retinopatie, nefropatie, neuropatie, kardiomyopatie, vaskulární abnormality dolních končetin a další [42].

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) definuje DM jako stav, kdy hodnota plazmatické GLU nalačno je rovna, nebo vyšší než 7 mmol/l, nebo kdy hodnota plazmatické GLU ve 120. minutě po provedení orálního glukózo-tolerančního testu (oGTT), kdy pacient vypije 300ml vody se 75g GLU, je rovna, nebo vyšší než 11,1 mmol/l [43],[17]. Hodnota GLU ve 120.minutě oGTT 7,8-11 mmol/l je považována za porušenou glukózovou toleranci neboli také prediabetes, který má za následek urychlený vývoj aterosklerózy a zejména vznik DM (viz tab.č.1) [17].

Tabulka 1: Diagnostická kritéria pro DM

Glykémie (mmol/l)	Norma	Prediabetes	DM
Nalačno	≤ 5,5	5,6-6,9	≥ 7
120.min. oGTT	<7,8	7,8-11	≥ 11

Tabulka přehledně ukazuje hodnoty GLU používané pro diagnostiku DM.

Počet diabetiků se neustále zvyšuje, za posledních 20 let se jejich počet až zdvojnásobil [17]. Navíc v některých zemích je nediodagnostikovaných až 30% pacientů [43].

2.5.2 Typy DM

Známe DM I. a II. typu, gestační diabetes a specifické typy diabetu se známými příčinami, jako je diabetes vyvolaný poškozením pankreatu, léky (neuroleptika, glukokortikoidy...), genetickými defekty β -buněk pankreatu, infekcí nebo autoimunitně zprostředkovaný [40]. DM 2. typu je nejčastější formou a představuje 90-95 % ze všech typů [1].

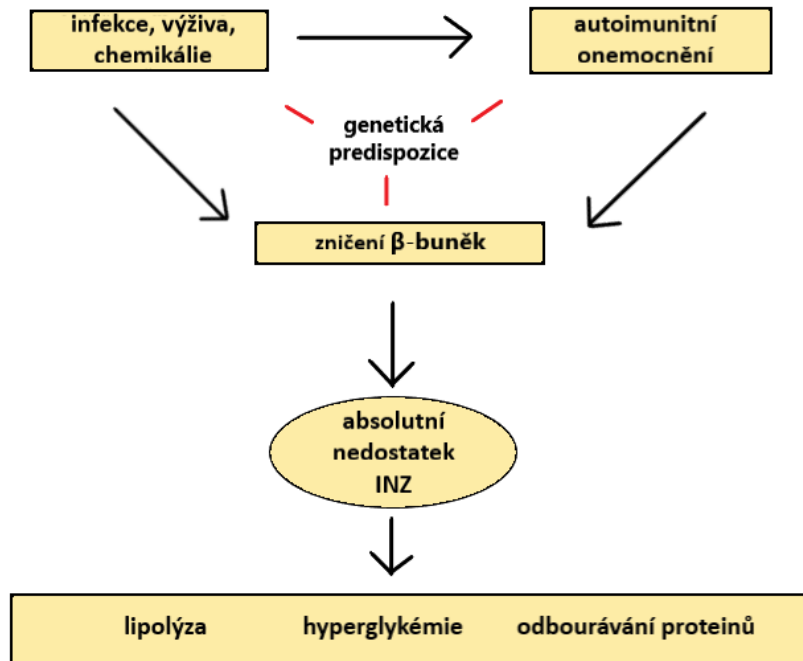
2.5.2.1 DM I. typu (DM1)

DM I. typu je charakterizován absolutním nedostatkem INZ způsobený zničením β -buněk pankreatu jako následek působení autoimunitní reakce T-lymfocytů proti antigenům β -buněk [39]. Jako mnoha jiných imunitně zprostředkovaných chorob, DM1 vykazuje heterogenitu ve smyslu věku nástupu, závažnosti a účinnosti terapie [44]. Běžně se hovoří o tzv. imunitně podmíněném DM1 s detekovatelnými protilátkami, či idiopatickém DM1, který přítomnost protilátek nevykazuje. Idiopatický typ je mnohem méně častý [17].

Jako u převážné většiny autoimunitních chorob, primární příčina DM1 není zcela známá [44]. Předpokládá se, že autoimunitní reakce může být spuštěna virovou infekcí, výživou či chemikáliemi (viz obr.č.10) [39]. Autoprotilátky mohou být detekovány již měsíce či roky před klinickou manifestací DM1 [44]. Nejčastěji se objevují protilátky proti glutamátdekarboxyláze exprimované na β -buňkách pankreatu [39].

Absolutní nedostatek INZ vede k porušenému využívání GLU, lipolýze a odbourávání proteinů. Překročení ledvinného prahu reabsorpce GLU se projeví jako glykosurie. GLU v moči způsobí zvýšenou osmotickou nabídku pro ledviny, a to vede k polyurii, která je důsledkem dehydratace a pocitu žízně. Vlivem odbourávání proteinů je nemocný unavený a hubne. MK uvolňované v důsledku lipolýzy jsou více oxidovány a stoupá tak hladina ketolátek v krvi [17]. U některých pacientů, zejména dětí či adolescentů, je prvním projevem nemoci ketoacidóza [41].

Obrázek 10: Vznik DM1



Na obrázku jsou znázorněny vzájemně propojené faktory vedoucí ke zničení β -buněk pankreatu. Následkem je absolutní nedostatek INZ vedoucí ke zvýšené lipolýze, hyperglykémii a odbourávání proteinů.

Vytvořeno na základě obrázku: Atlas patofyziologie [39]

2.5.2.2 DM II. typu (DM2)

DM2 je nejčastější formou diabetu. V tomto případě je nedostatek INZ relativní [39]. Projevuje se inzulínová rezistence, kdy buňky ztrácejí citlivost na účinky INZ a tím je znemožněn vstup GLU z periferie do buněk. Na hyperglykémii se navíc podílí i masivní tvorba GLU v játrech protože je omezen inhibiční vliv INZ na glukoneogenezi a glykogenolýzu [39], [17]. Sekrece INZ může být oproti DM1 normální, ze začátku dokonce zvýšená, protože zvýšená nabídka GLU v krvi stimuluje pankreas k další tvorbě INZ, čemu se říká hyperinzulinémie. Ta je schopná nejprve inzulínovou rezistenci překonat a udržet normální hladiny glykémie do té doby, než sekrece INZ poklesne a vyvine se hyperglykémie [17].

Tato forma diabetu je často mnoho let nediagnostikovaná, protože hyperglykémie se vyvíjí postupně a v časných fázích nemoci nejsou příznaky tak

markantní, aby si pacient všiml některého z klasického symptomu diabetu. Přesto jsou tito pacienti již v riziku vzniku makrovaskulárních i mikrovaskulárních komplikací [41]. Proto je také často DM2 diagnostikován až při objevení komplikací [17].

Na vzniku onemocnění se podílejí genetické i civilizační faktory [45]. Největšími rizikovými faktory jsou obezita, hypertenze, dyslipidémie a kouření [43]. Soubor rizikových faktorů, který se často vyskytuje společně a vede ke vzniku DM2 i aterosklerózy se označuje jako metabolický syndrom. Jeho hlavní kritéria jsou: obezita centrálního typu, arteriální hypertenze, dyslipidémie, hyperglykémie a hyperurikémie [17].

Při obezitě vede ukládání viscerálního tuku ke vzniku zánětu, který také hraje roli při vzniku diabetických komplikací. Nejvíce zasaženými orgány při nahromadění lipidů jsou svaly, tuková tkáň a játra, což vede k dalšímu zhoršení INZ rezistence, a to snížením exprese i celkového počtu receptorů pro INZ. Přebytný tuk aktivuje tzv. Toll-like receptory na makrofázích v tukové tkáni, které poté produkují TNF- α [46].

Převládající formou LDL cholesterolu jsou u diabetických pacientů malé částice o vysoké hustotě, které jsou více aterogennější než velké LDL částice. Tyto malé částice jsou náchylnější k oxidaci, což přitahuje monocyty měnící se následně na makrofágy, jak je již zmíněno v kapitole 2.2 [43]

Až 80 % všech úmrtí diabetických pacientů je způsobeno KVS komplikacemi. Pacienti s DM2 mají až čtyřnásobně vyšší riziko opakujících se atherotrombotických příhod a vaskulárních komplikací ve srovnání s pacienty bez DM [1].

2.5.3 Hyperglykémie a její vliv v patogenezi diabetes mellitus a vztah k endotelové dysfunkci

Pro pochopení buněčných i molekulárních mechanismů odpovědných za DM je důležité zmínit, jak je glykémie regulována [47]. Hormonální regulace je zajišťována INZ, který představuje hypoglykemizující faktor, a glukagonem jakožto hyperglykemizujícím faktorem [17]. GLU vstupuje do β -buněk pankreatu pomocí transportéru GLUT-2, kde je GLU fosforylována glukokinázou a dále metabolizována za tvorby adenosintrifosfátu (ATP). ATP je nezbytný pro dodání energie potřebné pro

uvolnění INZ, a navíc se podílí na buněčné membránové depolarizaci. Uzavřením draslíkových kanálů β -buněk dojde k depolarizaci a otevření vápenatých kanálů, které vede k uvolnění granulí obsahující INZ [47], [17].

Je známo, že hlavním místem účinku INZ je membrána buněk kosterních svalů, tukových a jaterních buněk [17]. INZ receptor je specifický membránový receptor umístěný na těchto buňkách a disponuje tyrozinkinázovou aktivitou [48], [17]. INZ tuto tyrozinkinázu stimuluje, což vede k fosforylaci intracelulárního substrátu pro INZ receptor (IRS1). Aktivací dalších proteinů poté dojde k přesunutí transportéru pro GLU do buněčné membrány a tím je umožněn přestup GLU do buňky [17].

INZ signalizace zahrnuje dvě hlavní cesty: cesta závislá na fosfatidylinositol-3-kináze (PI3K), která je odpovědná za metabolické a hemodynamické účinky a cesta závislá na mitogenem aktivované proteinové kináze (MAPK) což je cesta pro regulaci genové exprese, diferenciaci a buněčný růst. Obecně prostřednictvím dráhy PI3K INZ podporuje produkci NO a skrze signalizaci přes MAPK podporuje produkci ET-1. Za podmínek INZ rezistence je ovšem dráha PI3K narušena, a naopak se aktivuje dráha MAPK. To má za následek snížení produkce NO a zvýšení ET-1 a tím vliv na ED [1].

Přetrvávající hyperglykémie způsobuje makrovaskulární i mikrovaskulární komplikace jak u DM1, tak DM2 [46]. U těchto komplikací studie ukazují na porušenou endotelovou dysfunkci v souvislosti s hyperglykémií, a to jak na zvířecích modelech, tak u lidí. Předpokládá se, že hyperglykémie způsobuje poškození cév vytvářením nerovnováhy mezi biologickou dostupností NO a kumulací ROS, které vznikají oxidační metabolizací GLU a to dále vede k poškození β -buněk pankreatu [48], [1]. Hyperglykémie také aktivuje NF- κ B, který způsobuje produkci CAMs a cytokinů, což vede k aktivaci zánětlivých buněk a tvorbě vaskulárního zánětu. Navíc vede taky ke zvýšené expresi koagulačních tkáňových faktorů, což je následkem protrombotického stavu [1].

Jak už bylo zmíněno v předešlých kapitolách, zvýšená produkce ROS je hlavním zdrojem oxidativního stresu. Existuje několik mechanismů, kterými GLU vyvolává oxidační stres. Zahrnují autooxidaci GLU, tvorbu produktů pokročilé glykace (AGEs),

zvýšení exprese receptorů pro AGE (RAGE), zvýšení hladiny volných mastných kyselin (free fatty acids, FFA) a mitochondriálního generování ROS [46], [1].

AGEs jsou důsledkem chronické hyperglykémie. Primární aminoskupiny proteinů podléhají v hyperglykemickém prostředí reverzibilní nonenzymatické glykosylaci [49].

AGE po navázání na receptor RAGE zvyšuje produkci superoxidu, který podporuje vaskulární zánět. AGEs navíc snižují produkci eNOS a zvyšují produkci ET-1, což přispívá k ED [1].

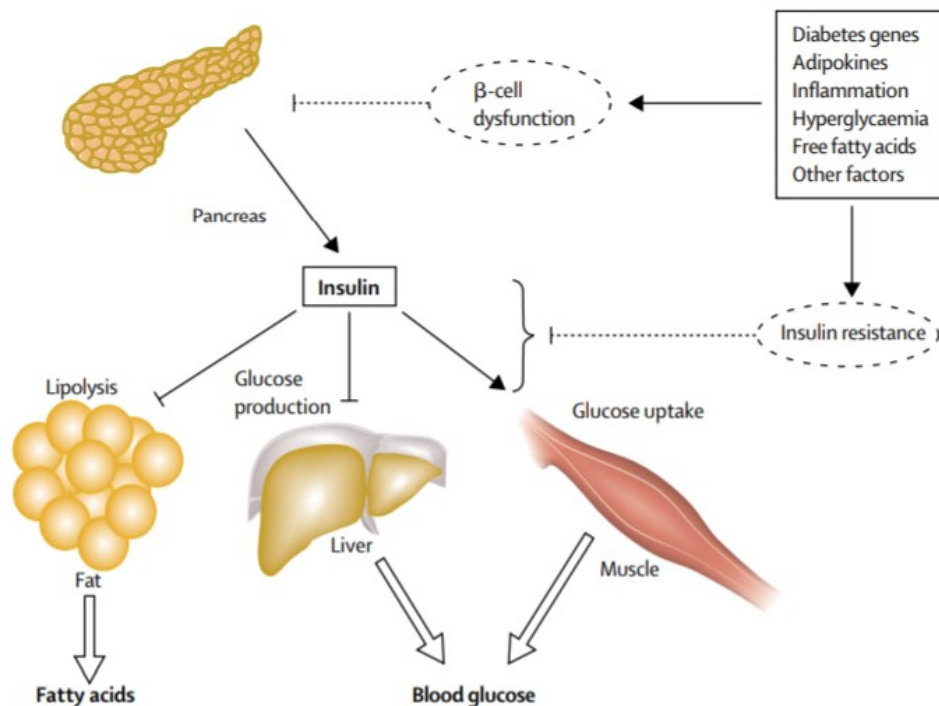
Ketoaldehyd je produktem autooxidace GLU a je také členem AGE, kdy poskytuje vysoce reaktivní oxidanty, které se stávají zdrojem pro vyvolání oxidačního stresu [46].

