

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LEKÁRSKÝCH VIED

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Efekt solubilného endoglínu na endotelové bunky *in vitro*

Vedúci diplomovej práce:
Hradec Králové 2017

PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D.
Rebeka Klingová

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ostatné zdroje, z ktorých som čerpala pri spracovaní, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú poriadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Podpis:

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa rada pod'akovala PharmDr. Petre Fikrovej, Ph.D. za jej trpezlivé a ochotné vedenie pri písaní tejto práce. Taktiež za neoceniteľné odborné a praktické rady, ktoré mi poskytla. Vďaka patrí aj Mgr. Michale Vařejčkovej za jej pomoc pri vykonávaní experimentálnej časti.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Prahe
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Rebeka Klingová

Školitel: PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D.

Název diplomové práce: Efekt solubilního endoglinu na endotelové bunky *in vitro*

Cíle práce:

V diplomové práci jsme zisťovali účinky solubilního endoglinu na endotelové bunky pomocou zápalových markerov. Cieľom bolo poukázať na možnú spojitosť solubilného endoglinu s dysfunkciou endotelu.

Metódy:

Na štúdium dysfunkcie endotelu sme si vybrali ľudské endotelové bunky získané z pupočníkovej žily – HUVEC. Bunky boli ovplyvnené solubilným endoglinom v dvoch koncentráciách a v dvoch rôznych časových intervaloch. Výsledky sme hodnotili v štatistickom programe, porovnaním kontrolnej skupiny s ovplyvnenými bunkami a dvoma koncentraciami navzájom. Analýzu expresie zápalových markerov sme vykonávali na úrovni mRNA pomocou metódy real-time PCR.

Výsledky:

Signifikantné zmeny v expresii markerov nastali pri cievnej a intracelulárnej adhéznej molekule pri oboch koncentráciách v porovnaní s kontrolou. Zvýšené hodnoty transkripcie boli aj v prípade cyklooxygenázy 2 v porovnaní s kontrolou a znížené hodnoty boli v prípade cadherínu 5.

Záver:

Zmeny v expresii markerov dysfunkcie endotelu nás vedú k možnému vplyvu solubilného endoglinu na endotelové bunky, a teda k predpokladu, že ovplyvňuje funkciu endotelu. Je nutné previesť ďalšie metodické prístupy na túto problematiku.

ABSTRACT

Charles Univerzity in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Rebeka Klingová

Supervisor: PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of soluble endoglin to endothelial cells *in vitro*

Aim:

We determined the effects of soluble endoglin on endothelial cells, by the means of inflammatory markers. The aim of the study was to point out the possible association of the soluble endoglin with endothelial dysfunction.

Methods:

For our study we have selected the human endothelial cells from umbilical vein - HUVEC. We have influenced the cells with soluble endoglin in two concentrations and at two different time intervals. The results were evaluated in the statistical program, in which we have compared the control group with influenced cells and two concentrations between each other. The expressions of inflammatory markers were analyzed on the level of mRNA, using the real-time PCR method.

Results:

Significant changes in the expression of markers were observed on the vascular and intracellular adhesion molecule at both concentrations compared to the control group. Increased values of transcription were available also for cyclooxygenase 2 and decreased values for cadherin 5 compared to the control group.

Conclusion:

Changes in expression of endothelial dysfunction markers are leading us to the possible influence of soluble endoglin on endothelial cells, and thus to the assumption, that it affects the function of the endothelium. Further methodical approaches are necessary to be carried out on this issue.

Obsah

1. Teoretická časť	9
1.1 Úvod	9
1.2 Cievny.....	10
1.3 Endotel.....	10
1.3.1 Funkcia endotelu.....	11
1.3.1.1 Cievna permeabilita	12
1.3.2 Dysfunkcia endotelu	13
1.4 Signalizačná dráha transformačného rastového hormónu β (TGF β)	15
1.5 Membránový endoglin.....	17
1.5.1 Expresia endoglinu	17
1.5.2 Štruktúra endoglinu.....	17
1.5.3 TGF β signalizačná dráha a interakcia s membránovým endoglinom.....	18
1.6 Solubilný endoglin.....	19
1.6.1 Štruktúra solubilného endoglinu	19
1.6.2 TGF β signalizačná dráha a interakcia so solubilným endoglinom	19
1.6.3 Účinok solubilného endoglinu	20
1.6.4 Solubilný endoglin a dysfunkcia endotelu.....	21
1.6.5 Markery funkcie endotelu.....	21
1.6.5.1 Cievna (VCAM-1) a intracelulárna (ICAM-1) adhézna molekula.....	21
1.6.5.2 Cievny endotelový rastový faktor - VEGF	22
1.6.5.3 Prostaglandín – endoperoxid syntáza 2 - PTGS2	22
1.6.5.4 Cadherín 5 - CDH5	23
1.6.5.5 NO syntáza 3 - NOS3	23
1.6.5.6 Ďalšie endotelové markery	23
1.6.6 MMP-14.....	24

1.7	Bunkové modely pre štúdium endotelových funkcií.....	25
1.8	PCR- polymerase chain reaction	27
1.8.1	Zloženie reakčnej zmesi.....	27
1.8.2	Princíp.....	28
1.8.3	Využitie.....	28
1.8.4	Modifikácie základnej verzie PCR	29
1.8.5	RT-PCR	29
1.8.6	Kvantitatívna PCR.....	30
1.8.6.1	Princíp.....	30
1.8.6.2	Porovnanie qPCR a klasickej PCR.....	30
1.8.6.3	Prístroje pre qPCR	31
1.8.6.4	Sondy v qPCR.....	31
1.8.6.5	Priebeh krivky.....	34
1.8.6.6	Kvantifikácia qPCR	35
2	Zadanie diplomovej práce, cieľ práce	37
3	Experimentálna časť.....	38
3.4	Chemikálie.....	38
3.5	HUVEC	38
3.6	Design pokusu	38
3.7	qPCR.....	38
3.8	Štatistická analýza	41
3.9.	Výsledky.....	42
3.9.1	qPCR.....	42
4.	Diskusia	46
5.	Záver	49
6.	Zoznam použitých skratiek	50

7. Použitá literatúra.....	52
8. Zoznam obrázkov	60
9. Zoznam tabuliek.....	60

1. Teoretická časť

1.1 Úvod

Endotelová dysfunkcia je charakterizovaná poruchou funkcie dilatácie ciev a protrombogénnym štádiom dochádza pri nej k zvyšovaniu zápalových a adhézných molekúl. Je jedným z včasných štádií aterosklerózy (Higashi, *et al.* 2009).

Dysfunkcia endotelu je dobrým prediktorom srdcovocievnej diagnostiky, nezávisle od ostatných faktorov aj keď do klinickej praxi nebola s veľkým dôrazom zavedená. Funkčné poruchy ciev sú považované za dôležité v progresii, iniciácii a tvorbe komplikácii pri ischemickej chorobe srdca a ateroskleróze. Stupeň dysfunkcie endotelu koreluje so zvýšeným rizikom úmrtnosti srdcovocievneho aparátu (Dobias, *et al.*, 2016).

Podľa terajších predstáv je ateroskleróza chronický proces charakterizovaný modifikovanými makrofágmi, lipoproteínami a inými krvnými komponentami a je odpoveďou na rôzne impulzy pôsobiace na stenu ciev (Hulin, *et al.* 2005). Ateroskleróza a jej dôsledky sú v západných krajinách vedúcimi príčinami chorobnosti a úmrtnosti. V členských štátoch Európskej únie v roku 2014 došlo v priemere k 37% úmrtí následkom ochorenia srdcovocievneho aparátu. V Slovenskej a Českej republike sa toto číslo pohybuje medzi 45%, čo môže byť spôsobené aj stravou bohatou na tuky alebo nižšou pohybovou aktivitou tunajších ľudí (Eurostat, 2017).

Dôležitú úlohu v homeostáze ciev zohráva transformačný rastový faktor β . Endoglin ako koreceptor tejto signalizačnej dráhy spĺňa taktiež významnú úlohu. Pôsobenie solubilného endoglinu je v prípade cievnych ochorení otázne už viac ako 30 rokov po objave tohto glykoproteínu. Endoglin (CD105) je exprimovaný hlavne na endotele ciev. Je nevyhnutný pre kardiovaskulárny vývoj a mutácia génu spôsobuje hereditárnu hemoragickú telangiectáziu. Je exprimovaný aj počas gravidity v syncytiotrofoblaste a hladina solubilnej formy je zvýšená pri preeklampsii (Berg, *et al.* 1997, Gregory, *et al.* 2014, Venkatesha, *et al.* 2006).

1.2 Cievny

Súčasťou kardiovaskulárneho a lymfatického systému sú cievy, ich zloženie pozostáva z nasledujúcich vrstiev:

1. *Tunica intima* - samotná vrstva endotelových buniek. Pod ňou sa nachádza vrstva subendotelu, môže obsahovať vrstvu hladkého svalstva. Usporiadanie buniek je pozdĺžne.
2. *Tunica media* - skladá sa hlavne z hladkej svaloviny, medzi bunkami hladkej svaloviny sa nachádzajú aj elastické a kolagénne vlákna.
3. *Tunica adventicia* - je tvorená kolagénnymi a elastickými vláknami, ktoré sú orientované pozdĺžne. V bunkách adventície a medii sú odlišné typy kolagénu (Mescher, 2013).

1.3 Endotel

Endotel tvorí vnútornú vrstvu všetkých krvných ciev (artérie, žily, kapiláry) a ciev lymfatického systému, je tvorený jednou vrstvou endotelových buniek. Je v priamom kontakte s krvou a cirkulujúcimi bunkami. Termín endotel bol prvý krát spomenutý Wilhelmom Hisom, švajčiarskym odborníkom v anatómii v roku 1865 (Feletou, 2011).

Endotel tvorí semipermeabilnú vrstvu medzi dvoma prostrediami - krvnou plazmou a intersticiálnou tekutinou. Endotelové bunky sú zakotvené do bazálnej membrány, ktorá má šírku 80nm. Bazálna membrána je dôležitou súčasťou ciev, tvorí kostru každej artérie, žily či kapiláry. Tvar endotelových buniek sa mení, ale väčšou predstavuje tenké polygonálne predĺžené bunky o dĺžke 50-70 μm , šírke 10-30 μm a hrúbke 0,1-10 μm . Obsahujú vakuoly a vytvárajú so susednými bunkami rôzne spoje, taktiež obsahujú Weibel-Paladeho telieska, slúžia na skladovanie von Willebrandovho faktoru. Endotel vzniká z mezenchýmu, nezaraďuje sa medzi pravý epitel. V cievach sú endotelové bunky orientované po dĺžke z dôvodu minimalizovania zaťaženia prúdiacou krvou. Hoci endotel predstavuje jednu vrstvu buniek s počtom približne $10\text{-}60 \cdot 10^{12}$ v ľudskom tele obsadzuje povrch o veľkosti 300 - 1000m². Tieto morfológické údaje len poukazujú na dôležitú rolu vo výmene a transporte látok (Feletou, 2011).

Pozorovaním v elektrónovom mikroskope boli zistené rozdiely v medzibunkových spojeniach, ktoré viedli k rozdeleniu endotelu a určitej klasifikácii na kontinuálny, perforovaný a diskontinuálny. Kontinuálny endotel nájdeme vo viacerých žilách, artériách a kapilárach mozgu, kože, pľúc, srdca a svalov.

Perforovaný endotel je charakterizovaný pórmí. Tento typ pozorujeme najčastejšie v tkanivách s endokrinným a exokrinným vylučovaním ai. Diskontinuálny endotel je charakterizovaný veľkými penetráciami, typický pre sínusoidy v pečeni ale aj pre slezinu a kostnú dreň (Feletou, 2011).

Medzibunkové spojenia sú zložené z tesných spojení (*zona occludens*), adherentných spojení a priepustných spojení. Tieto komplexy udržiavajú rozličné bunkové mechanizmy ako sú adhézia, medzibunkový prenos alebo signalizačné dráhy (Beese, *et al.* 2010).

1.3.1 Funkcia endotelu

Endotel ciev predstavuje anti-trombotický povrch, v ktorom na zdravom tkanive nedochádza k zrážaniu krvi. Jednotlivé funkcie zahŕňajú:

1. Aktívne vylučovanie sekrétu kontrolujúce formovanie zrazeniny ako napríklad: heparánsulfát- glykozaminoglykán s podobnými účinkami ako má heparín
2. Za určitých podmienok bunky endotelu uvoľňujú mediátory s proagregačnými a proadhezívnymi vlastnosťami ako sú:
 - von Willebrandov faktor stimulovaný estradiolom alebo fibrinogénom,
 - faktor aktivujúci trombocyty, dokáže aktivovať taktiež aj monocyty a neutrofile
3. Bunky reagujú lokálne na vaskulárny tonus a prietok krvi sekréciou rozličných typov látok stimulujúcich kontrakcie hladkej svaloviny. Napríklad:
 - endotelín I - je to peptid zložený z 21 aminokyselín a je mimoriadne efektívny vazokonstriktor, 50-80% produkuje endotel,
 - angiotenzín konvertujúci enzým - nachádza sa na povrchu endotelu, umožňuje lokálnu aktiváciu renínovo-angiotenzínového systému.
4. Relaxáciu cievnej steny umožňujú tzv. endotelové vazodilatátory. Medzi ne patrí: oxid dusnatý (dominantná úloha vo vazodilácii ciev), prostacyklín(PGI₂), hyperpolarizačný faktor a prostaglandíny (PGE₂).
5. Endotel plní rôzne role pri imunitnej odpovedi ako aj pri zápale. Bunky endotelu podnecujú biele krvinky k predchádzaniu transendoteliálnej migrácii na miesta poškodenia alebo infekcie vo venuľách. V takomto prípade sa vylučuje P-selektín, ktorý je vylučovaný na laminálny povrch k Weibel - Paladeho telieskam, ktoré pohltia bunku do membrány. Endotelové bunky taktiež vylučujú rôzne faktory zvané interleukíny lokálne ovplyvňujúce leukocyty počas zápalu.

6. Endotel vylučuje rozličné rastové faktory zahrňujúc proteíny, ktoré dopomáhajú proliferácii bielym krvinkám alebo udržujú stenu ciev.
7. Bunky endotelu dokážu produkovať proteíny potrebné pre bazálnu membránu. Produkciou enzýmov ako napríklad metaloproteinázy, ktoré degradujú extracelulárnu matrix, plnia dôležitú úlohu pri udržiavaní plasticity ciev (Feletou, 2011, Hulín *et al.*, 2005, Junquiera, 2013).

1.3.1.1 Cievna permeabilita

Pri transcelulárnej ceste je transport makromolekúl endotelom uskutočňovaný receptor - dependentnými (proteín GP60 viažuci albumín) alebo independentnými mechanizmami (transcytóza tekutín). Caveoly sú mikrodomény bohaté na cholesterol a glykosfingolipidy. Pokrývajú cytoplazmatický povrch s proteínom caveolin - 1. Zahňajú štrukturálne komponenty a tvoria 15% povrchu endotelu. Množstvo signalizačných molekúl je združených s caveolinom - 1 ako iontové kanály, G-proteíny, eNOS, kinázy. Reguláciou proteín-proteín interakcií optimalizuje ich funkcie (Feletou, 2011).