Glukotoxicita a hyperinzulinémie indukovaná INZ rezistencí je spojená s fosforylací serin/threoninu IRS1. To zhoršuje interakci s tyrozinkinázou INZ receptoru a následně vede k přerušení normální INZ signalizace [47], [46]. Za normálních podmínek se jedná o velmi důležitý mechanismus, který zastaví činnost INZ. Ovšem za podmínek DM2 hyperfosforylace IRS proteinů vede k chronické buněčné desenzibilizaci na INZ [46].

FFA také ovlivňují signální INZ kaskádu (viz obr.č.11). FFA inhibují inzulinem stimulovaný metabolismus GLU v kosterních svalech a stimulují glukoneogenezi v játrech [47].

Nadměrné množství FFA způsobuje lipotoxicitu, která narušuje normální endotelovou funkci stejným způsobem jako glukotoxicita, tedy produkcí ROS. FFA také aktivují NF- κ B co vede k aktivaci zánětlivé kaskády [1]. Tuková tkáň navíc uvolňuje cytokiny (tzv. adipokiny), zahrnující např. TNF- α a interleukiny [43]. Ve výsledku tedy FFA způsobují snížení biologické dostupnosti NO, zvýšení oxidačního stresu a zesílení vaskulárního zánětu [1].

Obrázek 11: Patofyziologie hyperglykémie a FFA



V pravém horním rohu jsou uvedeny faktory vedoucí k INZ rezistenci (insulin resistance) a k dysfunkci β -buněk (β -cell dysfunction): diabetes genes – geny pro diabetes, adipokines – adipokiny (cytokiny produkované tukovou tkání), inflammation – zánět, hyperglycaemia – hyperglykémie, free fatty acids – volné mastné kyseliny, other factors – jiné faktory. Tyto faktory tedy ovlivňují jak sekreci INZ, tak jeho působení.

Za normálních okolností sekrece INZ z pankreatu snižuje produkci GLU v játrech, zvyšuje absorpci GLU v kosterních svalech a potlačuje uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně. Snižovaná sekrece INZ bude snižovat jeho signalizaci v cílových tkáních. INZ rezistence vede tedy ke zvýšení FFA a hyperglykémie a také obráceně zvýšená koncentrace GLU a FFA v cévním řečišti zhoršuje sekreci INZ a INZ rezistenci.

Lipolysis – lipolýza, Fat – tuk, Fatty acids – mastné kyseliny, Glucose production – produkce GLU, Liver – játra, Blood glucose – GLU v krvi, Muscle – sval, Glucose uptake – absorpce GLU

Převzaté z: Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy [47].

Z uvedeného tedy vyplývá, že hyperglykémie, nadbytek FFA a INZ rezistence zvyšují oxidační stres, narušují transdukcii intracelulárních signálů, zvyšují produkci AGEe a expresi RAGE. Důsledkem je snížení syntézy NO a vznik abnormalit v cévním endotelu [43].

2.6 PCR

2.6.1 Základní princip

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je nejrozšířenější *in vitro* metodou pro zmnožení úseku DNA. Disponuje širokým využitím včetně sledování genové exprese, detekce somatických mutací či kvantitativní měření infekčních agens [50].

Tato technika zahrnuje použití krátkých úseků syntetizované DNA zvaných primery a termostabilní DNA polymerázu k dosažení enzymatické amplifikace cílové DNA [51]. Volba DNA polymerázy závisí na cíli experimentu. Existuje celá řada komerčně dostupných enzymů lišící se např. tepelnou stabilitou. Nejběžněji používaným a nejstudovanějším enzymem je tzv. Taq DNA polymeráza pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*. Primery se skládají z 15-25 nukleotidů. Aby byla polymerace účinná, jejich 3'konec musí odpovídat cíli [52].

Díky vysoké citlivosti, i malý kousek DNA relativně špatného stavu může být amplifikován [51]. Jako vzorek může být použita jednovláknová či dvouvláknová DNA jakéhokoli původu, ale také RNA molekuly po konverzi na komplementární DNA (cDNA) enzymem reverzní transkriptáza [52].

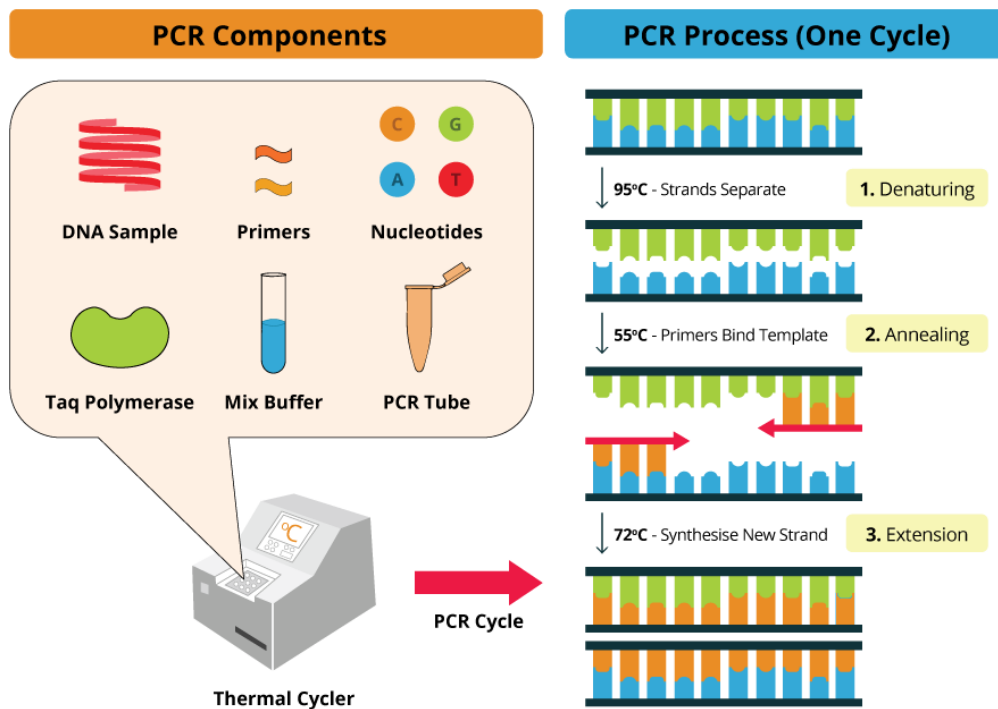
Proces PCR zahrnuje 3 fáze (viz obr.č.12):

1. Denaturace dvouvláknové DNA (ne pokud se jedná o amplifikaci RNA, protože je to menší molekula)
2. Nasednutí primeru
3. Prodloužení primeru [51]

Pro tento proces je důležité dodržet náležité teploty. Nejprve se použije vysoká teplota (95 °C) pro denaturaci vláken DNA, poté se teplota sníží (55-65 °C) aby primery mohly nasednout na templát a nakonec se teplota nastaví na 72°C, což je optimální teplota pro DNA polymerázu, která prodlužuje primery za využití deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs) [53]. dNTPs jsou přidávány na 3'konec každého primeru který je komplementární k cíli, takže cílová sekvence je zkopírována. 5'konec

primeru definuje cílovou délku PCR produktu. Tyto 3 kroky tvoří jeden PCR cyklus. Obvykle se provádí 30 - 40 cyklů [51].

Obrázek 12: Proces PCR



Obrázek graficky znázorňuje potřebné reagenty (PCR Components) k analýze prováděné v termocykléru (thermal cycler). Vedle je znázorněn výše zmíněný základní proces PCR (PCR Process). První je fáze denaturace, kdy dojde rozdělení jednotlivých vláken DNA při teplotě 95 °C (denaturing). Následuje nasednutí primeru na vlákna DNA při teplotě 55-65 °C (annealing). Následně vzrůstem teploty na 72 °C dojde k prodloužení primerů začleněním dNTPs na jejich 3'konec (extension).

Převzaté z: PCR fundamental principles. [online] Dostupné na: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-pcr> [18.3.2020]

2.6.2 Real-time PCR

PCR rozlišuje několik různých variant. Pro tuto práci bude nejdůležitější tzv. real-time PCR neboli PCR prováděná v reálném čase. Je to postup amplifikace, který je monitorován již během procesu PCR pomocí fluorescenční techniky [54]. Umožňuje sensitivní, specifickou a reprodukovatelnou kvantifikaci nukleových kyselin [55]. Hlavní výhodou real-time PCR v porovnání s konvenční PCR je výrazně vyšší spolehlivost výsledků protože známe celý profil amplifikace [54]. Disponuje širokým využitím, z nichž nejběžnější je analýza genové exprese [56].

Metody pro detekci DNA jsou rozděleny do dvou hlavních skupin dle používaného fluorescenčního markeru a specifity detekce. První skupina používá interkalační činidla dvouvláknové DNA (double stranded DNA, dsDNA), např. SYBRGreen, umožňující specifickou i nespecifickou detekci amplifikovaných produktů. Druhá skupina používá sondy značené fluorofory navázané k oligonukleotidům a detekuje pouze specifické produkty PCR [57].

Nejčastěji používanou oligonukleotidovou sondou je tzv. TaqMan (viz obr.č.13). Tato sonda má dvě kovalentně navázaná fluorescenční barviva - tzv. "reporter" na 5'konci primeru a tzv. "quencher"(zhášec) na 3'konci primeru. Fluorescenční signál může být detekován pouze po rozštěpení této sondy. Když je sonda neporušená, fluorescenční emise části "reporter" je zachycována zhášecí částí mechanismem transferu fluorescenční rezonanční energie (fluorescence resonance energy transfer, FRET) a působí tak preventivně před vyzařováním fluorescenčního signálu ještě před dokončením celého jednoho PCR cyklu. K rozštěpení sondy dojde působením Taq polymerázy. Část "reporter" je oddělována s každým PCR cyklem a vede ke zvýšení intenzity fluorescence úměrně množství amplifikovaného produktu [55].

Obrázek 13: TaqMan fluorescence



Na obrázku je v levé části znázorněna fáze nasednutí primeru a TaqMan sondy (TaqMan probe) na vlákno DNA. Je zde vidět, že sonda je neporušená, části „reporter“ a „quencher“ jsou blízko sebe jako prevence emise jakékoli fluorescence. Vpravo je vidět rozpojení částí během PCR fáze prodlužování vlivem Taq DNA polymerázy kdy, již je detekována fluorescence dle množství amplifikovaného produktu.

Převzato z : *Basic principles of real-time quantitative PCR* [55].

Používané nástroje zahrnují termocyklér s integrovaným zdrojem excitačního světla (např. laser), dále fluorescenční detekční systém a software který zobrazuje zaznamenaná data fluorescence jako křivku amplifikace DNA (viz. Obr č.3) [57].

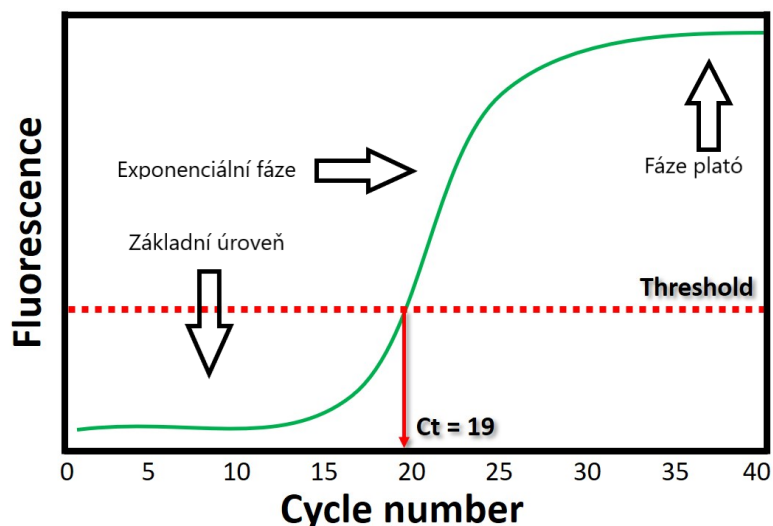
Pokud máme RNA vzorek, musíme ho nejprve zkopírovat do cDNA, abychom mohli měřit genovou expresi. Tento krok přepisu pomocí reverzní transkriptázy je pro přesnou kvantifikaci kritický. Množství produkované cDNA musí správně odrážet vstupní množství RNA. Reakce může probíhat bez přidaného primeru, ale vyšší účinnosti se dosáhne, když je primer přidán. Tři základní strategie jsou založeny na oligo(dT) primeru, náhodné sekvence primeru a genově specifického primeru [53].