Pri paracelulárnej ceste aktínové vlákna v cytoskelete reagujú s medzibunkovými spojeniami (adherentné, tesné). Tvoria určitú bariéru pre makromolekuly. Za okolností ako je akútny alebo chronický zápal, angiogenéza, ischémia atď. môžu mediátory, cytokíny, kyslíkové radikály alebo iné spôsobať zmrštenie endotelových buniek čo narúša permeabilitu a prestup látok. Výsledkom, v najhoršom prípade, je vznik edému poprípade tkanivovej dysfunkcie. Integrita endotelu je daná tvarom endotelových buniek ale aj adhezívnou silou jednotlivých buniek medzi sebou (Feletou, 2011).

Koordinácia a integrácia informácií medzi bunkami a tkanivami (medzibunková komunikácia) je dôležitá pre správne fungovanie orgánu vrátane steny ciev. Bunky dokážu komunikovať medzi sebou rôznymi spôsobmi. Môže sa jednať o uvoľňovanie hormónov a mediátorov, alebo komunikácia môže prebiehať za pomoci kanálov medzibunkových spojení chemickými poslami alebo elektrickým signálom. Spojenia sú priepustné pre ióny a taktiež pre tzv. druhých poslov ako sú cyklický adenosín monofosfát, malé peptidy o veľkosti 10 aminokyselín, IP3 či dokonca siRNA. Medzibunkové spojenia sú tvorené proteínami konexínmi. Expresia konexínov koreluje s rozličnými cievnyimi ochoreniami (Feletou, 2011).

1.3.2 Dysfunkcia endotelu

Dysfunkcia endotelu je odpoveďou na kardiovaskulárne rizikové faktory a predchádza vzniku aterosklerózy a ďalších srdcovocievnych porúch. Zásahu na tvorbe lézií má aj dysfunkčný endotel, ktorý umožňuje podporu skorých a neskorých mechanizmov aterosklerózy. Dochádza pri nej k zníženiu biologickej dostupnosti vazodilatátorov a naopak k zvýšeniu faktorov vazokonstrikcie. Zmeny vedú k poškodeniu endotel - dependentnej vazodilatácii, čo je funkčnou charakteristikou dysfunkcie. Ďalšou zmenou zo zápalového hľadiska je vysoká adhezívna schopnosť endotelu k bunkám leukocytov a syntéza prozápalových cytokínov (Hadi, *et al.* 2005, Hulín *et al.* 2005).

Množstvo faktorov zvyšuje koncentráciu voľných radikálov v organizme. Môžu to byť napríklad obezita, akútna mikrobiálna infekcia, fajčenie, vysoká koncentrácia glukózy v krvi. Je možné vykonávať vyšetrenia, ktorými získame odozvu ciev vazoaktívnymi substanciami (acetylcholin, bradykinín, atď.) schopnými reagovať s endotelom. Vyšetrenie sa robí angiografom na základe Dopplerovho efektu. Pacienti s dysfunkciou môžu paradoxne vykazovať vazokonstrikciu, u zdravých ľudí dochádza po pôsobení acetylcholínu k vazodilatácii. Ako sme si už spomenuli, endotel má význam pri dlhodobej a krátkodobej kontrole kardiovaskulárnych funkcií. Dysfunkcia je preto evidentne prítomná pri nasledovných poruchách: hypertenzia, hyperlipidémia, diabetes mellitus, pľúcna hypertenzia, cerebrálny a koronárny vazospazmus, vaskulitída, hemolyticko-uremický syndróm atď. (Rajendran, *et al.* 2013, Roquer, *et al.* 2009).

Hypertenzia

Je to stav neprimeraného miestneho cievneho zápalu, oxidačného stresu alebo systémového zápalu. Spojitosť medzi hypertenziou a dysfunkciou endotelu je predpokladaná, ale dôkazy na toto tvrdenie sú neúplné. Terajšie poznatky poukazujú na to, že sa tieto dva stavy v organizme navzájom posilňujú a prejav závisí na kondícii samotného jedinca. (Dharmashankar&Widlansky, 2010).

Diabetes mellitus

Z dôvodu dlhodobej expozície hyperglykémie dochádza ku komplikáciám diabetu, ktorá zahŕňa produkciu reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (ROS, RNS).

Porucha vaskulárnej homeostázy zapríčinená oxidatívnym stresom spôsobuje poškodenie vazodilatácie. Rezistencia na inzulín narušuje signalizačnú dráhu, ktorá za normálnych okolností aktivuje NO syntázu, taktiež aktivuje MAP kinázu, stimuluje látky ako sú endothelín 1, zvyšuje koncentráciu PAI-1 a adhézných molekúl (Sena, *et al.* 2013). Pri štúdií Blazquez-Medela, *et al.* (2010) bola u pacientov s diabetom alebo hypertenziou prítomná dysfunkcia endotelu, hodnotila sa analýzou PWV. Hodnota PWV udáva arteriálnu tuhosť.

Ateroskleróza

Je zápalový proces s prítomnosťou nepriaznivo pozmenených makrofágov, endotelových buniek, lipoproteínov, buniek hladkej svaloviny alebo rôznych iných bunkových molekúl. Konečným štádiom zápalového procesu je vznik aterosklerotického plátu. Ateroskleróza je progredujúce a mnohohožiskové ochorenie, niekde je prítomný celý plát a niekde je prítomná len dysfunkcia endotelu. Ateroskleróza je zapríčinená viacerými faktormi, jednou z príčin vzniku je aj modifikácia LDL častíc. Oxidačný stres podporuje tvorbu oxidačných modifikácií (oxidované LDL častice). Receptory prítomné na makrofágoch (scavengerové) majú vysokú afinitu k oxidovaným LDL časticiam. Dochádza k zachyteniu častíc a vzniku penových buniek. Penové bunky sa hromadia a dochádza k produkcii rastových faktorov a cytokínov. Molekuly spôsobujú proliferáciu hladkého svalstva ciev a produkciu kolagénu (Hulín, *et al.* 2005). Zápalové cytokíny sú nástrojom progresie aterosklerózy ako je to dokázané vo viacerých štúdiách napríklad, blokovaním interferónu γ a tumor nekrotizujúceho faktoru α sa zlepšuje rozvoj aterosklerózy. Inhibícia aktivity metaloproteináz a blokovanie signálnych cytokínových proteínov môže zlepšovať priebeh chronického zápalu v stene ciev (Vidal-Vanaclocha, 2009).

Periférne ochorenie ciev

Kompenzačné mechanizmy umožňujúce remodeláciu ciev sú závislé na aktivite NO syntázy. Pacienti s dysfunkciou majú oslabené tieto obranné mechanizmy. Pri ischemickej chorobe dolných končatín sa stimulujú kompenzačné mechanizmy, tie sú však oslabené. Dysfunkcia zhoršuje klinický stav pacientov trpiacich na periférne ochorenie ciev kvôli neschopnosti remodelácie a formovaní vedľajších ciev. K ischémii tkanív môže prispieť aj zvýšená expresia protrombických a prozápalových faktorov (Rajendran, *et al.* 2013).

Infekčné ochorenia

Strata cievnej bariéry a permeability hrajú dôležitú rolu v patogenéze vírusov hemoragických horúčok. Príznaky môžu byť spôsobené priamo vírusovou infekciou a poškodením endotelu alebo nepriamo dysreguláciou imunitného systému a teda k vzniku prehnanej reakcii endotelu. K rozvratu bariéry endotelu dochádza pri dengue horúčke a hantavírusovom pľúcnom syndróme (Basu, 2008).

Rakovina

Dysfunkčne aktivované endotelové bunky podporujú prozápalovú signalizáciu. Aktiváciou zápalových dráh v stromálnych bunkách dochádza k indukcii dráhy nukleárneho faktoru kappa B (NF- κ B) čo vedie k zvýšeniu invazívnosti a tvorbe metastáz. Pokojová forma endotelu vyvoláva miernu aktiváciu zápalových dráh v nádorových bunkách a inhibuje proliferáciu, na druhej strane dysfunkčný endotel vyvoláva silnú zápalovú aktiváciu. Stimuluje apoptózu v nádorových bunkách, ale preživšie bunky sú omnoho agresívnejšie. V tejto štúdií zahŕňa autor strómy endotelových buniek ako aktívneho spoluúčastníka nádorového mikroprostredia (Frances, *et al.* 2013).

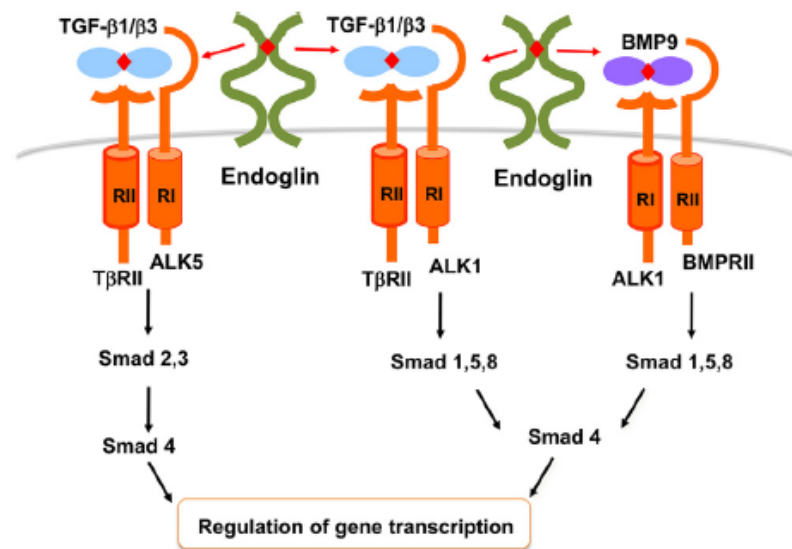
1.4 Signalizačná dráha transformačného rastového hormónu β (TGF β)

Do rodiny TGF β môžeme zaradiť 33 rastových faktorov, ktoré rovnakými mechanizmami plnia pleiotropné funkcie. Špecifická signalizačná dráha je dosiahnutá za pomoci odlišnej afinity ligandov k 7 typom I receptorov (ALK 1-7) a k 5 typom II receptorov (ActRIIA, ActRIIB, T β RII, BMPRII, AMHRII) pozri obr. č. 1, co-reguláciou na každej úrovni, špecifickými transkripčnými aktivátormi a represormi, čo v dôsledku umožňuje kvantitatívnu odpoveď. Receptory sú charakterizované cytoplazmatickou doménou so silnou serín/threonínovou kinázovou aktivitou a slabšou tyrozín kinázovou aktivitou (Horbelt, *et al.* 2012).

TGF β /BMP - ligandy kostného morfogenetického proteínu (Bone morphogenetic protein) signalizačné dráhy zahŕňajú SMAD transkripčné faktory, ktoré umožňujú transkripčnú odpoveď na rozdiel od NON-SMAD faktorov ktoré umožňujú aktiváciu MAP kináz, JNK, malých GTP-áz a ďalších faktorov (Horbelt, *et al.* 2012). SMAD

proteíny sú teda intracelulárne mediátory TGF β signalizácie (Moustakas&Heldin, 2009).

BMP a TGF β signalizačné dráhy regulujú u dospelých homeostázu kontrolou bunkovej diferenciácie alebo proliferácie. Táto signalizačná cesta slúži v organizme na produkciu kolagénu, tvorbu inhibítora aktivátora plasminogénu 1 a negatívne pôsobí na angiogénu a migráciu buniek (Gregory, *et al.* 2014). Narušenie tejto signalizačnej dráhy vedie k závažným ochoreniam kardiovaskulárneho, muskulárneho alebo fibrotického typu (Horbelt, *et al.* 2012). Majú dôležitú rolu aj pri pôsobení na ochorenia autoimunitného pôvodu alebo rakoviny rôzneho typu, keďže pôsobia v mnohých typoch tkanív odlišnými spôsobmi (Moustakas, *et al.* 2009).



Obr. č. 1 TGF β signalizačná dráha popisujúca dva druhy receptorov spolu s transkripčnými faktormi a väzbou endoglínu (Gregory, *et al.* 2014)

1.5 Membránový endoglin

Endoglin alebo CD105, Eng, TGF β receptor III. Je homodimérový membránový glykoproteín, ktorý má dôležitú rolu v signalizačnej dráhe TGF β (Nachtigal, *et al.* 2012).

1.5.1 Expresia endoglinu

Expresia na cievnom endotelu viedla k tomu, že sa endoglin klasifikoval ako endotelový marker CD105. Preukázala sa vysoká reaktivita protilátok s odlišnými typmi endotelových buniek z kapilár, artérií, žíl získaných z rôznych tkanív (Gougos&Letarte. 1988). Endoglin je v nízkej koncentrácii exprimovaný v endotelových bunkách, ale zvýšená expresia je v poškodenom cievnom tkanive pri zápale, embryogenéze a angiogenéze. Prítomnosť membránového endoglinu bola objavená v hladkom svalstve, makrofágoch, väzivovom tkanive a aj v hematopoetických bunkách. V neposlednom rade je prítomný endoglin aj v placentárnom syncytiotrofoblaste, kde solubilná forma endoglinu spôsobuje preeklampsiu. Endoglin je dôležitý pri fyziologickej ale aj nádorovej angiogenéze. Slúži ako biomarker vaskularizácie a progresie tumoru, miery prežívania a schopnosti tvoriť metastázy (Kumar, *et al.* 2014, Venkatesha, *et al.* 2006). Štúdiom na endoglin knockout myšiach bola zistená dôležitosť proteínu. Mláďatá sa nerodia kvôli defektnej angiogenéze. Mutácia v géne endoglinu spôsobuje hereditárnu hemoragickú telangiektáziu I (Oujo, *et al.* 2013).

1.5.2 Štruktúra endoglinu

Ľudský gén endoglinu bol za pomoci metódy FISH lokalizovaný na 9 chromozóme. Z primárnej štruktúry proteínu vieme, že endoglin patrí do rodiny *zona pellucida* (ZP). Endoglin pozostáva z N-terminálneho signálneho peptidu, tzv. domény siroty, domény zony pellucida, krátkej cytoplazmatickej domény a hydrofóbnej transmembránovej domény. Membránový endoglin je homodimér s disulfidickými mostíkmi o veľkosti 180kDa (Gregory, *et al.* 2014).

U ľudí boli opísané dve izoformy proteínu a to L (large) – endoglin, ktorý je najčastejší a S (short) – endoglin, ktorý vzniká alternatívnym zostrihom. Rozdiely medzi týmito izoformami vyplývajú z cytoplazmatického chvosta. S-forma je o 33 aminokyselín kratšia. Obidve izoformy vykazujú odlišnú afinitu k receptorom TGF β 1

ALK1 a ALK5. Zo všeobecného hľadiska má S-izoforma antiangiogénne vlastnosti a L-izoforma má proangiogénne vlastnosti (Oujo, *et al.* 2013).

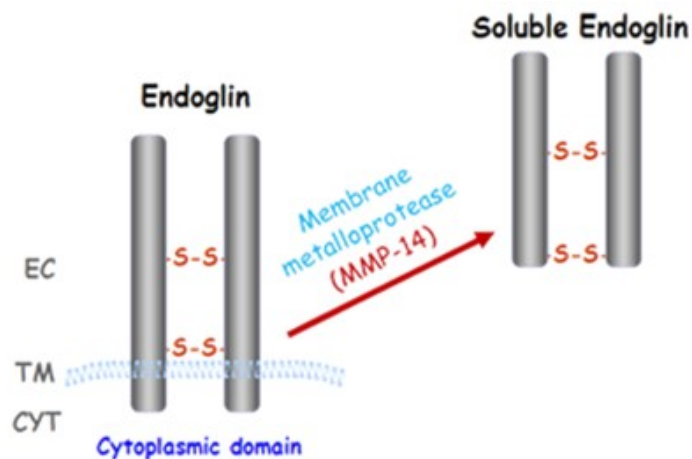
1.5.3 TGF β signalizačná dráha a interakcia s membránovým endoglinom

Endoglin sa podieľa na komunikácii s TGF β 1 a TGF β 3 izoformami. Odpovede TGF β cesty sú riadené cez receptory II typu (T β RII) a taktiež za pomoci I typu receptorov (ALK5). Endoglin potencuje túto signalizačnú cestu (Chen, *et al.* 1998). V endotelových bunkách nachádzame aj prídavnú signalizačnú cestu, ktorá je tiež ovplyvnená expresiou endoglinu, dráha prebieha cez T β RII a ALKI. Mutácia v receptore ALK1 spôsobuje ochorenie HHT 2 typu, endoglin zahrnutý do tejto dráhy taktiež ovplyvňuje ochorenie. Dráha ALK5/ Smad 2,3 antagonizuje dráhu ALK1/ Smad 1,5,8. Pozri obr. č. 1 (Berg, *et al.* 1997).

1.6 Solubilný endoglin

1.6.1 Štruktúra solubilného endoglinu

Membránový endoglin je štiepený metaloproteinázou MMP - 14 zakotvenou v membráne a do cirkulácie je uvoľnená solubilná forma endoglinu (sEng). Preferuje sa názov solubilný, aj keď nikdy nebola stanovená jeho rozpustnosť. Miesto štiepenia je na pozícii 586 aminokyseliny, odštiepená oblasť zahŕňa celú extracelulárnu doménu pozri obr. č. 2. V takejto forme sa vytvára rekombinantná forma sEng s veľkosťou 80kDa (Hawinkels, *et al.* 2010). Avšak purifikovaný solubilný endoglin zo séra pacientok s preeklampiou má dĺžku 406 aminokyselín a jeho veľkosť predstavuje 65kDa (Venkatesha, *et al.* 2006). Štiepenie molekúl spôsobuje zníženie expresie receptorov a tvorbu rozpustných foriem. Solubilné formy môžu tvoriť účinné signálne komplexy s molekulami alebo pôsobiť antagonisticky (Castillo, *et al.* 2015).



Obr. č. 2 Membránový a solubilný endoglin na obrázku je znázornené miesto odštiepenia (Venkatesha, *et al.* 2006)

1.6.2 TGFβ signálna dráha a interakcia so solubilným endoglinom

Solubilný endoglin na rozdiel od membránového nepodporuje rozvoj angiogenézy a k jednotlivým dráham sa viaže s omnoho vyššou afinitou. V nedávnych štúdiách sa dokázalo pomocou metódy SPR (surface plasmon resonance), že solubilný endoglin sa priamou väzbou viaže na BMP9 signálnu dráhu a nie na cestu TGFβ. sENG tlmí signálnu cestu BMP9/Smad 1/5/8 a tým inhibuje angiogenézu. Všeobecne sa však

dá skonštatovať, že štiepenie endoglínu má významnú úlohu v angiogenéze TGF β signalizačnej dráhy (Kumar, *et al.* 2014). V ďalšej štúdií za pomoci metódy western blot sa potvrdil názor, že sEng nemá žiadny efekt na TGF β 1 cestu, dokáže to však v prípade, keď je v komplexe s receptorom II typu (sT β RII) (Gregory, *et al.* 2014).

1.6.3 Účinok solubilného endoglínu

Ako sme si uviedli v predošlej kapitole, sEng ovplyvňuje priebeh preeklampsie, čo je závažné ochorenie špecifikované vysokým krvným tlakom a závažnými zmenami v placentárnom obehú (Blázquez-Medela, *et al.* 2010). Je to odôvodnené aj vzhľadom k tomu, že sEng ovplyvňuje cestu BMP9, ktorá je dôležitá v regulácii endothelínu 1. Pri preeklampsii je hodnota endothelínu zvýšená a spôsobuje vazokonstrikcii (Gregory, *et al.* 2014). Zvýšená koncentrácia sEng a sFlt1 (solubilná forma receptoru 1 vaskulárneho endothelového rastového faktoru - VEGF) u pacientok s preeklampiou prispieva k patogenéze proteínúrii, HELLP syndróm, glomerulárnej endotelioze a taktiež sa spomaľuje fetálny rast. Zvýšené množstvo sEng koreluje s vážnosťou ochorenia (Venkatesha, *et al.* 2006). sEng má aj anti-angiogénne vlastnosti, ktoré sa študovali pri myšiach s adenokarcinómom kolónu, kde umožnil redukciu rastu tumoru (Castonguay, *et al.* 2011). Solubilná forma endoglínu bola zistená v plazme, moči a sére pacientov s rakovinou. Zvýšená koncentrácia sEng koreluje so vznikom metastáz pri kolorektálnom karcinóme a pri rakovine prs (Takahashi, *et al.* 2001). Pri akútnej myeloidnej leukémii alebo chronickom myeloproliferatívnom ochorení taktiež pozorujeme zvýšenie hladín solubilného endoglínu (Calabro, *et al.* 2003). V biologických tekutinách sa detekovala peptidová sekvencia, ktorá poukazuje, že sa jedná o N-terminálny produkt štiepenia, membránovo viazeného endoglínu. sEng bol určený ako marker u pacientov s familiárnou hypercholesterolémiou, pretože sEng sa zvyšuje zároveň s hladinou cholesterolu. Na základe porovnávania koncentrácií sEng v plazme pacientov s diabetes mellitus a hypertenziou sa usúdilo, že má negatívny vplyv na rôzne ochorenia oproti kontrolnej skupine. Je zjavné spojenie solubilného endoglínu s glykémiou, zvýšenou hodnotou pulzu, ľavostrannou ventrikulárnou hypertrofiou (Blaha, *et al.* 2008, Blázquez-Medela, *et al.* 2010).

1.6.4 Solubilný endoglin a dysfunkcia endotelu

Podávanie adenovírusového solubilného endoglinu negravidným myšiam spôsobovalo zvýšenie expresie markerov charakterizujúcich dysfunkciu endotelu (VCAM-1, solubilného E- selektínu, P-selektínu) a poškodenie autoregulácie ciev závislej na endotele. Je predpokladaná súvislosť s neutralizáciou TGF β signalizačnej dráhy. Inhibícia dráhy pravdepodobne blokuje aktiváciu eNOS v endotelových bunkách (Walshe, *et al.* 2009). Na základe štúdie Nemeckovej *et al.* (2015) na transgénnych myšiach so zvýšenou expesiou ľudského endoglinu sa preukázali odlišné výsledky ako doteraz. Po vykonaní analýzy western blot, výsledky neukázali rozdiely v expresii markerov dysfunkcie endotelu (ICAM-1, VCAM-1 eNOS) a endoglinu oproti kontrolnej skupine v aorte myší. Teda by sa dalo predpokladať, že zvýšenie endoglinu v plazme neovplyvňuje expresiu membránového endoglinu a taktiež ani eNOS a adhézných molekúl na endotele aorty.

1.6.5 Markery funkcie endotelu

Efekt sEng na endotelové bunky *in vitro* je študovaný za pomoci vybraných markerov TGF β signalizačnej dráhy, ktoré dokážu zhodnotiť stav endotelových buniek.

1.6.5.1 Cievna (VCAM-1) a intracelulárna (ICAM-1) adhézna molekula

Endotelové bunky sú regulované reaktívnymi formami kyslíka (ROS) a antioxidantmi počas zvýšenej koncentrácie leukocytov. Na mieste zápalu, endotel podporuje expresiu adhézných molekúl, aby mohlo dôjsť k väzbe leukocytov na endotel. Adhézne molekuly umožnia migráciu leukocytov aktiváciou endotelovej signálnej transdukcie. Aktiváciu VCAM-1 spôsobuje viacero mediátorov zahŕňajúc ROS. VCAM-1 slúži ako spúšťač endotelovej signalizácie pomocou NADPH oxidázy vyvolávanú ROS. Zápal a signálna transdukcia indukovaná VCAM-1 je blokovaná antioxidantmi (Cook-Mills, *et al.* 2011).

K markerom zápalu patrí spolu s VCAM-1 aj intracelulárna adhézna molekula-1 (ICAM-1) spolu patria medzi najdôležitejšie adhézne molekuly, ktoré sú stimulované pri aktivácii endotelu. Pri využití ICAM-1 ako markera pri modeli *in vivo* si treba uvedomiť, že je produkovaný aj bunkami ako sú eozinofily, lymfocyty a monocyty. VCAM-1 je exprimovaný aj na bunkách ako sú hladká svalovina, makrofágy, neuróny

alebo fibroblasty, najčastejšie je exprimovaný na endotelových bunkách. VCAM-1 je v porovnaní s ICAM I lepším markerom vzhľadom na expresiu mRNA, povrchovú expresiu a uvoľňovanie solubilnej formy do média, v modele HUVEC (Fries, *et al.* 1993). Finálne formy proteínu VCAM-1 a ICAM-1 majú odlišný časový priebeh povrchovej expzie. V humánných endotelových bunkách sa zo začiatku VCAM-1 objaví po 4-6 hodinách, maximum nadobudne po 12-18 hodinách a postupne klesá v priebehu niekoľkých dní (Osborn, *et al.* 1989). ICAM-1 má svoje maximum pri 18-24 hodinách a zotrúva v tejto hodnote až dokým sú prítomné cytokíny (Pober, *et al.* 1986).

1.6.5.2 Cievny endotelový rastový faktor - VEGF

Molekula VEGF je exprimovaná rôznymi druhmi buniek. Jeden gén (*VEGF*) kóduje štyri izoformy. Dve izoformy sa viažu predominantne na endotelové bunky a majú odlišné funkcie a to napríklad stimulácia diferenciácie, proliferácie alebo migrácie. VEGF má dôležitú rolu v mnohých fyziologických a patologických procesoch ako sú vývoj embrya, hojenie rán, psoriáza, diabetická retinopatia a rast nádorov (Brekken *et al.* 1998). VEGF je špecifický peptid, ktorý stimuluje taktiež angiogézu, vazodilatáciu a spôsobuje hyperpermeabilitu. Zvyšuje fosforyláciu a aktivitu fosfolipázy 2, tým stimuluje uvoľňovanie kyseliny arachidónovej a teda zvyšuje produkciu prostaglandínu v endotelových bunkách (Wheeler-Jones, *et al.* 1997).

1.6.5.3 Prostaglandín – endoperoxid syntáza 2 - PTGS2

Ďalším zápalovým markerom je cyklooxygenáza II, ktorú kóduje gén *PTGS2*- prostaglandín- endoperoxid syntáza 2. Je stimulovaný ako odpoveď na zápalové a mitogénne podnety (Cerebrian *et al.* 2017). Cyklooxygenáza metabolizuje kyselinu arachidónovú k tvorbe prostacyklínu a tromboxánu. Existujú dve izoformy cyklooxygenázy COX-1, COX-2. COX-2 je exprimovaná pri rôznych stimuloch ako sú zápalové cytokíny, ktoré sa mnohokrát spájajú s patologickými stavmi. Zvýšenie produkcie *PTGS2* je spojované so zvýšenou adhéziou buniek, fenotypovými zmenami, rezistenciou k apoptóze a nádorovej angiogéze (Akarasereenonta *et al.* 2002, Kim, *et al.* 2005).

Neovplyvnená endotelová bunková kultúra neobsahuje proteín cyklooxygenázu 2. V štúdií Akarasereenonta *et al.* (2002) ovplyvňovali kultúru endotelových buniek

vaskulárnym endotelovým rastovým faktorom – VEGF, pri tomto ošetrení bol proteín COX-2 prítomný, ale COX-1 nie. Aktivita cyklooxygenázy sa zvyšovala na základe koncentrácie VEGF v médiu. Aktivita COX a zvýšenie expresie *PTGS2* v endotelových bunkách, ošetrených VEGF bola mediovaná proteín tyrozín kinázou (Akarasereenonta *et al*, 2002).

1.6.5.4 Cadherín 5 - *CDH5*

K markerom funkcie endotelu patrí cadherín 5, ktorý kóduje gén *CDH5*. Patrí do skupiny cadherínov, ktoré sú závislé od vápenatých kationov. Umožňuje endotelovým bunkám adherovať a má dôležitú rolu pri bunkových spojeniach (RefSeq Gene, 2016). Mechanizmy regulujúce cadherínom 5 mediovanú adhéziu sú dôležité pri regulácii extravazácie leukocytov alebo cievnej permeability. Okrem toho reguluje ďalšie bunkové procesy ako je apoptóza alebo proliferácia (Vesteweber, 2008). Reportérová génová analýza dokazuje, že cadherín 5 je exprimovaný vo všetkých cievnych štruktúrach, vrátane žltkového vaku, mozgových kapilárach alebo vyvíjajúcej aorte. U dospelých jedincov je expresia cadherínu v celom cievnom systéme (Fleming, 2005).

1.6.5.5 NO syntáza 3 - *NOS3*

Endotelová NO syntáza je kódovaná génom *NOS3*, umožňuje tvorbu oxidu dusnatého z L-arginínu. Oxid dusnatý je voľný radikál, ktorý je mediátorom vo viacerých procesoch ako sú antimikróbna, protinádorová aktivita alebo neurotransmisia. Zmeny v géne sa spájajú s vyššou citlivosťou na spazmy koronárnych ciev (GeneCards *NOS3* Gene, 2016). NO je považovaný za relaxačný faktor endotelu. Inhibíciou kontrakcii hladkého svalstva a agregácie krvných doštičiek reguluje prietok krvi a vazomotorický tonus (Janssens, *et al.* 1992).