Při real-time PCR se objevují specifické chyby vzhledem k minoritním rozdílům v počátečním množství RNA, kvality RNA nebo rozdílům v účinnosti cDNA syntézy. Za účelem minimalizace těchto chyb a normalizaci hodnot RNA se používá tzv. housekeep genů. Mezi nejčastěji používané se řadí glyceraldehyd-3fosfát dehydrogenáza (GAPDH), hypoxanthin fosforibosyltransferáza 1 (HPRT1), cytoskeletální protein či ribozomální RNA (rRNA). Tyto geny by měly být exprimovány na konstantní hladině napříč různými

tkání organismů, ve všech fázích vývoje a jejich hladina exprese by také měla zůstat relativně konstantní za různých experimentálních podmínek [55].

Výstup real-time PCR je ve formě grafu, který se také nazývá jako graf amplifikace (viz obr.č.14). Z počátku je křivka plochá a na základní úrovni, protože množství amplifikovaného produktu se dosud nenakumuloval do bodu, ve kterém je fluorescenční signál detekovatelný. Poté se křivka prudce zvyšuje – představuje exponenciální fázi reakci. Ukazuje přímý vztah mezi intenzitou fluorescenčního signálu a množstvím akumulovaného produktu. Nakonec se křivka znovu vyrovná, tzv. plató fáze, kdy dojde k vyčerpání reakčních činidel [58]. V grafu je též zaznamenaná prahová úroveň (tzv. threshold) která značí počet cyklů potřebných pro dosažení fluorescenčního signálu. Počet těchto cyklů se označuje hodnotou Ct [53].

Obrázek 14: Graf amplifikace



Graf představuje průběh změny křivky fluorescence během počtu cyklů. Počátek křivky (základní úroveň) představuje prvních 0-15 cyklů, kdy ještě není možné detekovat fluorescenci. Jakmile je množství produktu dostatečně amplifikováno, vstoupí do exponenciální fáze. Poslední fází křivky je fáze plató, kdy dojde k vyčerpání reakčních činidel. Práhová úroveň (threshold) značí počet cyklů potřebných pro dosažení fluorescenčního signálu vyjádřenou hodnotou Ct.

Převzaté z: *What is A Cycle Threshold (Ct) Value in qPCR?* [online] Dostupné z: <https://toptipbio.com/ct-value-qpcr/> [19.3.2020]

2.7 Průtoková cytometrie

2.7.1 Základní princip

Průtoková cytometrie je metoda, která poskytuje rychlou analýzu jednotlivých buněk či částic v roztoku [59]. Častým cílem analýzy je klasifikace buněk jako pozitivní či negativní pro daný marker nebo určení přesného poměru pozitivních a negativních buněk [60]. Buněčné populace mohou být analyzovány na základě jejich fluorescence či rozptylu světla [59].

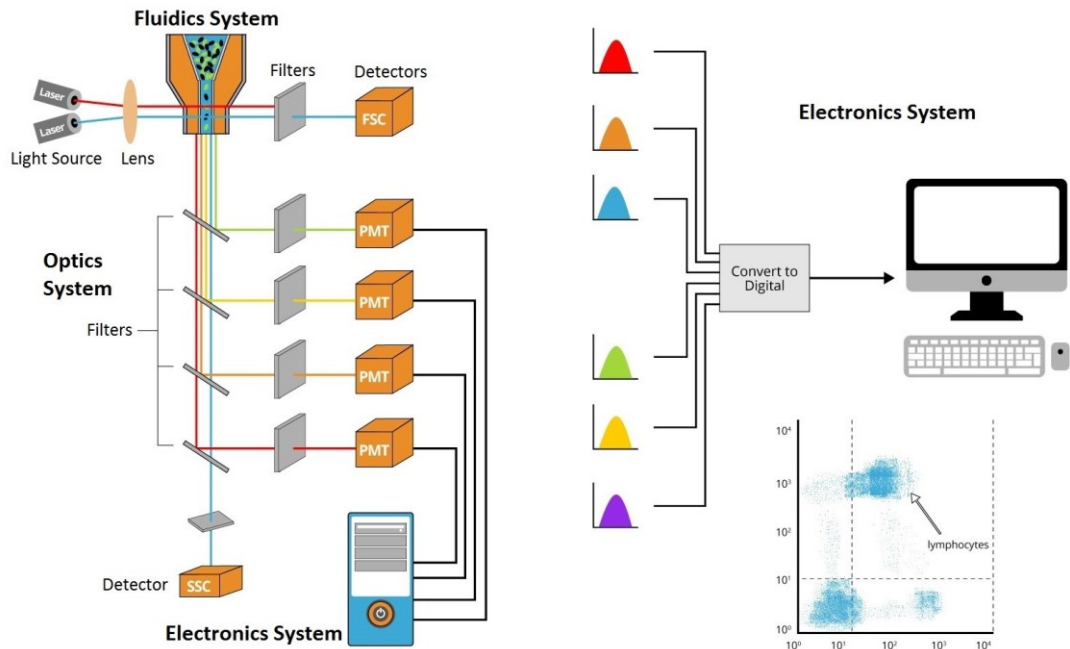
Pro průtokovou cytometrii na bázi fluorescence, jsou buňky či buněčné částice specificky označeny. Používá se celá řada fluorescenčních činidel. Příkladem můžou být fluorescenční konjugované protilátky, barviva vázající DNA, či fluorescenční proteiny. Často používaným reagentem pro konjugaci protilátky je např. *Alexa Fluor 647* která má konzistentní emisní spektrum [59].

Průtokové cytometry využívají lasery jako zdroje světla k produkci rozptýlených i fluorescenčních světelných signálů které jsou snímány detektory. Tradiční průtokový cytometr se skládá ze třech systémů: fluidika, optika a elektronika (viz obr.č.15). Fluidika obsahuje tekutinu, která soustředí vzorek na laser, kde je analyzován. Systém optiky generuje viditelný a fluorescenční signál používaný k analýze vzorku. Skládá se z excitační optiky tvořenou lasery a sběrací optiky tvořenou fotodiody či fotonásobiči (photomultiplier tubes, PMT). Elektronický systém převádí signál do digitální formy a může tak být snímám počítačem [59].

V každém cytometru je důležité, aby buňky nebo částice, které mají být analyzovány byly ve formě suspenze a poté byly pod tlakem vpraveny do proudu tekutiny [61]. Ale i nominální suspenze jednotlivých buněk obsahuje buňky ve shlucích. Tekutina obsažená v cytometru napomáhá, aby nedošlo k obstrukci v průtokové trubici a aby každá buňka byla ozářena stejně [62]. Vzorek se nastříkuje jako základní proud do většího sloupce nosní tekutiny [61]. Soustředěný tok bez ucpání je založen na principu hydrodynamiky - používá se termín tzv. hydrodynamické fokusace = úzký proud buněk tekoucí v jádře o širším pouzdru [62]. Vzduch, nebo jiný plyn, tlakuje oba proudy a je to právě tlakový rozdíl mezi těmito proudy, který řídí rychlost vstřikování

vzorku. Laserové paprsky jsou soustředěny tak, aby osvětlovaly pouze jednu konkrétní částici v daný okamžik [61].

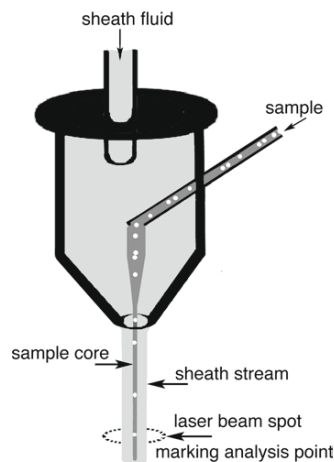
Obrázek 15: Systém průtokové cytometrie



Obrázek znázorňuje proces při průtokové cytometrii. Systém fluidiky (fluidics system) pomocí tekutiny soustředí vzorek na laser. Obsahuje průtokovou komoru (viz obr.č.16) do které je vstříknut vzorek. Systém optiky (optics system) se skládá z různých filtrů, světelných detektorů a zdrojů, kterým je povětšinou laserová linie produkující konkrétní vlnovou délku světla při specifické frekvenci. Průchod laserovým paprskem excituje kompatibilní fluorescenční sondy, které jsou konjugované s protilátkami. To způsobuje, že sonda emituje světlo při specifických vlnových délkách. PMT značí fotonásobiče, což jsou senzory, které detekují fluorescenci. Tyto signály jsou následně elektronickým systémem převedeny do digitální formy a snímány počítačem.

Převzaté z: Flow cytometry fundamental principle, How FACS works [online] Dostupné na: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/flow-cytometry-principle> [19.3.2020]

Obrázek 16: Průtoková komora

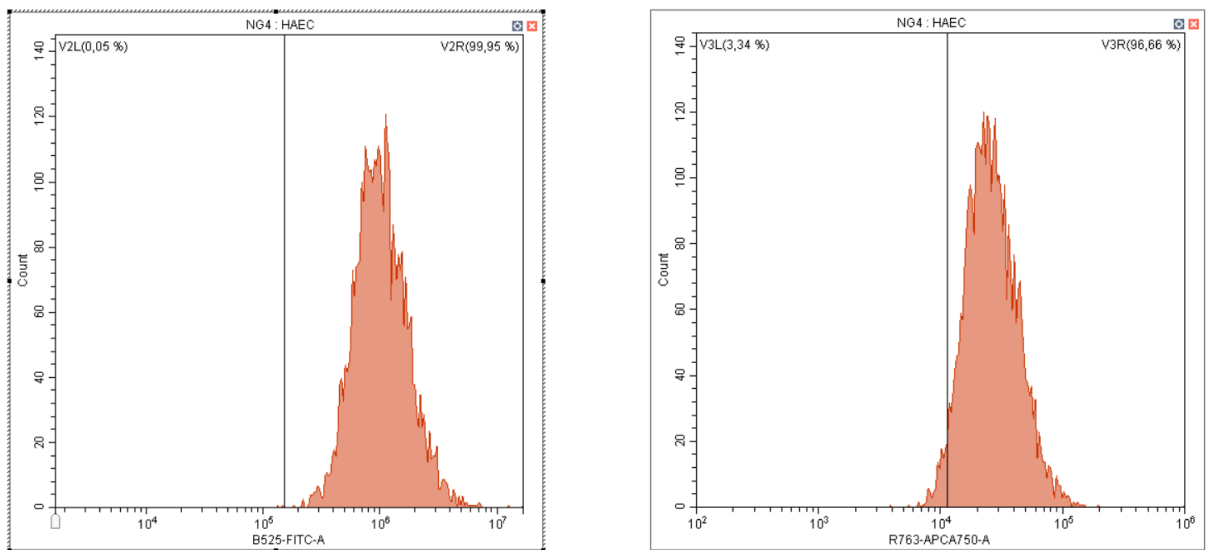


Obrázek znázorňuje průtokovou kyvetu se vstříknutým vzorkem (*sample*) do nosní tekutiny (*sheath fluid*) a formující se centrální jádro v nosním proudu. Malý průměr průtokové komory na jejím výstupním otvoru způsobuje zúžení nosního proudu a jádra vzorku tak, že buňky proudí rychle a jsou oddělené od sebe, což je důležité pro následný průchod laserovým paprskem.

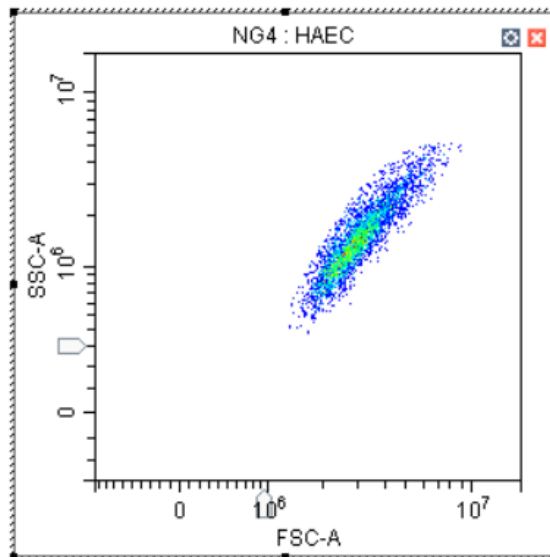
Převzato: Flow cytometry, an introduction [62].

Výstupem cytometrie je histogram nebo bodový graf (*dot plot*). V případě histogramu, osa x představuje fluorescenci (či intenzitu rozptylu) a osa y představuje počet částic s odpovídající intenzitou světla. Pokud je například buňka označena fluorescenčně značenou protilátkou zaměřenou na povrchový protein, intenzita fluorescence bude tedy přímo úměrná úrovni exprese tohoto proteinu. Při použití více protilátek je tak možné stanovit expresi více membránově vázaných či intracelulárních markerů jedné buňky [61].

Obrázek 17: Histogram



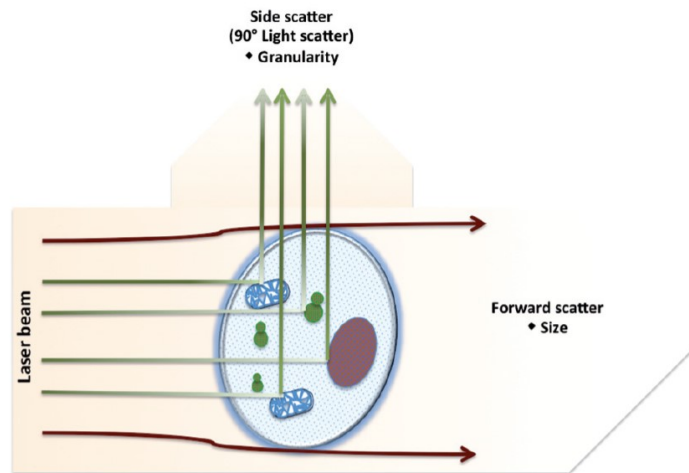
Obrázky znázorňují příklad histogramů, jakožto výstup z průtokové cytometrie. Osa x značí fluorescenci, osa y počet částic, které odpovídají intenzitě světla. Signály se stejnou intenzitou se akumulují ve stejném bodě. Ideálně se vytvoří jeden znatelný pík [63].



Obrázek 18: Bodový graf

Na obrázku je zobrazen bodový graf, který se používá k rozlišení různých buněčných populací dle velikosti a struktury. FSC-A, forward scatter značí přední rozptyl, SSC-A, side scatter značí postranní rozptyl (viz obr.č.8). FSC je úměrný ploše buněčného povrchu či velikosti, SSC je úměrný rozmanitosti buněčné struktury[63].

Obrázek 19: FSC, SSC rozptyl



Obrázek znázorňuje výše popsaný laserový rozptyl. Laserový paprsek (laser beam) procházející buňkou vyvolává přední rozptyl (Forward scatter), který je proporcionální velikosti buňky (size), a dále postranní rozptyl (side scatter), jež je proporcionální granularitě buňky (granularity, neboli rozmanitost struktury)

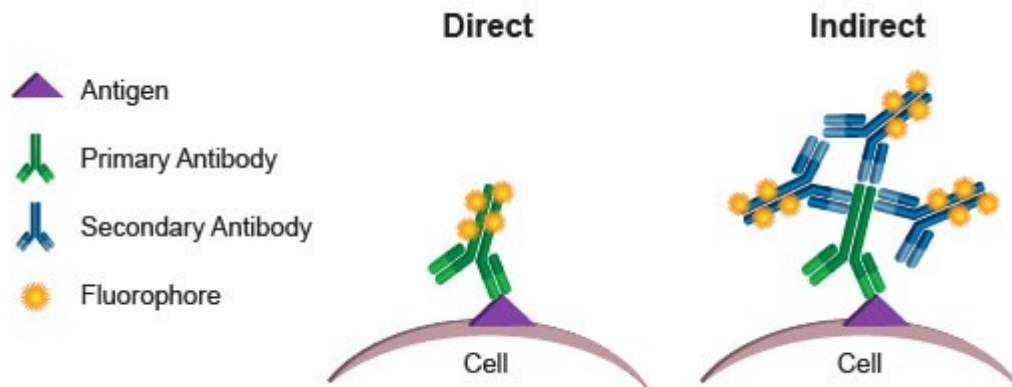
Převzaté z: *Flow cytometry: basic principles and applications* [63].

2.7.2 Typy průtokové cytometrie

Největší aplikace imunofluorescence v průtokové cytometrii je identifikace specifických rysů buněčného povrchu, ale i určení existence či syntézy intracelulárních složek. Protilátky mohou být tedy připraveny k identifikaci specifických determinant uvnitř, či na povrchu buněk. Jak již zmiňuji výše, tyto protilátky jsou barveny fluorescenčními činidly, aniž by došlo k poškození jejich specifity. Dle tohoto barvení může být cytometrie rozdělována na:

1. přímou – jednokrokový proces, kdy je již protilátka fluorescenčně označena a přímo namířená proti cílové molekule
2. nepřímou – použití druhého činidla. Nepřímá metoda tedy spočívá v označení sekundární protilátkou, která je fluorescenčně značena, namířenou proti primární protilátce, která není spojena s fluorochromem [64].

Obrázek 20: Přímá a nepřímá průtoková cytometrie



Obrázek znázorňuje přímou (direct) a nepřímou (indirect) průtokovou cytometrie. U přímé lze vidět primární protilátku (primary antibody) již označenou fluorochromem (fluorophore) a navázanou na antigen cílové buňky (cell antigen). U cytometrie nepřímého typu je na primární protilátku ještě navázána protilátka sekundární (secondary antibody), která je značena fluorochromem.

Převzato z: *Overview of flow cytometry [online]. Dostupné na: https://www.cellsignal.com/contents/_/overview-of-flow-cytometry/flow-cytometry-overview [20.3.2020]*

Dle typu použitého cytometru, se dále metoda může rozdělovat na:

1. Tradiční průtokovou cytometrii, která se skládá ze systému fluidiky, optiky a elektroniky (viz kapitola 2.7.1.)
2. Fluorescenční třídění buněk, které umožňuje třídění buněk na ty, které jsou pozitivní/negativní požadovanému parametru
3. Obrazovou cytometrii, která kombinuje tradiční cytometrii s fluorescenční mikroskopií
4. Hmotnostní cytometrii, která kombinuje hmotnostní spektrometrii a průtokovou cytometrii. Buňky jsou označeny kovově značenou protilátkou namísto fluorescenční.
5. Spektrální cytometrii, kde spektrální analyzátor měří celé fluorescenční emisní spektrum pro každý fluorochrom [59].

3. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo změřit expresi markerů endotelové dysfunkce ENG, eNOS, adhezní molekuly VCAM-1, HIF1 α a transkripčních faktorů regulujících expresi endoglin, jako KLF6, RELA, LXR v endotelových buňkách lidské aorty, které byly vystaveny působení oscilující glukózy. Jejich exprese mRNA byla změřena prostřednictvím kvantitativní real-time PCR. Proteinové hladiny ENG a VCAM-1 byly změřeny metodou průtokové cytometrie. U obou metod byla experimentální skupina porovnána s kontrolní skupinou buněk, které byly vystaveny konstantním hladinám normální glukózy.

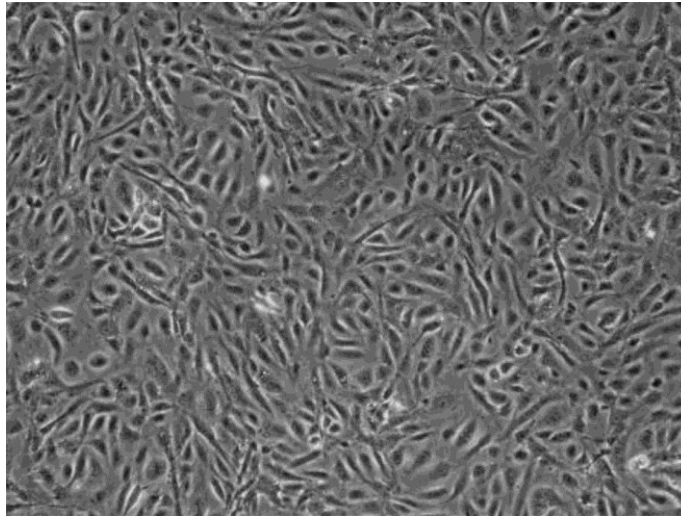
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 HAEC

V našem experimentu byly použity lidské endotelové buňky aorty, tzv. HAEC. Tyto buňky obecně v živém organismu hrají důležitou roli při regulaci vaskulárního tonu, modulují expresi buněčných adhezních molekul a vyvolávají změnu v produkci látek odvozených od endotelu, čímž hrají roli v zánětlivých procesech, vazokonstrikci, i růstu cév. Produkují antitrombotické a trombotické faktory, reagující s TNF- α , který koreluje se zánětlivým procesem produkcí cytokinů jako je faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) a regulují produkci oxidu dusnatého a endotelinu. Tato buněčná kultura je proto vhodná pro studium endotelové dysfunkce a patogenezi vaskulárního onemocnění [65].

Buňky jsou schopné proliferovat po mnoho generací a pod optickým mikroskopem mají homogenní morfologii (viz obr.č.21) [65]. Veškerá manipulace s buňkami probíhá v laminárním boxu. Další důležitý přístroj je inkubátor, který udržuje teplotu na 37 °C a 5 % CO₂, což je optimum pro růst buněk. Pro kultivaci je nutné médium, které poskytuje buňkám substrát potřebný k životu i růstu. Buňky postupně pokryjí celé dno kultivační nádoby a vytvoří jednu souvislou vrstvu. To je stádium, kdy již není možné dalšího růstu a je nutno provést pasážování, kterým se rozumí přenesení částí buněk z kultivační nádoby do nové [66].

Obrázek 21: HAEC



Na obrázku lze vidět kultivaci HAEC buněk pod optickým mikroskopem.

Převzaté z: Human aortic endothelial cells [online]. Dostupné na: <https://innoprot.com/product/human-aortic-endothelial-cells/> [22.3.2020]

4.2 Příprava vzorků

4.2.1 Rozmrazování buněk

Nejprve jsme si museli pro náš experiment rozmrazit buňky –HAEC.

První krok zahrnoval nahřátí želatiny a HAEC média ve vodní lázni.

Složení 0,1% želatiny:

- *Sterilní PBS (=fosfátový tlumivý roztok) + 2% želatina, takže například 76 ml PBS + 4ml 2% želatiny*

Složení HAEC média:

- *200 ml EGM-2 (endothelial cell growth medium = medium pro růst endotelových buněk)*
- *22 ml FBS (fetal bovine serum = fetální hovězí sérum)*
- *800 µl FGF (fibroblast growth factor= fibroblastový růstový faktor)*

- 80 μ l hydrokortison
- 200 μ l VEGF (*vascular endothelial growth factor*= cévní endoteliální růstový faktor)
- 200 μ l R₃-IGF (*recombinant insulin-like growth factor*= rekombinantní růstový faktor podobný insulinu)
- 200 μ l acidum ascorbicum
- 200 μ l hEGF (*human epidermal growth factor*= lidský epidermální růstový faktor)
- 200 μ l GA-1000 (= gentamicin sulfát amfotericin)
- 200 μ l heparin

Následně jsme do kultivačních misek přidali želatinu – do každé misky 2ml. Krouživým pohybem se zajistilo pokrytí celého povrchu misky, aby se na ni později buňky dobře uchytily. Následovalo 20 minut inkubace při teplotě 37 °C pro správné přilnutí.

Po uplynutí 20 minut jsme přebytečnou želatinu odsáli. Přidali jsme 8 ml EGM-2 média. Kultivační misky jsme ponechaly v boxu a zmrazené buňky jsme lehce rozmrazili na vodní lázni tak, aby ve zkumavce stále zůstala malá kulička ledu. Následně jsme veškerý obsah ze zkumavky přenesli do kultivačních misek a umístili do inkubátoru.

4.2.2 Pasážování

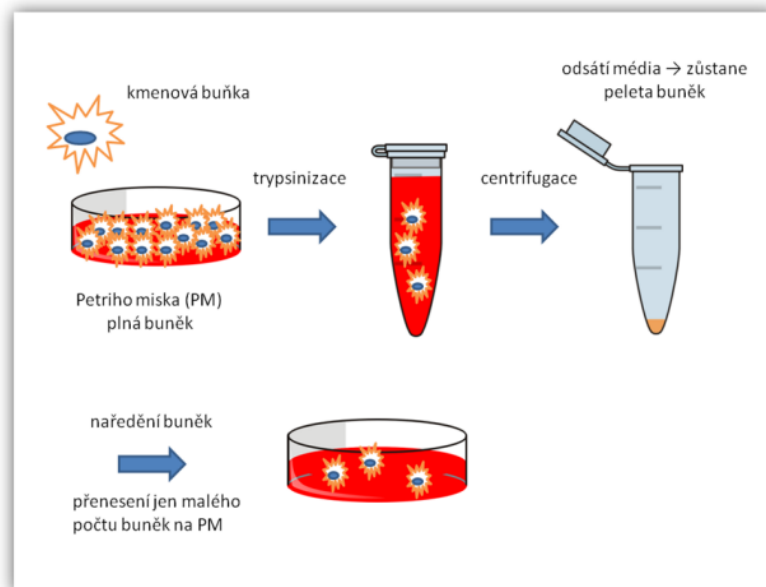
Před vlastním procesem pasážování jsme museli buňky pod mikroskopem zkontrolovat, zda dosahují požadované 80–90 % konfluence. Pasážovali jsme po 2 dnech.

Do vodní lázně jsme dali nahřát médium, želatinu, PBS a enzym akutázu. Připravili jsme potřebný počet kultivačních misek na pasážování a ty se následně pokryly 2ml želatiny a daly na 20 minut do inkubátoru, stejně jako v postupu při rozmrazování buněk.

Z kultivačních misek s HAEC buňkami jsme odsáli staré médium, přidali 3 ml PBS pro odstranění mrtvých buněk a následně jsme PBS odsáli. Poté jsme přidali 2 ml enzymu akutázy pro oddělení HAEC buněk ode dna nádoby a nechali na 10 minut v inkubátoru při 37°C. Mezitím jsme odsáli želatinu z kultivačních misek a napipetovali do nich 10 ml nového média.

Po uplynutí 10 minut jsme do misek s akutázou přidali 3 ml média na zastavení akutázy, několikrát propláchli a následně přenesli do kónické zkumavky - tzv. falkonky o objemu 15 ml. Pro zajištění přenesení všech buněk do falkonky jsme stejný postup opakovali ještě jednou. Následně jsme falkonky umístili do centrifugy na 5 minut při 1000 otáčkách za minutu (revolutions per minute, rpm). Po uplynutí 5 minut se buňky usadily na dně ve zkumavce a medium s akutázou, které zůstalo nahoře jsme odsáli. K buňkám jsme následně přidali 3 ml média, resuspendovali a následně pipetou rozdělili po 0,5 ml do připravených misek s médiem. Misky jsme na následující 4 dny uložili do inkubátoru a průběžně kontrolovali.