1.6.5.6 Ďalšie endotelové markery

K ďalším markerom charakterizujúcim funkciu endotelu patrí HMOX-1 a NOX4. Ich pôsobenie je spojené s oxidatívnym stresom. *HMOX-1* je gén pre hem oxygenázu čo je enzým, ktorý katalyzuje premenu hemu na oxid uhoľnatý a biliverdín. Hem oxygenáza veľmi rýchlo pôsobí na oxidačný stres. Je možné ho využiť ako indikátor pri oxidatívnom poškodení tkaniva a zmenou koncentrácie niektorých enzýmov dokáže

meniť antioxidačný stav organizmu. Je produkovaný ubikvitárne (Yachie, *et al.* 1999). Produkt génu *NOX4* je NADPH oxidáza 4. Je lokalizovaný na bunkách, ktoré nemajú vlastnosť fagocytózy a umožňuje redukciu kyslíka pre tvorbu oxidatívnych foriem. Reaktívne formy kyslíka sa využívajú pri diferenciácii buniek alebo aj pri raste nádorov (GeneCards *NOX4* Gene, 2009). *NOX4* je v endotelových bunkách spájaný s kardiovaskulárnymi ochoreniami (Touyz & Montezano, 2012).

Ďalším markerom je faktor indukujúci hypoxiu, kódovaný génom *HIF1*. Je to transkripčný faktor, tvorený dvoma izoformami *HIF1 α* a *HIF1 β* . Produkt tohto génu je významný regulátor homeostázy kyslíka. Tkanivová ischemia alebo systémová hypoxia zvyšujú koncentrácie tohto proteínu, zvýšenie koncentrácie je odlišné podľa napadnutého tkaniva (YU, *et al.* 2004). K ďalším markerom patrí cytochróm B-245 α reťazec, kódujúci gén tohto proteínu je *CYBA*. Cytochróm B pozostáva z dvoch reťazcov α a β . Gén *CYBA* kóduje ľahký α reťazec. Mikrobicídny systém, ktorý vzniká za pomoci cytochrómu slúži ako primárny obranný nástroj pre fagocyty (NCBI, 2008). Transkript génu bol objavený vo viacerých bunkách (pečeňové, endotelové, B-lymfocytoch, atď), ale samotný produkt génu bol nájdený iba vo fagocytoch (Parkos *et al.* 1988).

Chemokíny hrajú dôležitú rolu v regulácii endotelových buniek pôsobením na migráciu, proliferáciu a diferenciáciu buniek počas angiogenézy. Ďalším markerom je chemokín, kódovaný génom *CCL2*. *CCL2* je charakterizovaný dvoma cysteinovými zvyškami, z tohto dôvodu vznikol aj názov chemokín s C-C motívom 2. Všeobecne sa skupina chemokínov zapája do zápalových a imunoregulačných procesov. Endotelové bunky na svojom povrchu exprimujú receptory pre tieto chemokíny (Gupta, *et al.* 1998). Hlavným glykoproteínom endotelu je endoglin, ktorý je kódovaný *ENG* génom. Jeho úloha v endotelových bunkách už bola popísaná v kapitole 1.5.

1.6.6 MMP-14

Ako sme už spomínali metaloproteáza MMP-14 je zodpovedná za štiepenie endoglinu pozri obr. č. 2. MMP-14 patrí medzi membránové metaloproteázy, patrí do 1. triedy kolagenáz. Jeho úloha v cievach spočíva v: zápalovej odpovedi endotelových buniek, komunikácii medzi bazálnymi bunkami a endotelovými bunkami v dýchacích cestách, ovplyvňuje zraniteľnosť aterosklerotického plátu. Stimulácia MMP-14 je zvýšená na mieste poranení v porovnaní s neporušenou kožou, signalizuje to jeho

katalytickú aktivitu v procese hojenia. Vzájomná expresia membránovo lokalizovaného MMP14 a endoglínu zvyšuje v médiu hodnotu solubilného endoglínu (Lukas, *et al.* 2010).

1.7 Bunkové modely pre štúdium endotelových funkcií

Bunkové kultúry majú v dnešnej dobe nenahraditeľné miesto. Sú výhodné po stránke rýchlosti kultivácie, nedochádza k interakciám s inými bunkovými populáciami, tkanivami alebo orgánmi. Práca s bunkovými kultúrami je však aj limitujúca. Bunky nerastú za fyziologických podmienok a sú kultivované v umelom médiu. Médium neodráža identické prostredie organizmu. Fenotyp bunkovej línie nemusí odpovedať bunkám v ľudskom organizme. Môže sa meniť morfológia alebo citlivosť na rozličné podnety. Je nutné brať do úvahy, že sa pracuje s modelom *in vitro* a nie na modeloch *in vivo* (Vejražka).

HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells, ľudské endotelové bunky získané z pupočníkovej žily) bunky slúžia už dlhé roky ako model endotelu, pomáhajú širokej vedeckej komunite po celom svete. Vlastnosti HUVECs určite nie sú reprezentatívne pre všetky metabolické kapacity a odpovede vo fyziopatológii a toxicite. Dôvodom je aj fakt, že v organizme sa nachádzajú odlišné typy endotélii. Model HUVECs je jedným z jednoduchších a prístupnejších typov endotélii, jeho využitie je pri výskumoch všeobecných vlastností ľudských endotélii. V prípade štúdií na poškodených endotéliách sa osvedčili modely endotelu so špecifickou patológiou (Baudin, *et al.* 2007).

Tak ako väčšina bunkových línií, sú bunky HUVECs vhodné na vytváranie subkultúr. Pasážovanie môže prebiehať za použitia trypsínu alebo aj bez neho. Primárna kultúra sa preferuje z dôvodu nižšej koncentrácie proteínov, jednotlivým pasážovaním dochádza k zrýchleniu starnutia a pribúdaniu jednotlivých proteínov. Napríklad pri angiotenzín konvertujúcom enzýme alebo prostacyklíne dochádza k zníženiu syntézy v závislosti na množstve pasážovaní. Pridávaním rastových faktorov môže dôjsť taktiež k zmene syntézy určitých proteínov. Bunkovú líniu HUVECs sa dá identifikovať za pomoci endotelových markerov metódami imunofluorescencie. Viac či menej špecifické pre endotelové bunky sú antigény CD-31, CD-34, CD-54 alebo to môže byť ICAM-1, E- selektín, VCAM-1, ktoré sú často exprimované na HUVECs bunkách po stimulácii (Baudin, *et al.* 2007).

Ako prvý sa o kultiváciu HUVECs buniek postaral Jaffe a kolektív v 70-tych rokoch. Na základe ich štúdie sú endotelové bunky izolované z ľudskej pupočnej šnúry, vnútro pupočnej žily sa natrávi kolagenázou. Bunky rastú ako homogénna populácia 5 mesiacov a niektoré z línní sú pasážované až 10krát. Bunky rastú v médiu kde po dobu 92 hodín zdvojnásobia svoj počet. Na kultivovaných endotelových bunkách boli exprimované ABH antigény darcu. Táto štúdia dokázala, že je možné vytvoriť imunologicky aj morfológicky jednotnú kultúru endotelových buniek (Jaffe, *et al.*, 1973). Na základe tejto štúdie spravili Baudin a kolektív protokol. Endotelové bunky izolované z cievnej steny pupočnej žily sú natrávené kolagenázou, následne sú očkované do platničiek s fibronektínom a nakoniec sú kultivované s fetálnym teľacím sérom, a Earlesovým roztokom, bez prídavku rastových faktorov sa nechajú kultivovať v inkubátore 7 dní pri 37 stupňoch Celzia, pri atmosfére 5% CO₂. Monitorovanie sa prevádza fázovým kontrastným mikroskopom (Baudin, *et al.* 2007).

1.8 PCR- polymerase chain reaction

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je metóda, ktorá nám slúži k *in vitro* amplifikácii DNA. Touto reakciou dokážeme DNA fragment namnožiť a vytvoriť množstvo kópii tej istej sekvencie. Umožňuje študovať gény a proteíny spôsobom, ktorý dovtedy nebol možný. Za objaviteľa tejto metódy sa považuje Kary Mullis v kolektíve s Randal K. Saiki, Fred Faloona a Henry A. Erlich v 1983. Sám Mullis sa vyjadril, že metóda je ľahko realizovateľná, vyžaduje pár jednoduchých činidiel, skúmavky a zdroj tepla (Mullis, 1990).

1.8.1 Zloženie reakčnej zmesi

Zloženie základnej zmesi pre PCR nazývanej aj mastermix pozostáva:

1. Templátová DNA – obsahuje fragment, ktorý potrebujeme namnožiť.
2. Primer – špecifickosť metódy závisí vo veľkej miere na výbere primerov, musia byť komplementárne ku kódujúcemu a templátovému vláknu. Dôležité je dodržiavať niektoré pravidlá ako napríklad, že primery nemajú byť komplementárne medzi sebou, ich dĺžka by mala byť približne 17-30 nukleotidov, obsah GC báz by mal byť približne 50% atď.
3. DNA polymeráza – slúži na katalýzu syntézy DNA, dôležitou vlastnosťou je termostabilita a presnosť. Najčastejšie využívaná je *Taq* polymeráza izolovaná z baktérie *Thermus aquaticus* poprípade *Tth* - *Thermus thermophilus*, *Pfu* *Pyrococcus furiosus*.
4. Deoxyribonukleotid trifosfát – dNTP, slúžia na vytvorenie nového reťazca. Do zmesi sa pridáva mix štyroch dNTPs v ekvivalentom množstve.
5. Pufrovací roztok – zaisťuje optimálne chemické prostredie.
6. Divalentné ióny - najčastejšie využívané sú horečnaté ióny, slúžia ako kofaktory pre polymerázovú aktivitu aj v prípade aktivity reverznej transkriptázy. Ako alternatíva nám poslúžia napríklad Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} . Ich nevýhoda je, že znižujú presnosť polymeráz.
7. Monovalentné ióny – využívajú sa draselné ióny, ktoré stimulujú aktivitu polymerázy a chránia negatívne nabitú DNA fosfátovú kostru. Ich zvýšená koncentrácia zdokonaľuje výťažok krátkych DNA sekvencií (Achuthan&DeStefano, 2015, Pelt – Verkuil, *et al.* 2008, Primrose&Twyman, 2006, Shafique, 2012).

1.8.2 Princíp

Princíp metódy spočíva v opakovaní cyklov, kde sa v každej fáze menia teploty. Účinnosť metódy klesá, keď amplifikovaný fragment prekročí veľkosť 5kb. PCR pozostáva z jednotlivých krokov: (Primrose&Twyman, 2006)

1. Iniciačný krok – je to prvý krok reakcie, kde sa teplota zvyšuje až na 94-98 °C. V tomto kroku sa aktivuje enzým DNA polymeráza.
2. Denaturácia – teplota ostáva na 94-98°C. Dochádza k uvoľňovaniu vodíkových väzieb, oddeleniu dvojláknovej DNA a vzniku jednotlivých vlákien.
3. Anelácia – v tejto fáze teplota klesne na 50-65°C. Dochádza k nasadeniu primerov (krátke DNA sekvencie) na komplementárnu sekvenciu jednovláknovej DNA.
4. Elongácia – dochádza k predlžovaniu reťazca pomocou DNA polymerázy. Optimálna teplota enzýmu *Taq* polymeráza je približne 75-78°C. V tejto fáze sa využíva teplota v závislosti na používanom enzýme. Pri optimálnej teplote dokáže DNA polymeráza syntetizovať tisíc báz za minútu.
5. Finálna elongácia – nasleduje po záverečnom teplotnom cykle. Trvá dlhšie ako klasická fáza elongácie. V tomto kroku sa uistujeme, že cyklus prebehol správne a všetky reťazce sú syntetizované. Následne sa reakčná zmes necháva vychladieť na 4-15°C (Sahoo, 2010).

1.8.3 Využitie

PCR metóda umožňuje uplatnenie v mnohých odboroch. Aplikácia PCR umožňuje izolovať DNA, táto vlastnosť sa využíva pri Southern a Northern hybridizácii, kde sa izolované fragmenty používajú ako próby. Umožňuje to zaistenie veľkého množstva kópií špecifickej sekvencie (Shafique, 2012). Dlhो známe je využitie PCR v kriminalistike alebo v prenatalnej diagnostike. Ideálnym príkladom využívania PCR je analýza tumorov, kde sa po izolácii a amplifikácii stanovuje DNA tumor supresorových génov alebo protoonkogénov. Na druhej strane využitie real-time PCR nám umožňuje kvantifikovať izolovaný konkrétny gén (Stahlberk, *et al.* 2012).

Klasifikácia organizmov pomocou rôznych polymorfizmov. PCR umožní zaradenie organizmov na základe taxonomických vzťahov. Využitie v mikrobiológii

tiež nie je zanedbateľné a to napríklad v prípade HIV dokážeme detekovať vírus skôr ako klasickým ELISA testom (Sahoo, 2010).

1.8.4 Modifikácie základnej verzie PCR

Hot- start technika bola vyvinutá z dôvodu zvýšenia špecifickosti hneď v úvodnom kroku. Alternatívna PCR využíva viazanie protilátok na DNA polymerázu. Protilátka sa inaktivuje zvyšovaním teploty. Prípadne sa môže DNA polymeráza pridať až po dosiahnutí anelačnej teploty. Ďalšia metóda zavedená ku zlepšeniu špecifickosti a zvýšeniu výťažnosti je **nested PCR**. Využíva dve za sebou idúce PCR reakcie. Prvá reakcia slúži na vytvorenie templátu pre druhú reakciu (Primrose&Twyman, 2006). K ďalším metódam patrí **multiplex PCR**, svoje využitie našla napríklad aj vo vyhľadávaní mitochondriálnych mutácií. Na rozdiel od klasickej PCR používa set primerov, slúžiacich na amplifikáciu rôznych DNA fragmentov (Ramprasath, *et al.* 2011). **Alelovo špecifická PCR** slúži najčastejšie k detekcii bodových mutácií, môže sa vykonávať v dvoch alebo vo viacerých reakciách. Pri prvej reakcii je k štandardnej alebo zdravej sekvencii komplementárny prvý primer a v druhej reakcii je iný primer komplementárny k polymorfnej alebo mutovanej sekvencii. **Asymetrická PCR** je vhodná metóda pre sekvenovanie podľa Sangera. Pri tejto metóde sú prednostne tvorené ssDNA len jedného reťazca. Odlišnosťou je koncentrácia primerov, ktorá je 100 krát vyššia pri jednom primery ako pri druhom (Šmarda, *et al.* 2005).