Obrázek 22: Pasážování buněk



Obrázek znázorňuje postup pasážování. Buňky narostlé na Petriho misce jsou rozvolněny (zde na obrázku pomocí enzymu trypsin, my jsme použili akutázu), a po přidání média k zastavení reakce přeneseny do kónické zkumavky a zcentrifugovány. Médium je následně odsáto a peleta

buněk je naředěna přidáním nového média. Vzniklá suspenze je přenesena do nové petriho misky.

Převzaté z: *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů* [66].

4.2.3 Výměna média

Po dobu jednoho týdne jsme buňkám každých 24 hodin měnili médium, střídavě roztokem s normální a vysokou glukózou.

Počítali jsme s 20 kultivačními miskami (na PCR i průtokovou cytometrii) a do každé misky jsme přidávali po 5ml roztoku glukózy.

Experimentální design:

1. *Kontrolní skupina* – Normální glukóza (NG) = 5 mmol glukózy (GLU) + 20 mmol mannitolu (MAN); připadalo na ni 10 kultivačních misek
2. *Experimentální skupina* – Vysoká glukóza (HG) = 25 mmol GLU; připadalo na ni 10 kultivačních misek

Tabulka 2: Použité médium s GLU podle dnů

Den	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Kontrolní skupina	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
Experimentální skupina	HG	NG	HG	NG	HG	NG	HG

NG – normální glukóza, HG – vysoká glukóza

Výpočet potřebného množství GLU:

$$m = c \cdot V \cdot M_m$$

a) Množství GLU do HG:

$$= 25 \cdot 50 \cdot 180,16$$

$$= \underline{\underline{225,2 \text{ mg GLU}}}$$

b) Množství GLU do NG:

$$= 5 \cdot 50 \cdot 180,16$$

$$= \underline{\underline{45,0 \text{ mg GLU}}}$$

c) Množství MAN do NG:

$$= 20 \cdot 50 \cdot 182,17$$

$$= \underline{\underline{182,2 \text{ mg MAN}}}$$

Vypočítanou GLU a MAN jsme navážili na analytických váhách a následně rozpustili v potřebném množství média. Z kultivačních misek jsme odsáli staré médium, propláchli PBS, odsáli a poté přidali 5 ml roztoku glukózy do každé misky dle plánu – tedy vysoká glukóza experimentální skupině jeden den či normální glukóza všem skupinám den druhý a tak dále (viz tabulka č.2).

4.3 PCR

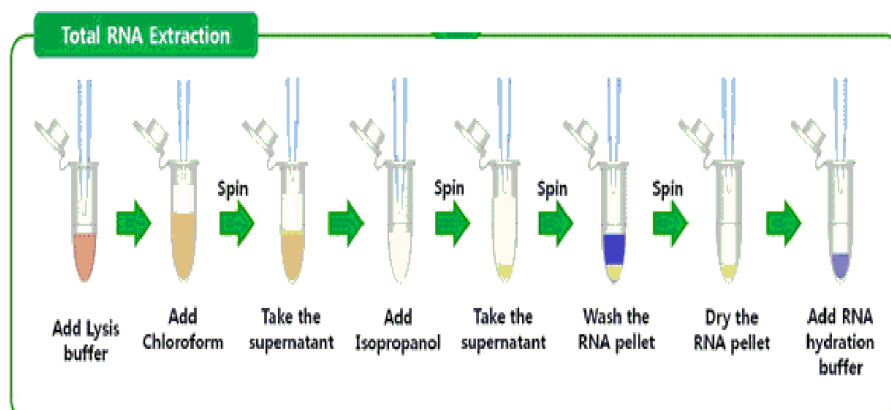
První krok zahrnoval přípravu vzorku. Kultivační misky jsme propláchli PBS, odsáli a do každé misky přidali 2 ml TRI Reagent™ Solution (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), který zajistil izolaci potřebné RNA z buněk. Na 5 min jsme kultivační misky ponechali na ledě a následně přenesli do centrifugačních mikrozkupek (VWR International, Pennsylvánie, USA) po 1 ml, tedy z jedné petriho misky jsme dostali 2 vzorky.

Následoval krok homogenizace RNA. Použili jsme nejprve sonikátor (UP100H, Hielscher Ultrasonics, Německo) a poté ještě několikrát natažení inzulinovou stříkačkou.

Ke vzorkům jsme následně přidali 0,2 ml chloroformu a krátkým třepáním jsme do něj RNA vytřepali. Vzorky byly ponechány 5 minut v klidu a poté jsme je centrifugovali po dobu 15 minut při 4 °C a 15 000 rpm. Po centrifugaci jsme mohli v mikrozkupečkách pozorovat oddělení vodní a organické (fenolové) vrstvy a na jejich rozhraní bílý povlak, tzv. buněčný debris (viz obr.č.23)

Dále jsme si do laminárního boxu připravili nové mikrozkupekky s 4 µl GenElute™-LPA (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) na stabilizaci nukleových kyselin (NK) a opatrně pipetou přidali vodnou fázi tak, abychom nenabrali zmíněný buněčný debris. Poté jsme přidali 0,5 ml izopropylalkoholu (IPA) na precipitaci RNA, několikrát zhomogenizovali na vortexu a umístili do centrifugy na 10 minut při 15 000 rpm a teplotě 4°C. Na dně se vytvořila peletka obsahující RNA. Odsáli jsme od ní IPA a přidali 1 ml 75 % etanolu na odstranění soli a zkoncentrování RNA. Ethanol jsme následně odsáli a počkali, než peletka začala na vzduchu vysychat. Poté jsme peletku rozpustili ve 20µl aqua pro injectione (voda pro injekci), zhomogenizovali na vortexu a vložili na 20 minut do lednice.

Obrázek 23: RNA extrakce



Obrázek znázorňuje výše popsany postup RNA extrakce. Ke vzorku se přidá chloroform (add chloroform), do kterého se RNA vytřepe. Po centrifugaci je patrná oddělená vodná a organická vrstva. Vodná fáze se opatrně přenesse (take the supernatant) do druhé mikroskopavky a přidá izopropylalkohol (add isopropanol). Po centrifugaci se opatrně odsaje supernatant (take the supernatant) a na dně zůstane peletka RNA, ke které je pro vyčištění přidán ethanol (wash the RNA pellet). Následně se počká, než peletka na vzduchu vyschne (dry the RNA pellet) a poté se rozpustí ve vodě (add RNA hydration buffer).

Převzaté z: *Blood RNA PrepMate [online] Dostupné na: <https://bioneer.com.au/Special-Pages/Print.aspx?printpath=/Products/DNA-RNA-Preparation-Kits/Solution-type-Nucleic-Acid-Extraction-Kits/RNA-Extraction-Kits/Blood-RNA-PrepMate> [24.3.2020]*

Následně se mohlo přejít k měření RNA na spektrofotometru (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Německo). Byl zvolen dilution factor (faktor ředění) 1000, jednotky: ng/μl a lid factor: 50. Vzorky jsme měřili po objemech 1,5 μl. Před každým vzorkem bylo potřeba kyvetu pečlivě utřít kouskem buničiny, aby byly výsledky co nejpřesnější. Začalo se změřením tzv. blank vzorku, který představoval pouze aqua pro iniectione (API) a sloužil k eliminaci absorpce ostatních látek a tím zajištění přesnosti měření. Každý vzorek byl naředěn na koncentraci 400-1000 ng/mL.

Po naměření všech vzorků následoval krok přepisu RNA na cDNA. Naředili jsme vzorky na 100 ng/μl dle tabulky č. 2. Dále jsme dle tabulky č. 3 jsme připravili mix na přepis.

Tabulka 3: Ředění RNA

	NG1	NG2	NG3	NG4	NG5	NG6	NG7	NG8	NG9	NG10	NG11	NG12
ng/uL	725,6667	709,5	625	866	603,3333	797	707,25	754,6667	966,2	614,6667	799	723,3333
vzorka (uL)	1,38	1,41	1,60	1,15	1,66	1,25	1,41	1,33	1,03	1,63	1,25	1,38
API (uL)	8,62	8,59	8,40	8,85	8,34	8,75	8,59	8,67	8,97	8,37	8,75	8,62

	HG1	HG2	HG3	HG4	HG5	HG6	HG7	HG8	HG9	HG10	HG11	HG12
ng/uL	999,6667	609,6667	663,6667	486,5	502,5	769,5	531	481	563	583,5	647,5	634
vzorka (uL)	1,00	1,64	1,51	2,06	1,99	1,30	1,88	2,08	1,78	1,71	1,54	1,58
API (uL)	9,00	8,36	8,49	7,94	8,01	8,70	8,12	7,92	8,22	8,29	8,46	8,42

Vzorky – NG1-NG12 a HG1-HG12. API – aqua pro iniectione

Tabulka 4: Mix na přepis

		množ.	nadb.	vzorek (uL)
1	nuclease free water	4,2	4,536	127,008
2	RT buffer	2	2,16	60,48
3	RT random primers	2	2,16	60,48
4	dNTP mix	0,8	0,864	24,192
5	reverse transcriptase	1	1,08	30,24

Nuclease free water – voda prostá nukleáz, *RT buffer* – pufr pro reverzní transkripci, *RT random primers* – náhodné primery pro reverzní transkripci, *dNTP mix* – mix deoxynukleotidtrifosfátů, *reverse transcriptase* – reverzní transkriptáza

Smíchali jsme 10 µl vzorku s 10 µl mixu na přepis (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific) v mikrozkušnicích o objemu 200 µl (Schoeller Pharma Praha, CZ) a vložili do termocykléru (Biometra TOne 96G, Analytik Jena, Německo).

Po skončení procesu přepisu jsme získali 1000 ng cDNA v objemu 20 µl (koncentrace = 50 ng/µl). Vzorky jsme si dále naředili na koncentraci 5 ng/µl přidáním 180 µl API.

Potom jsme do 96jamkových destiček (MicroAmp™ Optical 96 – Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Kaliforna, USA) napipetovali směs 5 µl master mixu (TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Kaliforna, USA) a 0,5 µl primeru na každou použitou jamku dle Tab.4. Poté jsme do každé jamky přidali 4,5 µl našeho vzorku, přičemž všechny vzorky byly pipetovány v duplikátech. Destičku jsme zakryly fólií (Adhesive PCR plate seals, Applied Biosystems) a poté centrifugovali po

dobu 2 minut při 1000 rpm. Následně jsme vzorky vložili do přístroje (QuantStudio™ Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Kalifornia, USA).

Tabulka 5: 96jamková destička

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NG											
B												
C	HG											
D												
E												
F												
G												
H												

Čísla (1-12) značí sloupce destičky a písmena (A-H) její řádky – destička tedy obsahuje 12 sloupců po 8 jamkách. Vzorky byly napipetovány v duplikátech – tedy NG do jamek v řádku A+B a HG do jamek v řádku C+D.

Získaná data byla vyhodnocena za pomoci delta-delta Ct metody. Delta-delta Ct metoda je pohodlný způsob, jak analyzovat relativní změny v genové expresi při kvantitativní real-time PCR. Hodnoty Ct získané z PCR se snadno importují do tabulky programu jako je Microsoft Excel [67]. Ct značí prahový cyklus, kdy hladina fluorescence dosáhne určitého množství [68]. Stanoví se z logaritmicke-lineárního grafu signálu PCR proti počtu cyklů [67]. První delta Ct je rozdílem v prahovém cyklu mezi cílovým a kontrolním genem. Delta-delta Ct je poté rozdílem mezi delta Ct a průměrem delta Ct kontrolní skupiny. Konečný výsledek je potom prezentován jako změna exprese cílového genu normalizovaná ke kontrolnímu genu [68].

Takto vyhodnocená data byla následně zpracovaná v statistickém programu GraphPad Prism 8 (verzia 8.4.0; GraphPad Software Inc., CA, USA).

4.4 Průtoková cytometrie

Nejprve bylo potřeba oddělit buňky ode dna kultivační misky. Do vodní lázně jsme dali nahřát médium, PBS a akutázu. Poté jsme z kultivačních misek odsáli médium, přidali PBS, odsáli PBS a napipetovali 2 ml akutázy. Misky jsme vložili na 10 min do inkubátoru.

Po 10 min jsme k akutáze v kultivačních miskách přidali 3 ml média, několikrát propláchli a objem přenesli do falkonky o objemu 15 ml. Označili jsme si řadu falkonek NG a řadu HG. Falkonky jsme vložili do centrifugy na 5 minut při 1000 rpm.

Vzniklý supernatant jsme opatrně odsáli, k buňkám přidali 3 ml PBS a zhomogenizovali. Objem falkonky jsme rozdělili do 3 mikrozkušavek. Poté následovala centrifugace na 5 minut při 1000 rpm a teplotě 4 °C. Odsáli jsme PBS nad sedimentovanými buňkami a přidali 1 kapku R.T.U. 2,5 % Normal Goat Serum (Vector Laboratories Ltd, UK), které zablokovalo nespecifická místa na buňce a dále 150 µl PBS. Zhomogenizovali jsme na vortexu a ponechali na 20 minut v ledu.

Následovala centrifugace opět při teplotě 4 °C na 5 min při 1000 rpm. Odsáli jsme supernatant, a to velmi opatrně, abychom zachovali na dně mikrozkušavky malou peletku. K peletce jsme dále přidali 40 µl PBS a 20 µl primární protilátky ENG (P4A4, mouse anti human). Tato směs byla ponechána 1 hodinu v ledě a každých 20 min jsme ji vortexovali, kvůli usazování buněk na dně zkumavky.

Po hodině jsme protilátku naředili přidáním 1 ml PBS a poté následovala centrifugace při 4 °C, 5 min a 1000 rpm a odsátí supernatantu.

Ke každému vzorku obsahující endoglin jsme přidali 100 µl fluorescenčně značené sekundární protilátky zvané Alexa Fluor 488 (goat anti mouse) (Invitrogen, Kalifornie, USA) zředěnou s PBS v poměru 1:600. Ke vzorkům jsme také přidali 5 µl primární monoklonální protilátky VCAM-1 konjugované s Alexa Fluor 700 (Bio-Techne R&D Systems Inc., MN, USA) (viz tab.č.6). Tyto vzorky jsme nechali 30 minut inkubovat v ledě a ve tmě, přičemž po 15 minutách jsme vzorky vortexovali. Poté jsme do každé mikrozkušavky přidali 500 µl PBS, vzorky umístili do centrifugy při 4 °C, 5 min, 1000

rpm a po stočení jsme odsáli supernatant. Nakonec jsme vzorky zředili 300 μ l PBS, zhomogenizovali a přenesli do tuby na měření.

Tabulka 6: Primární protilátky ve vzorcích

Vzorek	NG1	NG2	NG3	NG4 – NG12
Protilátka	čisté buňky	ENG	VCAM	ENG+VCAM
Vzorek	HG1	HG2	HG3	HG4-HG12
Protilátka	ENG+VCAM	ENG+VCAM	ENG+VCAM	ENG+VCAM

Samotné měření se provádělo na průtokovém cytometru CytoFlex LX (Beckman Coulter, Kalifornie, USA). Data z přístroje byly vyhodnocené pomocí programu CytExpert Acquisition and Analysis Software (verze 2.4, Beckman Coulter, Kalifornie, USA). Byl vypočten index relativní exprese (buňky pozitivní na protilátku v % * průměrná fluorescence) a ten byl převeden na % kontroly (vzorek/průměr kontroly*100).

Výsledky byly dále zpracované v statistickém programu GraphPad Prism 8 (verze 8.4.0; GraphPad Software Inc., CA, USA).

5. VÝSLEDKY

Všechny výsledky jsou uvedené jako průměr \pm standardní chyba průměru. Hladina statistické významnosti (p) byla stanovena neparametrickým t-testem (Mann-Whitney). Rozdíly mezi skupinami jsou statisticky významné, když $p \leq 0,05$. Statisticky významná hodnota je označena symbolem „*“ přičemž platí: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.1 PCR

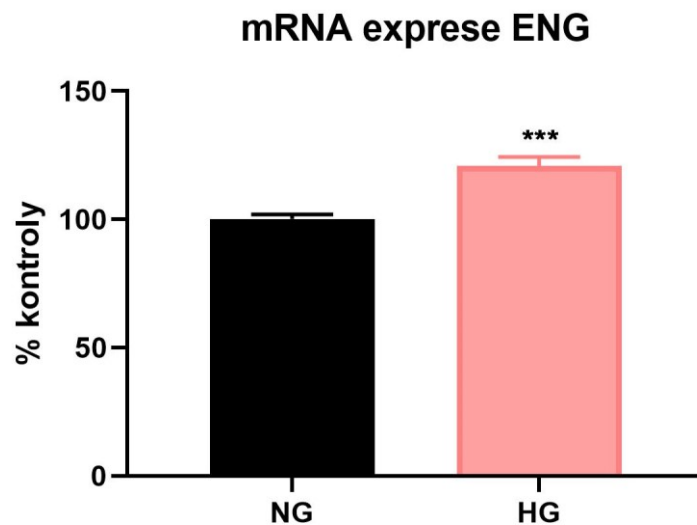
Metodou PCR byla vyhodnocena mRNA exprese ENG a dalších markerů endotelové dysfunkce jako eNOS, VCAM-1; HIF1 α a transkripční faktory endoglinu KLF6, LXR- α , RELA.

Kromě zmíněných molekul jsme na úvod vyhodnocovali i tzv. housekeep gen – HPRT1, na který byly ostatní geny následně normalizované. Tato normalizace byla provedena za účelem zpřesnění výsledků.

5.1.1 mRNA exprese ENG

PCR metoda prokázala signifikantní rozdíl v expresi ENG mezi kontrolní a experimentální skupinou (***) $p \leq 0,001$). Hodnoty byly signifikantně vyšší u HG skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly a zobrazeny v grafu č.1.

Graf 1: Exprese ENG

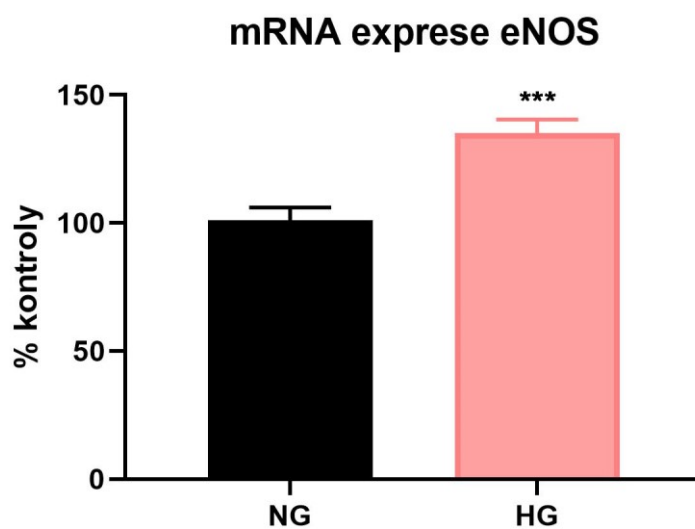


Levý sloupec grafu zobrazuje míru exprese ENG u kontrolní skupiny (NG) představující normální hladinu GLU. Pravý sloupec grafu zobrazuje expresi ENG u experimentální skupiny (HG) vystavené hladinám oscilující GLU. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

5.1.2 mRNA exprese eNOS

PCR metoda prokázala signifikantní rozdíl v expresi eNOS mezi kontrolní (NG) a experimentální (HG) skupinou (***) $p \leq 0,001$). Hodnoty byly signifikantně vyšší u HG skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly a zobrazeny v grafu č. 2.

Graf 2: Exprese eNOS

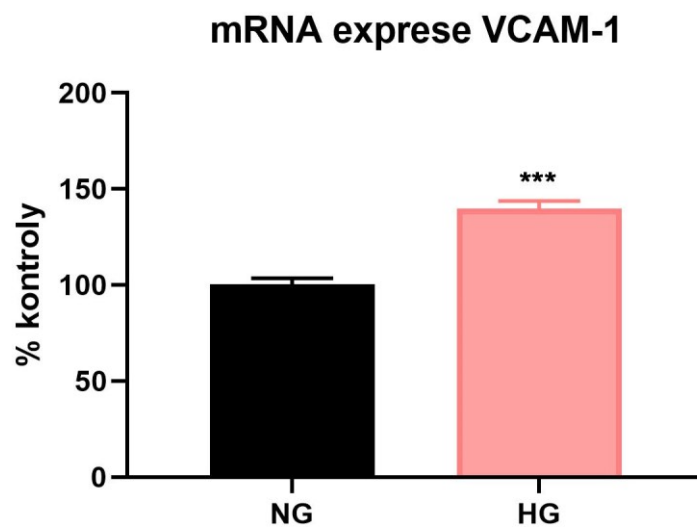


Levý sloupec grafu zobrazuje míru exprese eNOS u kontrolní skupiny (NG). Pravý sloupec grafu zobrazuje expresi eNOS u experimentální skupiny (HG), jenž byla vystavena oscilujícím hladinám GLU. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

5.1.3 mRNA exprese VCAM-1

PCR metoda prokázala signifikantní rozdíl v expresi VCAM-1 mezi kontrolní (NG) a experimentální (HG) skupinou (***) $p \leq 0,001$). Hodnoty byly signifikantně vyšší u HG skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou převedeny na % kontroly a zobrazuje je graf č.3.

Graf 3: Exprese VCAM-1

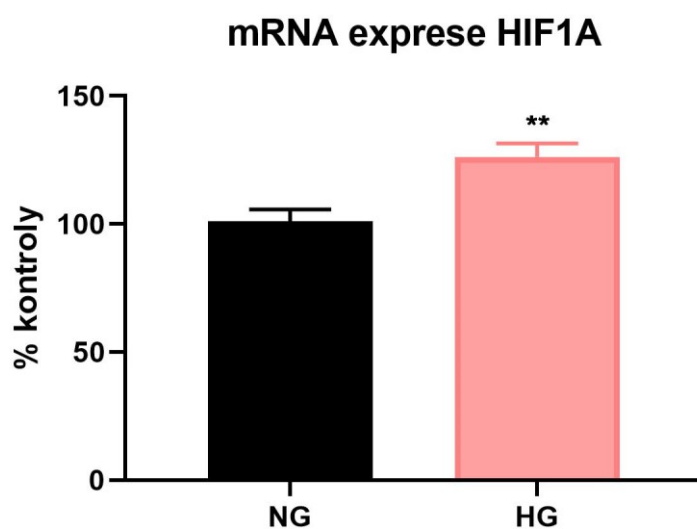


Levý sloupec grafu zobrazuje expresi VCAM-1 u kontrolní (NG) skupiny. Pravý sloupec grafu ukazuje na expresi u experimentální (HG) skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

5.1.4 mRNA exprese HIF1 α

PCR metoda prokázala signifikantní rozdíl v expresi HIF1 α mezi kontrolní (NG) a experimentální (HG) skupinou (** $p \leq 0,01$). Hodnoty byly signifikantně vyšší u HG skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č.4 a vyjádřeny v % kontroly.

Graf 4: Exprese HIF1 α

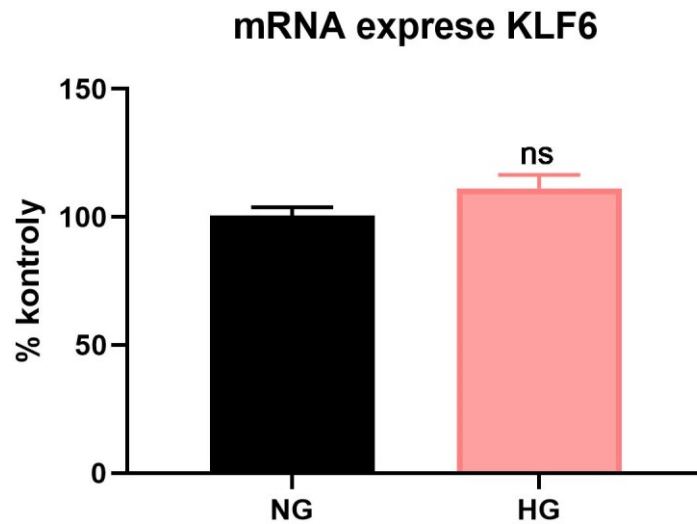


Levý sloupec grafu představuje míru exprese HIF1 α u kontrolní skupiny (NG). Pravý sloupec grafu ukazuje na expresi HIF1 α u experimentální skupiny (HG). Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

5.1.5 mRNA exprese KLF6

PCR metodou nebyl prokázán signifikantní rozdíl v expresi KLF6 mezi kontrolní (NG) a experimentální (HG) skupinou. Výsledky jsou převedeny na % kontroly a zobrazuje je graf č.5.

Graf 5: Exprese KLF6

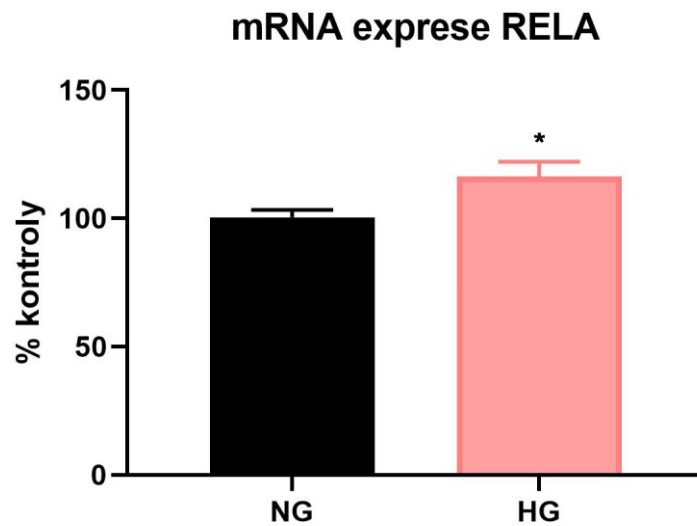


Levý sloupec grafu zobrazuje expresi KLF6 u kontrolní (NG) skupiny. Pravý sloupec grafu představuje expresi u experimentální (HG) skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

5.1.6 mRNA exprese RELA

PCR metoda prokázala signifikantní rozdíl v expresi RELA mezi kontrolní (NG) a experimentální (HG) skupinou (* $p \leq 0,05$). Hodnoty jsou vyšší u HG skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou převedeny na % kontroly a zobrazuje je graf č.6.