1.8.5 RT-PCR

RT- PCR nám umožňuje získať komplementárnu DNA z mRNA za pomoci enzýmu zvaného RNA-dependentná DNA-polymeráza. Fragment RNA nám posluží ako templátová DNA. Metóda je veľmi citlivá, z jedinej bunky je možné detekovať expresiu génu (Lorsch, 2013). V prípade tejto metódy máme na výber z dvoch druhov primerov. Géno špecifické primery fungujú lepšie pri zvýšených teplotách, ale je potrebné pre každý gén samostatnú reakciu. V prípade géno nešpecifických primerov môžu byť využívané náhodné hexaméry, oktaméry, dekaméry poprípade poly- T oligonukleotidy ich výhodou je, že sa zvyšuje množstvo detekovateľných génov (Pfaffl, 2004). Účinnosť pätnásť nukleotidového primeru je o polovicu lepšia v porovnaní s šesť nukleotidovým primerom (Saunders&Lee, 2013). Enzýmy využívané k prepisu mRNA

sa získavajú najčastejšie z vírusu vtácej myeloblastózy (AMV) alebo z Moloneyho vírusu myšacej leukémie (M- MuLV, MMLV). Môžeme využiť aj termostabilnú *Tth* (*Thermus thermophilus*). Jej výhodou je, že pri jednej reakcii dokáže prepísať mRNA a aj amplifikovať cDNA. Nemá však schopnosť RNázy H a taktiež prepisuje fragmenty v omnoho menšej veľkosti (Zima *et al.* 2013).

1.8.6 Kvantitatívna PCR

qPCR umožnila uskutočniť množstvo pokrokov v diagnostike chorôb, fyziológii a patológii ochorení, vo forezných vedách a kriminalistike. Najlepšie využitie našla v stanovení génovej expresie (Miller&Andre, 2014). Predpokladá sa, že je tisíc krát citlivejšia ako blotovacie techniky (Wong&Medrano, 2005). Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia alebo aj real- time PCR je citlivá, rýchla a presná metóda umožňujúca kvantifikáciu sekvencie nukleovej kyseliny. Zloženie reakčnej zmesi je rovnaké až na jednu položku, ktorou je fluorescenčná sonda. Sondám a ich rozdeleniu sa budeme venovať v ďalších kapitolách (Miller&Andre, 2014).

1.8.6.1 Princíp

Je to metóda, ktorá v jednom kroku zahŕňa amplifikáciu a detekciu. Umožňujú nám to fluorescenčné sondy, ich signál koreluje s množstvom vyprodukovanej DNA. Reakcia je charakterizovaná hodnotou Ct - cycle of treshold. Táto hodnota nám udáva počet cyklov, v ktorých fluorescencia dosiahla vyššiu intenzitu ako je prahová hodnota (Wong&Medrano, 2005).

1.8.6.2 Porovnanie qPCR a klasickej PCR

Najväčšou odchýlkou medzi metódami je detekcia amplifikovanej DNA. Klasická PCR má takzvanú end point analýzu. Po amplifikácii je sekvencia separovaná pomocou gélovej elektroforézy a produkty sú identifikované na základe veľkosti pruhov v gély. V prípade kvantitatívnej PCR môžeme sledovať nárast produkt v reálnom čase. Oproti klasickej PCR umožňuje produkt reakcie kvantifikovať a uzavretý systém prístroja taktiež zabezpečuje zníženie kontaminácie vzorky (Nolan, *et al.* 2013).

1.8.6.3 Prístroje pre qPCR

Prístroje potrebné pre kvantitatívnu PCR pozostávajú z termocykléru, teda zariadenia potrebného k striedaniu teplôt. K termocykléru je integrovaný excitačný zdroj (monochromatický zdroj - dióda, polychromatický zdroj s filtrami). K záznamu fluorescenčnej emisii nám posluží fluorimeter alebo fluorescenčný detekčný systém a nakoniec musí byť prítomný software, ktorý nám zobrazuje dáta ako amplifikačnú krivku (Libra, 2015/2016, Navaro, *et al.* 2015).

1.8.6.4 Sondy v qPCR

Je dôležité, aby v reakčnej zmesi bolo prítomné interkalačné farbivo alebo fluorescenčne značená próba. Fluorescenčné sondy sú rozdelené do dvoch skupín podľa špecificity detekcie PCR. Do prvej skupiny patria interkalačné farbivá, ktoré sú schopné viazať nešpecifické produkty. Druhá skupina činidiel využíva oligonukleotidy viazané s fluoroforom, dokážu detekovať iba špecifické produkty PCR (Navaro, *et al.* 2015).

Interkalačné farbivá

Na trhu je v dnešnej dobe veľké množstvo fluorescenčných farbív ako napríklad ethidium bromid, BEBO, BOXTO, SYBR Green, SYBR Gold, EVA Green.

Najčastejšie využívaným interkalačným farbivom je SYBR Green I, je to asymetrické kyanínové farbivo. Viaže sa veľkou afinitou na dvojvláknovú DNA za pomoci dvoch pozitívne nabitých pozícií vo svojej molekule. Absorbuje svetlo vo vlnovej dĺžke 497nm a emituje o vlnovej dĺžke 520nm, kedy má zelené žiarenie. Farbivá voľne v zmesi nevykazujú fluorescenciu. Nevýhodou SYBR Green I je nutnosť optimalizácie a taktiež nutnosť analýzy teploty topenia. Je za potreby overiť, či nie sú prítomné nešpecifické produkty PCR (Navaro, *et al.* 2015).

Na rozdiel od špecifických prôb, ktoré sú syntetizované na jedno konkrétne miesto, farbivá ako SYBR Green I nešpecificky interkalujú do dvojzávitnice DNA a sú lacnejšie ako próby. Nevýhodou je detekcia nešpecifických produktov alebo dimérov použitých primerov. Vo výsledkoch vychádza falošná pozitivita. Ďalšou nevýhodou je inhibícia PCR reakcie pri niektorých farbivách (Smith, 2010). Podľa štúdií Monis, *et al.* (2005) farbivo SYTO 9 v porovnaní so SYBR Green I udáva vysoko reprodukovateľné hodnoty v analýze teploty topenia DNA. Pôsobí menej inhibične v reakcii a nedetekuje

selektívne konkrétne amplikóny. Po porovnaní s novšími typmi farbív nevykazovali žiadne z nich lepšie parametre ako SYTO 9.

Fluorescenčne značené sondy

Fluorofory sú malé molekuly, ktoré sú pripojené k oligonukleotidom. Fluorescenčné oligonukleoty môžu byť v podobe primerov, analógov nukleových kyselín alebo sond. Fluorofory rozdeľujeme do skupiny donorov alebo reportérov a do skupiny akceptorov alebo zhášačov. Ak je medzi dvoma fluoroformi, určitá vzdialenosť najčastejšie 10- 100Å, prenos excitovanej energie z reportéra na zhášač je pomenovaný ako FRET prenos z anglického fluorescence resonance energy transfer. Existujú dva druhy FRET prenosu energie na akceptor. Energia zhášača je rozptýlená vo forme tepla alebo prenášaná energie je emitovaná vo forme fluorescence (Navaro, *et al.* 2015). Obidve sondy, aj hydrolyzačná aj hybridizačná, fungujú na FRET prenose. Ten však pracuje odlišne pri hydrolyzačných sondách, kde znižuje intenzitu fluorescence a pri hybridizačných zvyšuje fluorescenciu (Wong & Medrano, 2005).

Hydrolyzačné sondy

Pri tomto druhu prôb je najdôležitejšia 5'-3' exonukleázová aktivita, umožňuje detekciu PCR produktov hydrolýzou prôb. Sekvenčne špecifická sonda je značená reportérom s fluoroforom na 5' konci a na 3' konci zhášačom, ktorý utlmuje intenzitu fluorescence reportéru v prípade, keď je celistvá. Pri anelácii sonda nasadne na reťazec podľa komplementarity. Taktiež nasadnú primery a dochádza k elongácii a k postupnému vychylovaniu sondy pomocou exonukleázovej aktivity. Reportér a zhášač sa od seba oddelia, čo umožní zvýšenie emisie fotónou. Najznámejšou hydrolyzačnou prôbou je TaqMan[®] je znázornený na obr. č. 3 (Wong & Medrano, 2005).

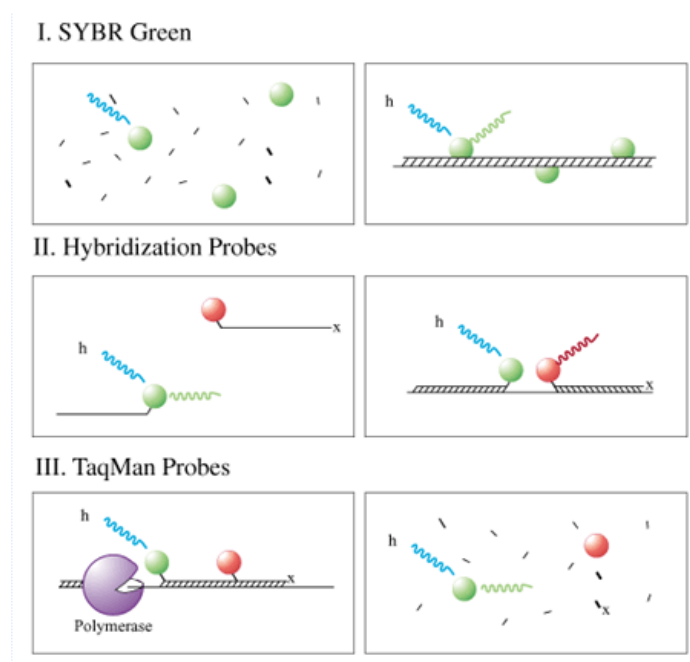
Hybridizačné sondy

Značenie vlákna je trochu odlišné ako v prípade hydrolyzačných sond, na DNA nasadajú dve značené sondy. Prvý oligonukleotid je značený fluoroforom na 3' konci to je takzvaný donor. Akceptor je na 5' konci značený fluoroforom a je fosforylovaný na 3' konci, aby nedošlo k ich predlžovaniu. Tento prenos energie zvaný aj FRET prenos má za následok emitáciu fluoroforu o vlnovej dĺžke špecifickej pre fluorofor akceptoru (Biogene). Fluorescencia je vyžarovaná hybridizáciou sondy na teplát, môže sa merať

v priebehu anelácie alebo pri elongačnej fáze. Potom ako donor prijme energiu zo sveteleného zdroja dostáva sa do excitačného stavu. Aby sa vrátil opäť do svojho základného štádia emituje fluorescenčné žiarenie. Emitované žiarenie z donora môže byť prevedené na akceptor, kde dochádza opäť k excitácii, má nižšiu energiu a frekvenciu a dlhšiu vlnovú dĺžku ako na začiatku prijaté žiarenie. Fluorescencia sa postupne znižuje so zvyšujúcou sa teplotou topenia (Wong & Medrano, 2005). Medzi najznámejšie hybridizačné próby patrí molecular beacons alebo FRET sondy.

Molecular beacons je próba zložená zo slučky kde sa nachádza sekvencia komplementárna k cieľovej sekvencii. Konce tejto slučky sú komplementárne k sebe a na jednom sa nachádza fluorofor a na druhom zhášač (Bonnet, *et al.* 1999).

Odlišným typom prôb sú scorpions sondy kombinujú v sebe primer a sondu. Na 5'konci sa nachádza fluorofor nasleduje štruktúra podobná sonde molecular beacons, slučka komplementárna k cieľovej sekvencii, zhášač a na 3' konci primer (Wong & Medrano, 2005).



Obr. č. 3 SYBR Green I a TaqMan a hybridizačné próby a ich odlišná aktivita značenia pri real-time PCR (Gene-quantification)

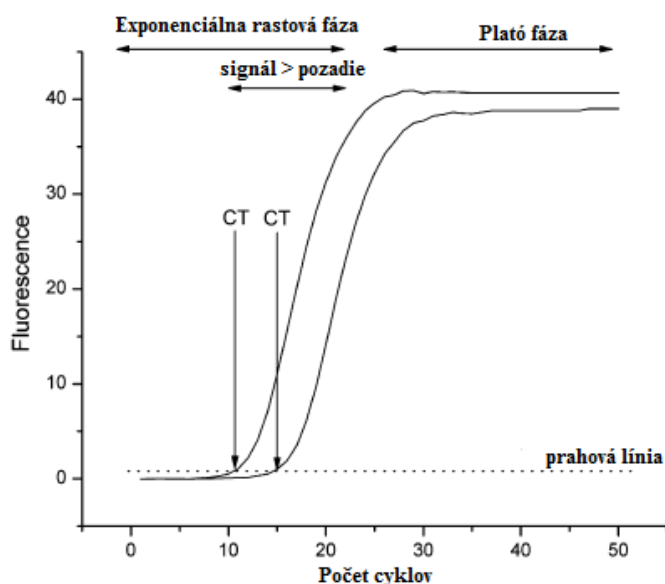
HRM – High resolution melting

HRM je modifikácia real-time PCR. K reakcii dochádza v homogénnom a uzavretom priestore. Umožňuje analýzu krátkych amplikónov s rôznymi mutáciami.

Analýza o krivke a priebehu teploty topenia je pri denaturácii omnoho podrobnejšia a s väčšou informačnou hodnotou. Vzorky sú odlišované podľa dĺžky, sekvencie alebo obsahu GC báz. Ľahko identifikovať sa dá aj zmena jednej bázy. Pri HRM metóde sa využívajú klasické farbivá ako EvaGreen, SYTO9 atď. Môžu sa využívať aj fluorescenčne značené sondy ako TaqMan[®] alebo FRET sondy (Gene-quantification).

1.8.6.5 *Priebeh krivky*

Pozostáva zo štyroch fáz, je znázornená v obr. č. 4. Zo začiatku reakcie sa emisia fluorescence nezvyšuje a preto prvých 10-15 cyklov je krivka vo fázi lineárnej. V začiatkovej exponenciálnej fáze sa fluorescencia dvíha nad hodnotu pozadia (background). V tejto fáze sa zbiera aj hodnota Ct - treshold cycle, používa sa na vyhodnotenie výsledkov. V lineárnej log fáze dochádza ku optimálnej amplifikácii a k zdvojnásobeniu produktu v každom cykle. Nakoniec plató fáza, kde dochádza k ubúdaniu jednotlivých zložiek a hodnota fluorescence už nie je potrebná pre hodnotenie experimentu (Wong&Medrano, 2005).



Obr. č. 4 Priebeh krivky pri real-time PCR

1.8.6.6 Kvantifikácia qPCR

Kvantifikovať produkt PCR je možné dvoma metódami, absolútna kvantifikácia alebo relatívna kvantifikácia.

Absolútna kvantifikácia

Kvantifikácia je nutná pre určenie množstva neznámej vzorky. Meraním hodnoty Ct a použitím štandardnej krivky dokážeme stanoviť množstvo začiatočných kópií. Plazmid sa využíva ako druh „známej vzorky“ teda štandardu. Pomocou riedenia počiatočnej hodnoty si dokážeme vytvoriť štandardnú krivku. Ako štandard sa môžu využívať aj syntetické jedno-reťazcové vlákna alebo genómová DNA, ktoré predstavujú jednoduchšiu možnosť v porovnaní s plazmidom. Štandard v podobe plazmidovej alebo genómovej DNA má výhodu v stabilite a rezistencii voči nešpecifickému štiepeniu. Výhoda syntetického DNA vlákna je v tom, že má definovanú koncentráciu a dĺžku. Správnym meraním a výpočtom z kalibračnej krivky je možné vypočítať množstvo kópií templátu v neznámej vzorke, nie je to však absolútne číslo kópií (Arya, *et al.* 2005).