Graf 6: Exprese RELA

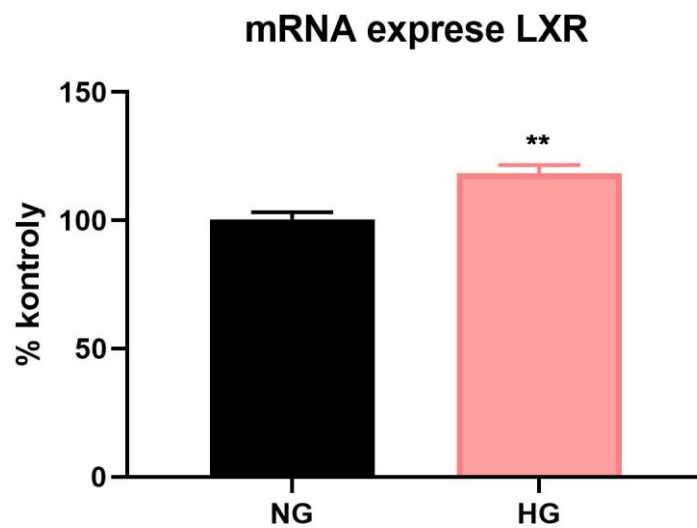


Levý sloupec grafu zobrazuje expresi RELA u kontrolní (NG) skupiny. Pravý sloupec grafu zobrazuje expresi experimentální (HG) skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

5.1.7 mRNA exprese LXR

PCR metoda prokázala signifikantní rozdíl v expresi LXR mezi kontrolní (NG) a experimentální (HG) skupinou (** $p \leq 0,01$). Hodnoty jsou signifikantně vyšší u HR skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou převedeny na % kontroly a zobrazuje je graf č.7.

Graf 7: Exprese LXR



Levý sloupec grafu zobrazuje expresi LXR u kontrolní (NG) skupiny. Pravý sloupec grafu ukazuje na expresi experimentální (HG) skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly

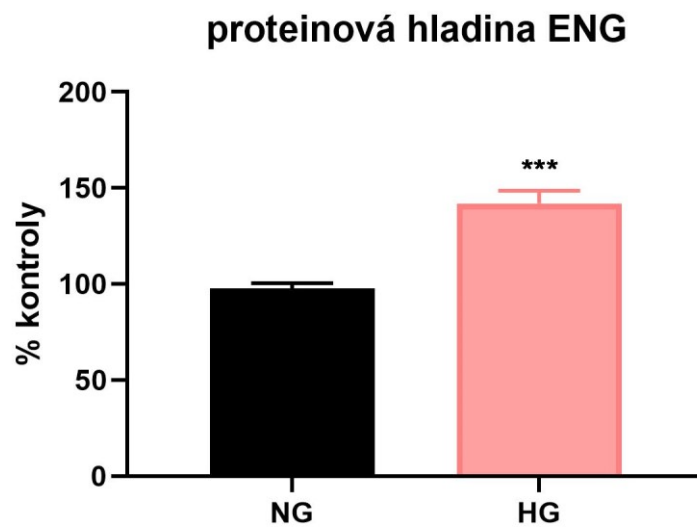
5.2 Průtoková cytometrie

Metodou průtokové cytometrie byla vyhodnocena proteinová hladina ENG a VCAM-1. Hladiny byly porovnány mezi experimentální (HG) skupinou, vystavenou oscilujícím hladinám GLU a kontrolní (NG) skupinou, představující konstantní hladinu GLU. Výsledky jsou zobrazeny v grafech a vyjádřeny v % kontroly. U obou markerů byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl.

5.2.1 Proteinová hladina ENG

Výsledky ukázaly signifikantní nárůst v proteinové hladině ENG u experimentální (HG) skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou (NG) a ($***p \leq 0,001$). Výsledky jsou převedeny na % kontroly a zobrazuje je graf č.8.

Graf 8: Proteinová hladina ENG

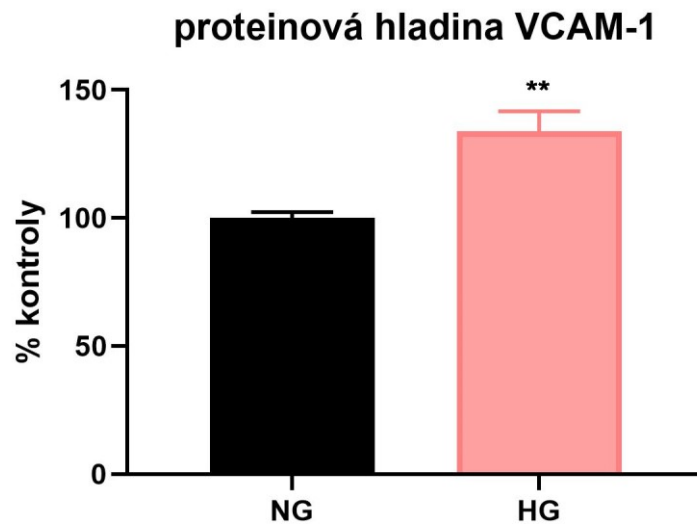


Levý sloupec grafu zobrazuje hladinu proteinu ENG u kontrolní (NG) skupiny. Pravý sloupec grafu ukazuje na hladinu proteinu u experimentální (HG) skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

5.2.2 Proteinová hladina VCAM-1

Výsledky ukázaly signifikantní nárůst v proteinové hladině VCAM-1 u experimentální (HG) skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou (** $p \leq 0,01$). Výsledky jsou převedeny na % kontroly a zobrazuje je graf č.9.

Graf 9: Proteinová hladina VCAM-1



Levý sloupec grafu zobrazuje hladinu proteinu VCAM-1 u kontrolní (NG) skupiny. Pravý sloupec grafu ukazuje na hladinu proteinu u experimentální (HG) skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny v % kontroly.

6. DISKUSE

Endoglin (ENG, CD105, TGF- β receptor III) je transmembránový glykoprotein o velikosti 180kDa. Je exprimován endotelovými buňkami, buňkami hladkého svalstva [69], fibroblasty [70], jaterními buňkami [71] a aktivovanými monocyty a makrofágy [72].

Několik studií ukázalo vzájemný vztah mezi ENG, eNOS a správnou funkcí endotelu. Bylo prokázáno, že změny hladin ENG vedou ke změnám funkce krevních cév a případně k rozvoji ED [73].

Toporsian a kolektiv zjistili, že ENG tvoří nezbytnou součást aktivačního komplexu eNOS, což naznačuje jeho klíčovou roli v regulaci lokálního cévního tonu [74]. Jiná *in vitro* studie, publikována Santibanezem a kolektivem ukázala, že ENG zvyšuje proteinovou hladinu SMAD2, stav fosforylace a jeho stabilitu, což vede ke zvýšené expresi eNOS v přítomnosti i nepřítomnosti exogenního TGF- β 1 v endotelových buňkách [75]. V neposlední řadě byla snížená exprese ENG/eNOS prokázána také v endotelových buňkách lidské pupeční žíly (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) po simulaci zánětu působením TNF- α [76].

V dalším experimentu použili Rossi a kolektiv transfektanty (= buňky s cizorodou DNA) myoblastů potkana exprimující lidský ENG a odpovídající simulované transfektanty k prokázání role ENG v adhezi a transmigraci leukocytů skrze buněčnou monovrstvu. Poprvé také prokázali interakci leukocytového integrinu α 5 β 1 a destiček s ENG exprimovaným na endotelových buňkách prostřednictvím RGD motivu, což naznačuje, že ENG lze považovat za adhezní molekulu podněcující rozvoj endotelové dysfunkce. Ukázali také, že snížená exprese ENG vedla ke snížení zánětem navozené migrace leukocytů skrz endotel, a to naznačuje zásadní roli ENG při transmigraci leukocytů, která je charakteristickým znakem ED [77].

Mimoto bylo prokázáno, že 7-ketocholesterol (simulující efekt oxidovaného LDL, oxLDL) indukuje expresi ENG u buněk HAEC prostřednictvím současné aktivace

transkripčních faktorů souvisejících s expresí ENG včetně KLF6 [78], [79], RELA-HIF1 [80] a LXR [81].

Významně zvýšené hladiny membránové formy ENG po působení 7-ketocholesterolu byly spojeny s významně zvýšenými hladinami prozánětlivých molekul buněčné adheze- E/P-Selektiny, VCAM-1 a ICAM-1. Následná zvýšená adheze a transmigrace monocytů vlivem 7-ketocholesterolu potvrdily rozvoj ED po působení 7-ketocholesterolu. Při použití tzv. silencingu, kde se snížila exprese ENG bylo rozvoji adheze a transmigrace zabráněno, což naznačuje zásadní roli ENG v ED u akutního (12hodinového) hypercholesterolemického stavu *in vitro* [8].

Tato data ukazují, že ENG by mohl být v endotelu protektivní *in vivo* a podněcovat ED *in vitro*.

Proto jsme se v této diplomové práci zaměřili na zhodnocení exprese a regulace ENG při hyperglykemických podmínkách simulujících diabetes mellitus. DM2 je součástí metabolického syndromu stejně jako hypercholesterolemie, a proto jsme chtěli posoudit, zda hyperglykémie ovlivňuje expresi a regulaci ENG podobně jako 7-ketocholesterol simuloval hypercholesterolemii [8]. Prokázali jsme, že vystavení endotelových buněk (HAEC) oscilujícím vysokým koncentracím GLU zvýšilo expresi a proteinovou hladinu ENG podobě jako u působení 7-ketocholesterolu. Kromě toho byla zvýšená také exprese molekuly VCAM-1, která je klíčovým markerem ED [82], což naznačuje, že vystavení GLU simuluje vznik ED.

Řada studií prokázala, že exprese ENG je regulována různými transkripčními faktory včetně KLF6 [78], [79], RELA-HIF1 [80] a LXR [81]. Zjistili jsme, že hyperglykémie zvyšuje expresi RELA a LXR což naznačuje, že tyto faktory by mohly být zodpovědné za zvýšenou hladinu ENG po vystavení vysoké GLU.

Souhrnně výsledky této diplomové práce ukázaly, že vysoké hladiny GLU zvyšují expresi a regulaci exprese ENG podobně jako u simulace hypercholesterolemie, a to naznačuje možnou účast ENG na vzniku ED při hyperglykémii. Funkční důsledky a dopady ENG na ED budou vyhodnoceny v nadcházejících experimentech, které nejsou součástí této diplomové práce.

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit vliv glukózy na expresi ENG a dalších biomarkerů (eNOS, VCAM-1, HIF1 α), které se podílí na vzniku endotelové dysfunkce. Pro experiment byly použité lidské endotelové buňky aorty (HAEC), které byly před vlastním měřením premedikovány médiem s oscilující glukózou. Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou buněk, premedikovanou konstantní hladinou normální glukózy.

Metoda PCR prokázala signifikantní rozdíl v mRNA expresi ENG, eNOS, VCAM-1, HIF1 α , RELA a LXR, která byla větší u experimentální skupiny v porovnání se skupinou kontrolní.

Průtokovou cytometrií byl prokázán signifikantní rozdíl v proteinové hladině u ENG i VCAM-1. Experimentální skupina vykazovala vyšší hodnoty než skupina kontrolní.

Výsledky diplomové práce potvrdily navození endotelové dysfunkce u endotelových buněk po expozici vysokým hladinám glukózy. Zároveň se zvýšila exprese ENG a vybraných transkripčních faktorů, které jeho expresi regulují, což naznačuje potenciální podíl endoglinu na rozvoji endotelové dysfunkce za hyperglykemických podmínek simulujících diabetes mellitus. Funkční důsledek zvýšené exprese endoglinu, je však předmětem dalších studií.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
AGEs	advanced glycation end products	konečné produkty pokročilé glykace
ALK	activin-like kinase	kináza podobná aktivinu
AMK	aminokyselina	aminokyselina
Ap-1	activator-protein 1	aktivátorový protein 1
AS	atherosclerosis	ateroskleróza
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BMP9	bone morphogenetic protein 9	kostní morfogenetický protein 9
cAMP	cyclic 3'5'-adenosine monophosphate	cyklický 3'5'-adenosin monofosfát
CAMs	cellular adhesion molecules	buněčné adhezní molekuly
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
cGMP	guanosine 3'5'-monophosphate	guanosin 3'5'-monofosfátu
CRP	c-reactive protein	c-reaktivní protein
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus type 1	diabetes mellitus typu 1
DM2	diabetes mellitus type 2	diabetes mellitus typu 2
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates	deoxynukleotidtrifosfáty
dsDNA	double stranded DNA	dvouvláknová DNA
ED	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkce
EGF-like	epidermal growth factor-like	podobné epidermálnímu růstovému faktoru
EGM-2	endothelial cell growth medium	medium pro růst endotelových buněk
ENG	endoglin	endoglin
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ESL-1	e-selectin ligand 1	e-selektin ligand 1
ET-1	endothelin-1	endotelin-1

ET-A/B	endothelin receptor A/B	endotelin receptor A/B
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavin adenin dinukleotid
FFA	free fatty acids	volné mastné kyseliny
FMN	flavin mononucleotide	flavin mononukleotid
FRET	fluorescence resonance energy transfer	transfer fluorescenční rezonanční energie
FSC	forward scatter	přední rozptyl
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GC	guanylate cyclase	guanylátcykláza
GDF2	growth differentiation factor 2	růstový diferenciační faktor 2
GLU	glucose	glukóza
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HAEC	human aortic endothelial cells	lidské endotelové buňky aorty
HG	high glucose	vysoká glukóza
HIF-1α	hypoxia-induced factor 1alpha	hypoxií indukovatelný faktor 1alfa
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	hypoxanthin fosforibosyltransferáza 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	mezibuněčná adhezní molekula 1
IFN-γ	interferon γ	interferon γ
IL-1	interleukin-1	interleukin-1
INZ	inzulin	inzulin
IRS1	intracellular substrate for INZ	intracelulární substrát pro INZ
KLF6	Krüpple-like factor 6	Krüpple-like faktor 6
KVS	kardiovaskulární	kardiovaskulární
LDL	low density protein	nízkodenzitní protein
L-ENG	long-endoglin	dlouhý endoglin
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1	antigen spojený s funkcí lymfocytů 1