Relatívna kvantifikácia

Touto metódou sa znižuje potreba vytvárať štandardné krivky alebo matematické rovnice používané pre relatívny výpočet hladiny expície cieľovej vzorky v porovnaní s kontrolou alebo kalibrátorom. Množstvo cieľovej vzorky je optimalizované na hodnotu housekeeping génu a expícia génu v neznámej vzorke je pomocou tejto rovnice normalizovaná. Expícia housekeeping génu je konštantná pri rôznych tkanivách a podmienkach experimentov. Najvhodnejšie interné kontroly pre real-time PCR sú GAPDH, β -aktín, β_2 mikroglobulín a rRNA (Arya, *et al.* 2005).

Najčastejšie používanou rovnicou pre optimalizáciu je tzv. delta delta metóda. Existujú matematické modely s korekciou alebo bez korekcie.

Model bez korekcie

$$\text{Pomer expície} = 2^{\Delta C_t \text{ TG(kontrola- vzorka)}} / 2^{\Delta C_t \text{ RG(kontrola- vzorka)}} = 2^{(\Delta C_t \text{ TG} - \Delta C_t \text{ RG})} = 2^{\Delta \Delta C_t}$$

S korekciou efektivity

$$\text{Pomer expície} = (E_{\text{TG}})^{\Delta C_t \text{ TG(kontrola-vzorka)}} / (E_{\text{RG}})^{\Delta C_t \text{ RG(kontrola- vzorka)}}$$

E - Efektivita

Ct - Treshold cycle

RG - Referenčný gén

TG - Cieľový gén

(Libra, 2015/2016)

Najdôležitejšie kroky v navrhovaní a hodnotení experimentu spočívajú vo:

- výbere správneho interného kontrolného génu,
- validácii internej kontroly z dôvodu, že kontrola nebude ovplyvňovaná spracovaním počas experimentu,
- vykonávaní riedenia cieľovej vzorky a aj internej kontroly, k zabezpečeniu rovnakej efektívnosti.

Štatistické údaje by sa mali spracovať do formy 2^{-Ct} , nemali by byť udávané ako samotná hodnota Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

2 Zadanie diplomovej práce, cieľ práce

Cieľom diplomovej práce bolo dokázať zmeny, ktoré nastali na primárnej kultúre HUVECs po pôsobení solubilného endoglínu, pomocou markerov dysfunkcie endotelu.

3 Experimentálna časť

3.4 Chemikálie

V experimente sme používali rekombinantný ľudský endogln získaný z R&D system (Minneapolis, MN, USA) nariadený na koncentráciu 250 μ l/ml. Na kultiváciu buniek sme použili chemikálie od firmy Sigma – Aldrich (Saint Louis, MO, USA) a Lonza (Basel, Switzerland). Chemikálie potrebné na izoláciu, prepis a samotnú qPCR sme získali od firiem Sigma – Aldrich (Saint Louis, MO, USA), P-LAB (Praha, Česká republika) a ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA).

3.5 HUVEC

Na zistenie pôsobenia solubilného endoglnu na dysfunkciu endotelu bola vybraná primárna bunková kultúra HUVECs- ľudské endotelové bunky z pupočníkovej žily získaná od spoločnosti Lonza (Basel, Switzerland). Bunky boli odobrané od troch darcov. Na kultiváciu buniek sme používali základné endotelové médium 2 – EBM-2 zo spoločnosti Lonza (Basel, Switzerland). Ako suplement k médiu sa používal EGM-2 SingleQuotKit od Lonza (Basel, Switzerland). V médiu bol prídavok 10% FBS od Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Kultivačné misky boli potiahnuté 0,1% želatínou od Sigma – Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Bunky boli uchovávané v inkubátore pri 37°C a 5% atmosféry oxidu uhličitého. Pre experimenty boli použité bunky v pasáži 5-9.

3.6 Design pokusu

Bunková kultúra bola ošetrená solubilným endoglnom v dvoch koncentráciách. Zvolené koncentrácie boli 1nM - 50 ng/ml a 10nM - 500ng/ml teda 10x až 100x vyššie než je koncentrácia fyziologická. Časová závislosť medzi jednotlivými koncentraciami bola 3 hodiny a 16 hodín. Celý pokus sa opakoval štyri krát.

3.7 qPCR

RNA pre qPCR bola získaná za použitia TriReagent-u od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Izoláciu sme vykonávali fenol-chloroformovou metódou,

ostatné chemikálie boli zakúpené od firiem P-LAB (Praha, Česká republika) a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Čistotu a koncentráciu RNA sme si overovali na prístroji zvanom Nanophotometer[®] Classic od firmy Implen (Munich, Germany). Spektrofotometricky sme stanovovali pomer 260/280 čo nám dokazuje znečistenie proteínmi a pomer 260/230 nám dokazuje znečistenie organickými rozpúšťadlami. Na základe vyhodnotenia pomerov boli naše vzorky čisté.

Na prepis RNA sme použili High capacity cDNA reverse transcription kit od ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA), objem jednotlivých reagensii je zapísaný v Tab.1. K 10 μ l vzorky sa pridávalo 10 μ l RT- Master mix-u. Na transkripciu sme použili T100[™] Thermal Cycler od firmy Bio-Rad (Vienna, Austria).

Tab.č. 1 Zloženie reakčnej zmesi na prepis mRNA

RT-Master mix	1 vzorka (μl)
10x RT-Buffer	2
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
10x RT Random Primer	2
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
Nuclease-free water	4,2
Reakcia	10

Z prepisu sme získali teplátovú cDNA s koncentráciou 50ng/ μ l. Pre potrebu real-time PCR si potrebujeme vzorku nariediť na koncentráciu 5ng/ μ l. Na reakciu sme použili komerčne predávanú zmes TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix od firmy ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Vzorky sa aplikujú do 96- jamkovej platničky v duplikátoch. Primery použité pri expresii génov sú znázornené v tab.2 od spoločnosti ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) ako referenčný gén sme použili *GAPDH*. Na real-time PCR reakciu sme použili prístroj zvaný QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System od firmy ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Tab.č 2 Primery použité pre real-time PCR ThermoFisher Scientific
(Waltham,MA,USA)

Gén	Proteín	Katalógové číslo
<i>CDH5</i>	Cadherin 5	Hs00901465_m1
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin- endoperoxidase syntáza 2	Hs00153133_m1
<i>NOS3</i>	NO syntáza	Hs00167166_m1
<i>VEGF</i>	Cievny endoteliálny rastový faktor	Hs00900055_m1
<i>ICAM1</i>	Intracelulárna adhézna molekula 1	Hs00164932_m1
<i>VCAM1</i>	Cievna bunčná adhézna molekula 1	Hs01003372_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	Hs02786624_g1

3.8 Štatistická analýza

Výsledky boli spracované za použitia GraphPad Prism 6 software (San Diego, California) podľa neparametrického Dunnova testu. Vyjadrenie výsledkov bolo spracované podľa priemeru \pm SEM (stredná chyba priemeru). Za štatisticky významnú hodnotu je považovaná $p < 0,05$.

3.9. Výsledky

3.9.1 qPCR

Hodnoty expresie jednotlivých markerov dysfunkcie endotelu sme spracovávali za pomoci metódy real-time PCR. Sledovali sme zmeny expresie na génoch *NOS3*, *CDH5*, *PTGS2*, *VEGF*, *ICAM1*, *VCAM1*. Pozorovali sme rozdiely medzi kontrolou a oboma koncentráciami a taktiež medzi koncentráciami navzájom.

K štatisticky opodstatnenému zvýšeniu expresie v úrovni génov po 3 hodinovom ošetrení sEng došlo pri markere *VCAM1*- koncentrácia 10nM (oproti koncentrácii 1nM), (obr. č. 10). Po 16 hodinovom ošetrení sEng boli zvýšené expresie génov pri *ICAM1*-koncentrácia 10nM (oproti kontrole aj koncentrácii 1nM) (obr.č. 9), *VCAM1*-koncentrácia 10nM (oproti kontrole) a taktiež pri *PTGS2*- koncentrácia 10nM (oproti kontrole) (obr.č. 7).

K štatisticky významnému zníženiu expresie mRNA po 3 hodinovom ošetrení buniek sEng došlo pri markeroch *ICAM1*- koncentrácia 1nM (oproti kontrole) a *VCAM1* - koncentrácia 1nM (oproti kontrole). Pri 16 hodinovom ošetrení buniek sEng došlo k zníženiu expresie pri markeroch *CDH5*- koncentrácia 10nM (oproti kontrole) (obr.č. 6).

Štatisticky nevýznamné zmeny z pohľadu p hodnoty boli pri expresii génov *NOS3* (obr.č. 5), *VEGF* (obr.č. 8).

Tab.č.3 Percentuálne údaje z expresie génov po 3 hodinovom ošetrení sEng kvantifikáciou $\Delta\Delta C_t$ metódou

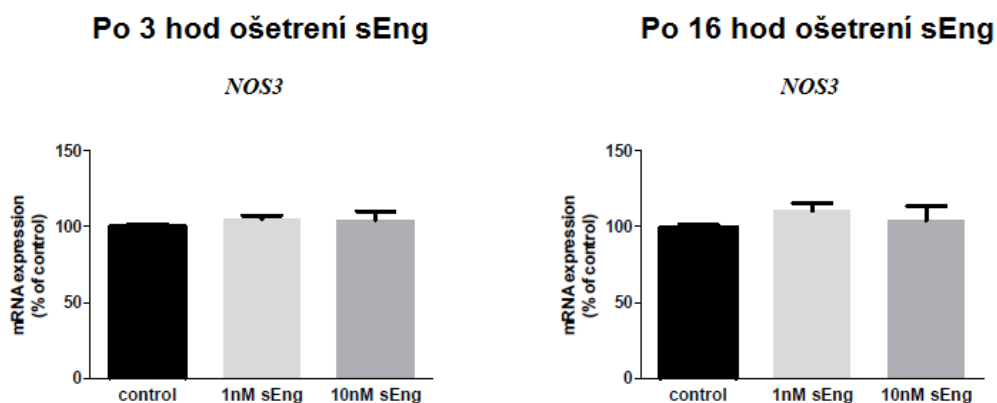
Cieľový gén	Kontrola	sEng – 1 nM	sEng – 10nM
<i>NOS3</i>	100 ± 1,948	105,6 ± 1,769	104,6 ± 5,418
<i>VEGF</i>	99,98 ± 1,439	100,2 ± 2	94,19 ± 3,832
<i>CDH5</i>	100 ± 4,139	91,63 ± 2,32	96,56 ± 4,717
<i>ICAM1</i>	100 ± 1,107	80,43 ± 2,4	107,9 ± 13,24
<i>VCAM1</i>	99,99 ± 1,824	85,6 ± 2,837	132,3 ± 18,13
<i>PTGS2</i>	100 ± 1,105	94,09 ± 4,04	86,87 ± 8,085

Hodnoty sú vyjadrené ako priemery percent ± stredná chyba priemeru (SEM).

Tab.č.4 Percentuálne údaje z expresie génov po **16 hodinovom ošetrení** sEng kvantifikáciou $\Delta\Delta C_t$ metódou

Cieľový gén	Kontrola	sEng - 1 nM	sEng - 10nM
<i>NOS3</i>	99,99 ± 1,141	110,9 ± 4,517	104,5 ± 9,054
<i>VEGF</i>	99,98 ± 1,978	107,2 ± 8,143	124,4 ± 7,746
<i>CDH5</i>	100 ± 1,361	91,61 ± 3,642	79,11 ± 3,966
<i>ICAM1</i>	100 ± 1,168	103,5 ± 7,923	181,2 ± 12,48
<i>VCAM1</i>	100 ± 2,383	99,41 ± 3,435	163 ± 19,43
<i>PTGS2</i>	100 ± 1,614	116,2 ± 3,06	135,9 ± 8,508

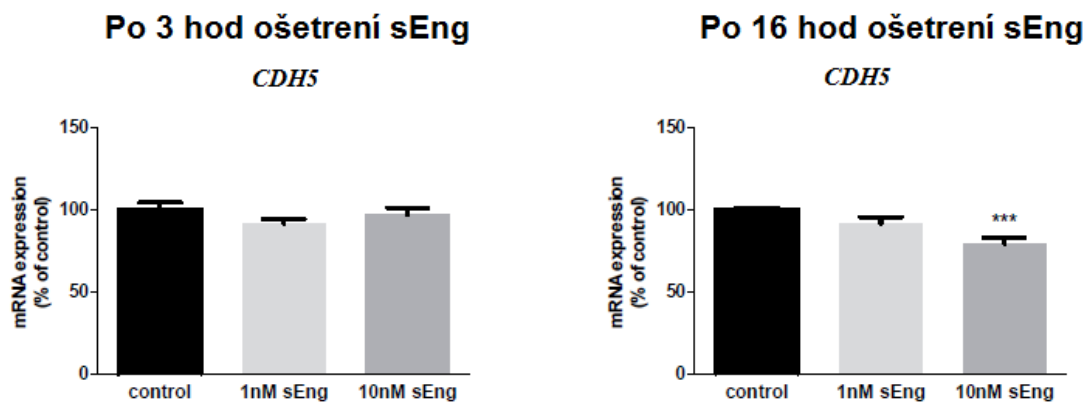
Hodnoty sú vyjadrené ako priemery percent ± stredná chyba priemeru (SEM).