LXR	liver X nuclear receptor	játerní X jaderný receptor
Mac1	macrophage-1 antigen	antigen makrofágu 1
MAN	mannitol	mannitol
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinová kináza
MMP-14, MT1-MMP	matrix metalloproteinase-14	matrixová metaloproteináza-14
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NF-κB	nuclear factor kappa B	nukleární faktor kappa B
NG	normal glucose	normální glukóza
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
oGTT	oral glucose - tolerance test	orální glukózo-toleranční test
oxLDL	oxidized low density lipoprotein	oxidované lipoproteiny o nízké hustotě
PBS	phosphate buffer	fosfátový tlumivý roztok
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PGH₂	prostaglandin H ₂	prostaglandin H ₂
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza
PMT	photomultiplier tubes	fotonásobiče
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1	P-selektin glykoproteinový ligand 1
RAGE	receptors for advanced glycation products	receptory pro produkty pokročilé glykace
RELA	nuclear factor kappa-B subunit phosphorylated on carbon 65	podjednotka nukleárního faktoru kapa-B fosforylovaná na uhlíku 65
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
rRNA	ribosomal RNA	ribozomální RNA
sENG	soluble endoglin	solubilní endoglin
S-ENG	short-endoglin	krátký endoglin
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule 1	solubilní mezibuněčná adhezní molekula 1

Sp1	stimulating protein 1	stimulační protein 1
SP-1	specific protein 1	specifický protein 1
SSC	side scatter	postranní rozptyl
TGF-β	transforming growth factor beta	transformující růstový faktor beta
TNF-α	tumor necrosis factor-alfa	tumor nekrotizující faktor-alfa
tPA	tissue plasminogen activator	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA2	thromboxane A2	tromboxan A2
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	cévní adhezní molekula 1
VE-cadherin	vascular endothelial-cadherin	vaskulární endotelový kadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2	receptor typu 2 vaskulárního endotelového růstového faktoru
WHO	world health organization	světová zdravotnická organizace
ZP	zona pellucida	zóna pellucida

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Diagnostická kritéria pro DM	32
Tabulka 2: Použité médium s GLU podle dnů	55
Tabulka 3: Ředění RNA.....	59
Tabulka 4: Mix na přepis.....	59
Tabulka 5: 96jamková destička	60
Tabulka 6: Primární protilátky ve vzorcích	62

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Endotel.....	10
Obrázek 2: Působení oxidativního stresu	15
Obrázek 3: TGF- β signalizace	19
Obrázek 4: Struktura ENG	21
Obrázek 5: sENG	22
Obrázek 6: Adheze leukocytů a jejich přestup přes endotel	25
Obrázek 7: Struktura VCAM-1 a jeho varianty.....	27
Obrázek 8: Struktura ICAM-1.....	29
Obrázek 9: Struktura P/E-selektinu	31
Obrázek 10: Vznik DM1.....	34
Obrázek 11: Patofyziologie hyperglykémie a FFA.....	38
Obrázek 12: Proces PCR	40
Obrázek 13: TaqMan fluorescence	42
Obrázek 14: Graf amplifikace.....	43
Obrázek 15: Systém průtokové cytometrie	45
Obrázek 16: Průtoková komora	46
Obrázek 17: Histogram	47
Obrázek 18: Bodový graf.....	47
Obrázek 19: FSC, SSC rozptyl	48
Obrázek 20: Přímá a nepřímá průtoková cytometrie	49
Obrázek 21: HAEC	52
Obrázek 22: Pasážování buněk	54
Obrázek 23: RNA extrakce	58

11. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Expresce ENG.....	64
Graf 2: Expresce eNOS.....	65
Graf 3: Expresce VCAM-1	66
Graf 4: Expresce HIF1 α	67
Graf 5: Expresce KLF6	68
Graf 6: Expresce RELA.....	69
Graf 7: Expresce LXR.....	70
Graf 8: Proteinová hladina ENG.....	71
Graf 9: Proteinová hladina VCAM-1.....	72

12. POUŽITÁ LITERATURA

1. Kaur, R., M. Kaur, and J. Singh, *Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies*. Cardiovasc Diabetol, 2018. **17**(1): p. 121.
2. Karásek, D., et al., *Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi*. Internal Medicine for Practice, 2004. **6**(9): p. 450-453.
3. Karetová, D., *Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob*. Internal Medicine for Practice, 2002. **4**(3): p. 119-122.
4. Ghosh, A., et al., *Role of free fatty acids in endothelial dysfunction*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 50.
5. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. Int J Biol Sci, 2013. **9**(10): p. 1057-1069.
6. Park, K.H. and W.J. Park, *Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches*. J Korean Med Sci, 2015. **30**(9): p. 1213-1225.
7. Golias, C., et al., *Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease*. In Vivo, 2007. **21**(5): p. 757-769.
8. Vicen, M., et al., *Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro*. Faseb j, 2019. **33**(5): p. 6099-6114.
9. Nachtigal, P., et al., *The role of endoglin in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2012. **224**(1): p. 4-11.
10. Rossi, E., C. Bernabeu, and D.M. Smadja, *Endoglin as an Adhesion Molecule in Mature and Progenitor Endothelial Cells: A Function Beyond TGF-beta*. Front Med (Lausanne), 2019. **6**: p. 10.
11. Feletou, M., *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*, in *The Endothelium [online]: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. 2011,

Morgan & Claypool Life Sciences Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57148/#s2.2>

12. Claesson-Welsh, L., *Vascular permeability--the essentials*. Ups J Med Sci, 2015. **120**(3): p. 135-143.
13. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
14. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-198.
15. Campbell, L.A. and M.E. Rosenfeld, *Infection and Atherosclerosis Development*. Arch Med Res, 2015. **46**(5): p. 339-350.
16. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 168-175.
17. Vlček, J., Fialová, D., a kol., *Klinická farmacie I*. 2010, Praha: Grada Publishing, a.s. 368.
18. Lawson, C. and S. Wolf, *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
19. Sun, H.J., et al., *Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs*. Life Sci, 2016. **167**: p. 6-11.
20. Konukoglu, D. and H. Uzun, *Endothelial Dysfunction and Hypertension*. Adv Exp Med Biol, 2017. **956**: p. 511-540.
21. Rathouska, J., et al., *Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis*. Pharmacol Res, 2011. **64**(1): p. 53-59.
22. Jezkova, K., et al., *High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas from Mice Fed a High-Fat Diet*. J Vasc Res, 2016. **53**(3-4): p. 149-162.
23. Schoonderwoerd, M.J.A., M.T.H. Goumans, and L. Hawinkels, *Endoglin: Beyond the Endothelium*. Biomolecules, 2020. **10**(2).
24. Miller, D.W., et al., *Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells*. Int J Cancer, 1999. **81**(4): p. 568-572.

25. Lopez-Novoa, J.M. and C. Bernabeu, *The physiological role of endoglin in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(4): p. H959-974.
26. Vitverova, B., et al., *Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta*. Atherosclerosis, 2018. **271**: p. 15-25.
27. Nemeckova, I., et al., *High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119665.
28. Schmidt, E.P., et al., *Adhesion Molecules: Master Controllers of the Circulatory System*. Compr Physiol, 2016. **6**(2): p. 945-973.
29. Hua, S., *Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 127.
30. Koh, Y. and J. Park, *Cell adhesion molecules and exercise*. J Inflamm Res, 2018. **11**: p. 297-306.
31. Cook-Mills, J.M., M.E. Marchese, and H. Abdala-Valencia, *Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1607-1638.
32. Schlesinger, M. and G. Bendas, *Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis*. Int J Cancer, 2015. **136**(11): p. 2504-2514.
33. Kong, D.H., et al., *Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
34. Quagliaro, L., et al., *Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production*. Atherosclerosis, 2005. **183**(2): p. 259-267.
35. Lyck, R. and G. Enzmann, *The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues*. Curr Opin Hematol, 2015. **22**(1): p. 53-59.
36. McEver, R.P., *Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall*. Cardiovasc Res, 2015. **107**(3): p. 331-339.

37. Pankow, J.S., et al., *Circulating cellular adhesion molecules and risk of diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*. *Diabet Med*, 2016. **33**(7): p. 985-991.
38. Al-Rubeaan, K., et al., *IL-18, VCAM-1 and P-selectin as early biomarkers in normoalbuminuric Type 2 diabetes patients*. *Biomark Med*, 2019. **13**(6): p. 467-478.
39. Silbernagl, S., Lang, F., *Atlas patofyziologie*. 2012, Praha: Grada Publishing a.s. 416.
40. Petersmann, A., et al., *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2018. **126**(7): p. 406-410.
41. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2013. **36 Suppl 1**: p. S67-74.
42. Shi, Y. and P.M. Vanhoutte, *Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes*. *J Diabetes*, 2017. **9**(5): p. 434-449.
43. Henning, R.J., *Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease*. *Future Cardiol*, 2018. **14**(6): p. 491-509.
44. Zaccardi, F., et al., *Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective*. *Postgrad Med J*, 2016. **92**(1084): p. 63-69.
45. Rybka, J., *Diabetes mellitus- komplikace a přidružená onemocnění, in Diagnostické a léčebné postupy*. 2007, Grada Publishing, a.s.: Praha. p. 320.
46. Patel, T.P., et al., *Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes*. *Heart Fail Rev*, 2016. **21**(1): p. 11-23.
47. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. *Lancet*, 2005. **365**(9467): p. 1333-1346.
48. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Pathogenesis of type 2 diabetes*. *Endocr Res*, 2007. **32**(1-2): p. 19-37.
49. Reusch, J.E. and C.C. Wang, *Cardiovascular disease in diabetes: where does glucose fit in?* *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(8): p. 2367-2376.
50. Rajagopal, A., et al., *Significant Expansion of Real-Time PCR Multiplexing with Traditional Chemistries using Amplitude Modulation*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 1053.

51. Jones, N.L., *PCR. Principles, procedures, and parameters*. Methods Mol Biol, 2002. **187**: p. 37-46.
52. Kolmodin, L.A. and D.E. Birch, *Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice*. Methods Mol Biol, 2002. **192**: p. 3-18.
53. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
54. Wilhelm, J. and A. Pingoud, *Real-time polymerase chain reaction*. Chembiochem, 2003. **4**(11): p. 1120-1128.
55. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. **5**(2): p. 209-219.
56. Miller, J.R. and R. Andre, *Quantitative polymerase chain reaction*. Br J Hosp Med (Lond), 2014. **75**(12): p. C188-192.
57. Navarro, E., et al., *Real-time PCR detection chemistry*. Clin Chim Acta, 2015. **439**: p. 231-250.
58. Green, M.R. and J. Sambrook, *Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data*. Cold Spring Harb Protoc, 2018. **2018**(10).
59. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
60. Maecker, H.T. and J. Trotter, *Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity*. Cytometry A, 2006. **69**(9): p. 1037-1042.
61. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **106**: p. 19-39.
62. Givan, A.L., *Flow cytometry: an introduction*. Methods Mol Biol, 2011. **699**: p. 1-29.
63. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(2): p. 163-176.
64. Traganos, F., *Flow cytometry: principles and applications. II*. Cancer Invest, 1984. **2**(3): p. 239-258.
65. Donnini, D., et al., *A new model of human aortic endothelial cells in vitro*. Biochimie, 2000. **82**(12): p. 1107-1114.

66. ČEDÍKOVÁ, M., KRAKOROVÁ, K., MIKLÍKOVÁ, M., HRONOVÁ, M., BALANDOVÁ, A., PITULE, P., KRÁLÍČKOVÁ, M., *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů*. 2012, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze: Ústav histologie a embryologie. p. 37.
67. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
68. Rao, X., et al., *An improvement of the 2^(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. *Biostat Bioinforma Biomath*, 2013. **3**(3): p. 71-85.
69. Bot PT, Hoefler IE, Sluijter JP, van Vliet P, Smits AM, Lebrin F, Moll F, de Vries JP, Doevendans P, Piek JJ, Pasterkamp G, Goumans MJ (2009) Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke* 40: 439-447
70. St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M (1994) Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134: 2645-2657.
71. Meurer S, Wimmer AE, Leur EV, Weiskirchen R (2019) Endoglin Trafficking/Exosomal Targeting in Liver Cells Depends on N-Glycosylation. *Cells* 8.
72. Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabeu C (1992) Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22: 393-397.
73. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 18: 609-611.

74. Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M, Letarte M (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96: 684-692.
75. Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L, Bernabeu C (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210: 456-468.
76. Zemankova L, Varejckova M, Dolezalova E, Fikrova P, Jezkova K, Rathouska J, Cervený L, Botella LM, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P (2015) Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin. *J Physiol Pharmacol* 66: 403-413.
77. Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabanas C, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2013) Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 121: 403-415.
78. Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratziu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S, Bernabeu C (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100: 4001-4010.
79. Gallardo-Vara E, Blanco FJ, Roque M, Friedman SL, Suzuki T, Botella LM, Bernabeu C (2016) Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis* 19: 155-171.
80. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277: 43799-43808.

81. Valbuena-Diez AC, Blanco, F.J., Oujo, B. et al. (2012) Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. pp. 2612-2624.
82. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R (1998) Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 842-851.