* porovnanie ku kontrole

† porovnanie 1nM ku 10nM

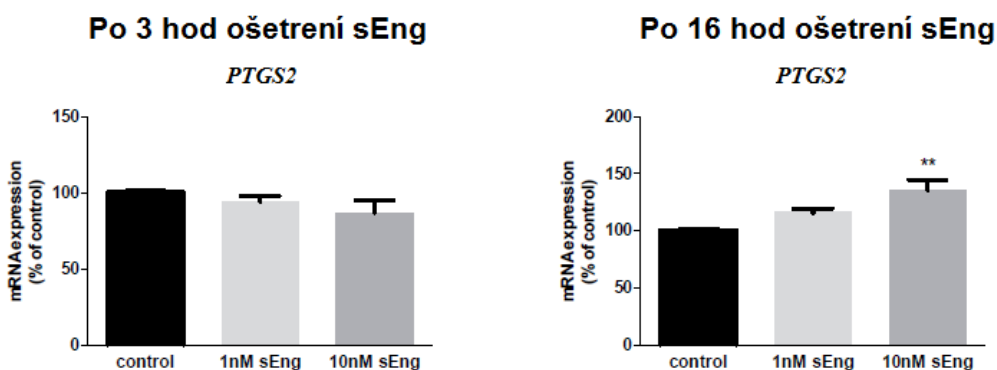
Obr.č. 5 Grafické znázornenie mRNA expresie výsledkov na marker *NOS3*



* porovnanie ku kontrole

† porovnanie 1nM ku 10nM

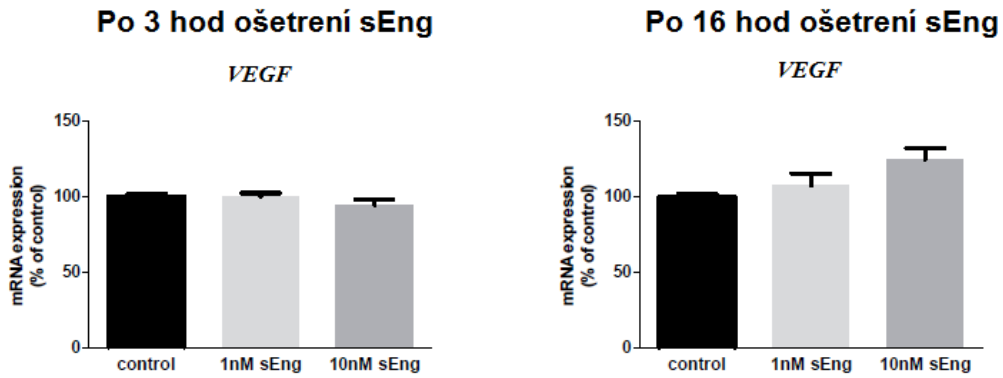
Obr. č. 6 Grafické znázornenie mRNA expsie výsledkov na markere *CDH5*



* porovnanie ku kontrole

† porovnanie 1nM ku 10nM

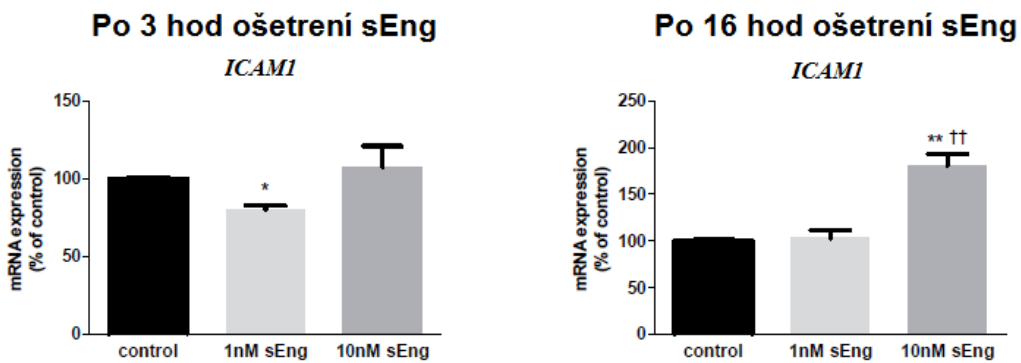
Obr. č. 7 Grafické znázornenie mRNA expsie výsledkov na markere *PTGS2*



* porovnanie ku kontrole

† porovnanie 1nM ku 10nM

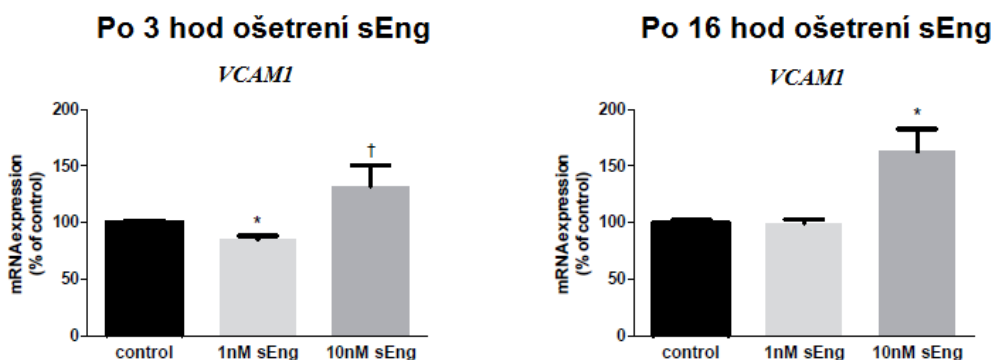
Obr. č. 8 Grafické znázornenie mRNA expsie výsledkov na markere *VEGF*



* porovnanie ku kontrole

† porovnanie 1nM ku 10nM

Obr. č. 9 Grafické znázornenie mRNA expsie výsledkov na markere *ICAMI*



* porovnanie ku kontrole

† porovnanie 1nM ku 10nM

Obr. č. 10 Grafické znázornenie mRNA expsie výsledkov na markere *VCAMI*

4. Diskusia

Endoglin je jedným z dôležitých glykoproteínov exprimovaných na ľudských endotelových bunkách. Je exprimovaný ako povrchový koreceptor signalizačnej dráhy TGF β . Endoglin bol klasifikovaný ako endotelový marker CD105 (Gougos & Letarte, 1988). Jeho úloha spočíva v kardiovaskulárnom vývoji. Je vysoko exprimovaný na endotelových bunkách a nachádza sa na povrchu syncytiotrophoblastu počas tehotenstva (McAllister, *et al.* 1994). Optimalizuje aktiváciu NO syntázy a vazomotorický tonus (Gregory, *et al.* 2014).

Endoglin je v organizme štiepený metaloproteinázou MMP-14 zakotvenou v membráne a do cirkulácie je uvoľnená solubilná forma endoglinu (sEng). Silnou afinitou sa viaže k BMP9 dráhe, čím stimuluje endotel a tým uvoľňovanie vazokonstriktoru endothelínu-1. Vysoké koncentrácie blokujú eNOS dependentnú vazodilatáciu. Zvýšené množstva sEng v sére boli zaznamenané pri pacientkach s preeklampsiou, dochádza tu k určitej nerovnováhe medzi antiangiogénnymi (patrí sem sEng) a proangiogénnymi faktormi (Gregory, *et al.* 2014, Venkatescha, *et al.* 2006).

Signifikantne zvýšené hodnoty sEng sú pozorované pri dysfunkcii endotelu, zmenách na retine, hypertrofii ľavej komory, zvýšenej hodnote glukózy v krvi pri pacientoch s hypertenziou a diabetes mellitus (Blázquez-Medela, *et al.* 2010). Solubilný endoglin je zodpovedný za zvýšenie cievnej permeability čo poukazuje na zhoršenie kondície endotelu (Venkatescha, *et al.* 2006).

V našej práci sme sa zamerali na efekt solubilného endoglinu na bunky *in vitro*. Podobnou problematikou sa zaoberali aj nasledujúce práce, ich štúdie boli vykonávané na modeloch myší. Pri transgénných myšiach so zvýšenou hladinou sEng nedošlo k zmene expresie eNOS, Eng, VCAM-1 a ICAM-1 na endotele aorty. Výsledok sa nezhoduje z názorom, že by solubilný endoglin dokázal sám spustiť dysfunkciu endotelu (Nemecková, *et al.* 2015).

Po podaní vysokotukovej diéty transgénnym myšiam s vysokou hladinou solubilného endoglinu naopak došlo k zmene expresie markerov zápalu a oxidačného stresu v aorte myší (Jezkova, *et al.* 2016).

V našej experimentálnej časti sme použili primárnu kultúru ľudských endotelových buniek získaných z pupočníkovej žily – HUVEC. Je nutné podotknúť, že vlastnosti HUVECs nie sú reprezentatívne pre všetky metabolické kapacity a odpovede vo fyziopatológii a toxicite v súvislosti s odlišným typom endotélii v organizme. Ich

využitie je pri výskumoch všeobecných vlastností ľudských endotélii (Baudin, *et al.* 2007).

Bunky boli ošetrované solubilným endoglínom v dvoch koncentráciách. Jednotlivé koncentrácie boli stanovené na základe *in vitro* publikácii (Venkatescha, *et al.* 2006). Použili sme koncentrácie 1nM a 10nM, ktoré predstavujú extrémne podmienky pre bunky. Výsledky jednotlivých koncentrácií sme porovnávali medzi sebou a s kontrolou. Časová závislosť bola stanovená na 3 a 16 hodín. V práci sme stanovovali expresiu génov zápalových markerov pomocou metódy real-time PCR. Markery boli vybrané podľa toho, ako odrážajú úlohu a stav endotelu.

Ako relaxačný faktor v cievach sa považuje NO. Jeho tvorba v endotely spočíva v expresii génu *NOS3*. Tento marker v primárnej kultúre nemal zvýšenú hodnotu expresie. Ďalším markerom, pri ktorom nenastali zmeny v transkripcii je vaskulárny endotelový rastový faktor. Tento výsledok je zrejme spôsobený tým, že solubilný endoglín v daných koncentráciách nevyplýva na vazodilatáciu dependentnú na NO, ako to bolo zistené v práci Nemeckovej *et al.*, kde po vykonaní metódy western blot nedošlo k zmene expresie finálneho produktu génu *NOS3*.

Endotelovú dysfunkciu sprevádzajú fenotypové prejavy ako sú napríklad poškodenie bariérovej funkcie alebo zvýšenie bunkových adhézných molekúl (Bonetti, *et al.* 2003).

Pomocou nášho experimentu sa podarilo dosvedčiť tieto tvrdenia, pozitívny efekt vzhľadom na odlišnú expresiu bol dosiahnutý pri týchto markeroch. Pri koncentrácii 10nM solubilného endoglínu oproti kontrolnej skupine je pozorovaná znížená transkripcia markeru cievneho endotelového cadherínu. Cadherín je zodpovedný za intracelulárne spoje, nesúdržnosť pri zníženej expresii môže znamenať zvýšenú permeabilitu endotelu cievy (RefSeq Gene, 2016).

Po 16hodinovom ošetrovaní solubilným endoglínom o koncentrácii 10nM sa transkripcia markerov *VCAM1* a *ICAM1* zvýšila. Extrémne podmienky sú pravdepodobne zodpovedné za signifikantný nárast. Zvýšenie adhezívnych molekúl môže dopomôcť vo vývoji aterosklerózy. V prípade štúdie Jezkovej *et al.* sa potvrdil zhodný výsledok účinku solubilného endoglínu na funkciu endotelu, teda došlo k zvýšeniu expresie adhézných molekúl pri transgénnych myšiach s vysokotukovou diétou. V práci Walshe *et al.* došlo k zvýšeniu solubilnej formy cievnej adhéznej molekuly 1 po podaní adenovírusu uvoľňujúceho solubilný endoglín, autori indikujú zvýšenie hladín povrchových adhézných molekúl a narušenie endotelovej funkcie.

K markerom zápalu patrí aj molekula cyklooxygenázy-2, ktorú kóduje gén *PTGS2*. Je stimulovaný ako odpoveď na zápalové a mitogénne podnety (Cerebrián *et al.* 2017). V klinickej štúdií Flórez *et al.* sa dokázalo, že produkty COX-2 prispievajú k rozvoju zápalového štádia a dysfunkcie endotelu u pacientov s ochorením periférnych artérií. Na zvieracích modeloch s experimentálne vyvolaným ochorením diabetes mellitus, bola dokázaná súvislosť veku so zvýšenou tvorbou cyklooxygenázy 2 a produkciou vazokonstričných prostanoïdov (Ramos-Alves, *et al.* 2012). V našom experimente sa po 16hodinovom ošetroení buniek HUVEC solubilným endoglinom o koncentrácii 10nM, hodnota cyklooxygenázy 2 zvýšila oproti kontrolnej skupine, čo by mohlo naznačovať iniciáciu zápalového procesu.

Po výslednom zhodnotení a porovnaní markerov a ich odlišných hodnôt na *in vitro* modely endotelu sa dá povedať, že solubilný endoglin pravdepodobne ovplyvňuje transkripciu markerov zápalu, čo sa nám podarilo dosvedčiť na základe zvýšenia expresie génov *VCAM1*, *ICAM1* a *PTGS2*.

5. Záver

V diplomovej práci sme zistovali pôsobenie solubilného endoglinu na endotelové bunky *in vitro* na primárnej kultúre HUVEC. Sledovali sme zmenu transkripcie niektorých vybraných markerov endotelovej funkcie.

Dysfunkciu endotelu sa dá považovať za iniciálne štádium aterosklerózy a je snahou nedospieť do tohto štádia. Na základe výsledkov z experimentálnej časti, by mohol solubilný endoglin prispievať k endotelovej dysfunkcii. Poukazujú na to zvýšené hodnoty expresie adhézných molekúl ako ukazovateľov vývoja aterosklerózy. Zvýšené hodnoty sme zaznamenali aj pri markere zápalu cyklooxygenáza2.

K záveru sa dá skonštatovať negatívny účinok solubilného endoglinu na endotelové bunky *in vitro*. Toto tvrdenie je založené na experimente so šiestimi markermi a ich zvýšenie sa týkalo 16 hodinového ošetrenia solubilným endoglinom o koncentrácii 10 nM, táto hodnota a časová závislosť je veľmi vysoká a s neistotou odráža vplyv na dysfunkciu endotelu. Je nutné preveriť ďalšie možnosti štúdia dysfunkcie endotelu. Z hľadiska rozboru na proteínoch napríklad pomocou proteomickej analýzy alebo analýzou protilátok ako napríklad metódou ELISA alebo western blot. Poprípade vyskúšať pôsobenie solubilného endoglinu na rôzne druhy bunkových modelov.

6. Zoznam použitých skratiek

ai.	a iné
ALK	kináza podobná receptoru pre aktivín
AMV	vírus vtácej myeloblastózy
BMP	kostný morfogenetický proteín
C	cytozín
CCL	chemokín s C-C motívom
CDH	cadherín
cDNA	komplementárna DNA
COX	cyklooxygenáza
Ct	cycle of treshold
CYBA	cytochróm B-245 α reťazec
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
Eng	endoglin
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
FRET	fluorescenčný rezonančný prenos energie
G	guanín
GAPDH	glyceraldehyd trifosfát dehydrogenáza
GTP	guanozín trifosfát
HHT	hereditárna hemoragická telangiektázia
HIF	faktor indukujúci hypoxiu
HMOX	hem oxigenáza
HRM	hight resolution melting analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením
HUVEC	ľudské endotelové bunky z pupočníkovej žily
ICAM	intracelulárna adhézna molekula
IP3	inozitol trifosfát
JNK	c-Jun N-terminálna kináza
kb	kilo báza
LDL	lipoproteín nízkej hustoty

M-, MuLV, MMLV	Moloneyho vírus myšacej leukémie
MAP kináza	mitogénom aktivované proteínkinázy
MMP-14	metaloproteináza 14
mRNA	mediátorová RNA
NADPH	nikotínamid adenín dinukleotid fosfát
NF- κ B	nukleárny faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
<i>NOS3</i>	endotelová syntáza oxidu dusnatého
NOX	NADPH oxidáza
PAI-1	plasminogén aktivátor inhibítor 1
PCR	polymerázová reťazová reakcia
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>PTGS2</i>	prostaglandín- endoperoxid syntetáza 2
PWV	rýchlosť pulznej vlny
qPCR	kvantitatívna PCR
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktívne formy dusíka
ROS	reaktívne formy kyslíka
rRNA	ribozómová RNA
RT-PCR	PCR reverzná transkriptáza
sEng	solubilný endoglin
sFlt1	solubilná forma receptoru 1 VEGF
siRNA	small interfering RNA
SMAD	transkripčné faktory
SPR	povrchová plazmová rezonancia
T	tymín
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF β	transformačný rastový faktor β
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
VCAM	cievna adhezívna molekula
VEGF	vaskulárny endotelový rastový faktor

7. Použitá literatura

1. ACHUTHAN, V. - DESTEFANO, J.J. Alternative divalent cations (Zn^{2+} , Co^{2+} , and Mn^{2+}) are not mutagenic at conditions optimal for HIV-1 reverse transcriptase activity. *BMC Biochemistry*, 2015, vol. 16, no.12, p. 1-14.
2. AKARASEREENONT, P. *et al.* The expression of COX-2 in VEGF- treated endothelial cells on mediated through protein tyrosine kinase. *Mediators of inflammation*, 2002, vol. 11, no.1, p.17-22.
3. ARYA, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 2005, vol.5, no. 2 , p. 1-11.
4. BASU, A. - CHATURVEDI, C.U. Vaskular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS immunology & medical microbiology*, 2008, vol. 53, no. 3, p. 287-299.
5. BAUDIN, B. *et al.* A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature protocols*, 2007, vol. 2, no. 3, p. 481-485.
6. BEESE, M. *et al.* Effect of cAMP derivatives on assembly and maintenance of tight junctions in human umbilical vein endothelial cells. *BMC cell biology*, 2010, vol.11, no.68, p. 1-14.
7. BERG, J. N. *et al.* The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Circulation*, 1997, vol. 61, no. 1, p. 60-67.
8. BIOGENE. *Hybridization probes* [online]. [cit. 20.2.2017]. Dostupné na: <http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Analysis/Application/Hybridisation_Probes.htm#top>
9. BLAHA, M. *et al.* Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2008, vol. 197, no. 1, p. 264-270.
10. BLAZQUEZ-MEDELA, M. A. *et al.* Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC medicine*, 2010, vol. 8, no. 86, p. 1-12.
11. BONETTI, P.O. - LERMAN, L.O. - LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003, vol. 23, no.2, p. 168-175.

12. BONNET, G. *et al.* Thermodynamic basic of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proceedings of the national academy of science*, 1999, vol. 25, no. 96, p. 6171-6176.
13. BREKKEN, R.A. *et al.* Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium. *Cancer reaserch*, 1998, vol. 58, no. 9, p. 1952-1959.
14. CALABRO, L. *et al.* Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *Journal of cellular physiology*, 2003, vol. 194, no. 2, p. 171-175.
15. CASTILLO, G. *et al.* Soluble endoglin antagonizes Met signaling in spindle carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 2015 vol. 36, no. 2, p. 212- 222.
16. CASTONGUAY, R. *et al.* Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *The journal of biological chemistry*, 2011, vol. 286, no.34, p. 30 034-30 046.
17. CEREBRIAN, A. *et al.* Functional PTGS2 polymorphism- based models as novel predictive markers in metastatic renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitib. *Scientific reports*, 2017, vol. 7, no. 41371, p. 1-10.
18. COOK-MILLS, J.M. - MARCHESE, M.E. - ABDALA-VALENCIA, H. Vascular cell adhesion molecule -1expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling*, 2011, vol.15, no. 6, p. 1607-1638.
19. DOBIAS, L - LASSANOVA, M. - KRISTOVA, V. Hypolipidemiká a ich vplyv na funkciu endotelu: prehľad výsledkou klinických štúdií. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2016, vol. 30, no. 2, p. 38-45.
20. DHARMASHANKAR, K. – WIDLANSKY, M.E. Vaskular endothelial function and hypertension: Insights and directions. *Current hypertension reports*, 2010, vol.12, no.6, p. 448-455.
21. EUROSTAT. *Causes of death – deaths by country of residence and occurrence* [online]. Vystavené 31.1.2017 [cit. 6.3.2017]. Dostupné na: <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=hlth_cd_aro&lang=en>
22. FELETOU, M. *The endothelium Part. 1.* edition. United States: Morgan Claypool Publishers. 2011. 294 p, ISBN 1615041230.
23. FLEMING, W.H. Endothelial cell – specific marker: going...going...gone. *Blood*, 2005, vol. 106, no. 3, p. 763.

24. FLOREZ, A. *et al.* selective cyclooxygenase-2 inhibition reduce endothelial dysfunction and improves inflammatory status in patients with intermittent claudication. *Revista española de cardiología*, 2009, vol. 62, no.8, p. 851-857.
25. FRANCES, J.W. *et al.* Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *International journal of cancer*, 2013, vol. 133, no. 6, p. 1334-1345.
26. FRIES, J.W. *et al.* Expression of VCAM-1 and E-selectin in an *in vivo* model of endothelial activation. *The American journal of pathology*, 1993, vol.143, no. 3, p.725-737.
27. GENECARDS. *NOS3 Gene* [online]. Vystavené : 1.10.2016 [cit. 20.2.2017]. Dostupné na: < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS3>>
28. GENECARDS. *NOX4 Gene* [online]. Vystavené :1.1.2009 [cit. 20.2.2017]. dostupné na: < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOX4>>
29. GENE-QUANTIFICATION. *Dyes & fluorescence detection chemistry in qPCR*. [online]. [cit. 20.2.2017]. Dostupné na: <<http://dyes.gene-quantification.info/>>
30. GOUGOS, A. - LETARTE, M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre- B leukemic cell line. *The journal of immunology*, 1988, vol. 141, no. 6, p. 1925- 1933.
31. GREGORY, A.L. *et al.* Review: The enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*, 2014, vol. 28, p.93-99.
32. GUPTA, S.K. *et al.* Chemokine receptors in human endothelial cell. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *The journal of biological chemistry*, 1998 ,vol. 273, no. 7, p.4282–4287.
33. HADI, H.A. - CARR, C.S. - AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy and outcome. *Vaskular health and risk management*, 2005, vol.1, no.3, p. 183-198.
34. HAWINKELS, L.J. *et al.* Matrix metalloproteinase - 14(MT1-MMP)- mediated endolin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer research*, 2010, vol. 70, no.10, p. 4141-4150.
35. HIGASHI, Y. *et al.* Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation journal*, 2009, vol.73, no.3, p. 411-418.

36. HORBELT, D. - DENKIS, A. - KNAUS, P. A portrait of transforming growth factor β superfamily signalling: Background matters. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2012, vol. 44, no.3, p.469-474.
37. HULIN, I. *et al.* *Patofyziológia a klinická fyziológia*. 1. edition. Bratislava: Slovak academic press, 2005. 593 p. ISBN 80 89104 66 5.
38. CHEN, Y.G. *et al.* Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes development*, 1998, vol. 12, no. 14, p. 2144-2152.
39. JAFFE, E.A. *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *The journal of clinical investigation*, 1973, vol. 52, no. 11, p.2745-2756.
40. JANSSENS, S. P. *et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *The journal of biological chemistry*, 1992, vol. 267, no. 21, p.14519- 14522.
41. JEZKOVA, K. *et al.* High levels of soluble endoglin induce pro-inflammatory and oxidative stress phenotype associated with preserved NO-dependent vasodilatation in aorta from mice fed high fat diet. *Journal of vascular research*, 2016, vol. 53, no. 3-4, p. 149-162.
42. KIM, S.F. - HURI, D.A. - SNYDER, S.H. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates and activates cyclooxygenase-2. *Science*, 2005, vol.310, no. 5756, p. 1966-1970.
43. KUBISTA, M. *et al.* The real- time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 2006, vol. 27, no. 2-3, p. 95-125.
44. KUMAR, S. *et al.* Antibody- directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF β signaling. *Oncogene*, 2014, vol. 33, no. 30, p. 3970-3979.
45. LIBRA, A. Študijný materiál: Prednášky z molekulárnej biológie. *Kvantifikace génové exprese pomocí real-time PCR*. Univerzita Karlova v Prahe: Farmaceutická fakulta. Akademický rok: 2015/2016.
46. LIVAK, K.J. - SHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, vol.25, no.4, p. 402-408.
47. LORSCH, J. *Laboratory methods in enzymology: RNA*. 1 edition. Cambridge: Academic press, 2013. p. 472. ISBN 9780124200371.

48. LUKAS, J.A.C. *et al.* Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer research*, 2010, vol. 70, no. 10, p. 4141-4160.
49. MCALLISTER, K.A. *et al.* Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type I. *Nature genetics*, 1994, vol. 8, no.4, p.345-351.
50. MESCHER, L.A. *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*. 13. edition. New York: McGraw Hill Medical. 2013. 480 p. ISBN 0071780335.
51. MILLER, R.C.J. - ANDRE, R. Quantitative polymerase chain reaction . *British journal of hospital medicine*, 2014, vol. 75, no. 12, p. 188-192.
52. MONIS, P.T. - GIGLIO, S. - SAINT, C. P. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real- time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical biochemistry*, 2005, vol.340, no.1, p. 24-34.
53. MOUSTAKAS, A. - HELDIN, C.H. The regulation of TGF β signal transduction. *Development*, 2009, vol. 136, no. 22, p. 3699-3714.
54. MULLIS, K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 1990, vol. 262, no. 4., p. 56-65.
55. NACHTIGAL, P. *et al.* The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2012, vol.224, no. 1, p. 4-11.
56. NAVARRO, E. *et al.* Real- time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 2015, vol. 439, p. 231-250.
57. NCBI. *CYBA Cytochrom b-245 alpha chain*[online]. Vystavené: 1.7.2008 [cit. 20.2.2017]. Dostupné na: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1535>>
58. NEMECKOVA, I. *et al.* *High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta* [online]. Publikované 13.3.2015 [cit. 3.3.2017]. Dostupné na: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119665>>.
59. NOLAN, T. - HUGGET, J. - SANCHEZ, E. *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*. 1 edition Teddington : LGC, 2013. P.103.
60. OSBORN, L. *et al.* Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1 a cytokine- induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 1989, vol.59, no.6, p. 1203-1211.

61. OUJO, B. *et al.* Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Current molecular medicine*, 2013, vol. 13, no. 8, p. 1345-1357.
62. PARKOS, C. A. *et al.* Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America*, 1988, vol. 85, no. 10, p. 3319-3323.
63. PELT-VERKUIL, E. - BELKUM, A. - HAYS, J.P. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. 1 edition. Berlin: Springer science + business media, 2008. p. 330. ISBN 9048175798.
64. PFAFFL, M.W. *Quantification strategies in real-time PCR*[online]. Vystavené: 2004 [cit. 5.2.2017]. Dostupné na: <<http://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfafl.pdf>>
65. POBER, J.S. *et al.* Overlapping patterns of activating of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor and immune interferon. *The journal of immunology*, 1986, vol. 137, no. 6, p.1893-1896.
66. PRIMROSE, S.B. - TWYMAN, R. M. *Principle of gene manipulation and genomics*. 7. Edition. USA: Blackwell publishing, 2006. p. 644. ISBN 1405135441.
67. RAJENDRAN, P. *et al.* The vaskular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*, 2013, vol. 9, no. 10, p. 1057-1069.
68. RAMOS-ALVES, F.E., *et al.* Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *British journal of pharmacology*, 2012, vol. 166, no. 7, p. 2198-2208.
69. RAMPRASATH, T. *et al.* Potential risk modifications of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 (glutathione-S-transferases) variants and their association to CAD in patients with type-2 diabetes. *Biochemical biophysical research communications*, 2011, vol.407, no. 1, p. 49-53.
70. REFSEQ GENE. *RefSeq Gene CDH5* [online]. Vystavené: 23.5.2016 [Cit. 25.2.2017]. Dostupné na:<https://cgwb.nci.nih.gov/cgi-bin/hgc?hgsid=884528&g=refGene&i=NM_001795&c=chr16&o=66400524&l=66400524&r=66438689&db=hg19>
71. ROQUER, J. *et al.* Endothelial dysfunction, vascular disease and stroke: the ARTICO. *Cerebrovaskular diseases*, 2009, vol. 27, no. 1, p. 25-27.

72. SAHOO, B. *Polymerase chain reaction- Part 1 : principle, component, procedure and stages of PCR*. [online]. Vystavené: 6.7.2010 [cit. 20.2.2017]. Dostupné na: <<http://pharmaxchange.info/press/2011/07/polymerase-chain-reaction-part-i-principle-components-procedure-and-stages-of-pcr/>>.
73. SAUNDER, N.A. - LEE, M.A. *Real-time PCR advanced Technologies and applications*. 1 edition, Norfolk: Caister academic press, 2013. 284 p. ISBN 9781908230225.
74. SENA, M.C. - PEREIRA, M. A. - SEIÇA, R. Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, vol. 1823, no. 12, p. 2216-2231.
75. SHAFIQUE, S. *Polymerase chain reaction*. 1.edition. Shafique Shehnam, 2012, p. 82. ISBN 9781105728938.
76. SMITH, C. *SYBR Green and other real-time PCR dyes*. [online]. Vystavené 5.4.2010 [cit. 9.3.2017]. <<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/41766-SYBR-Green-and-Other-Real-Time-PCR-Dyes/>>
77. STAHLBERG, A. *et al.* quantitative PCR analysis of DNA, RNAs and proteins in the same single cell. *Clinical chemistry*, 2012, vol. 58, no. 12, p.1682-1691.
78. SMARDA, J. *et al.* *Metody molekulární biologie*. 1. edition. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 8021038411
79. TAKAHASHI, N. *et al.* Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clinical cancer research*, 2001, vol. 7, no.3, p. 524- 532.
80. TOUYZ, R.M. - MONTEZANO, A.C. Vascular NOX4: a multifarious NADPH oxidase. *Circulation research*, 2012, vol. 110, no. 9, p. 1159-1161.
81. VEJRAZKA, M. *Bunkové kultúry* [online]. [cit. 28.2.2017]. Dostupné na : <<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>>
82. VENKATESHA, S. *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine*, 2006, vol. 12, no. 6, p. 642-649.
83. VESTWEBER, D. VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 2008, vol. 258, no.2, p 223-232.

84. VIDAL-VANACLOCHA, F. Inflammation in the molecular pathogenesis of cancer and atherosclerosis. *Reumatología clínica*, 2009, vol. 5, no 1, p. 40-43.
85. WALSH, T.E. *et al.* Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2009, vol. 29, no. 8, p. 1185- 1192.
86. WHEELER-JONES, C. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A₂ in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS letters*, 1997, vol. 420, no.1, p. 28-32.
87. WONG, M.L. - MEDRANO, J.F. Real- time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques*, 2005, vol. 39, no. 1, p. 75-85.
88. YACHIE, A. *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The journal of clinical investigation*, 1999, vol. 103, no. 1, p. 129-135.
89. YU, Z.E. *et al.* Antiapoptotic action of hypoxia –inducible factor -1 α in human endothelial cells. *Laboratory investigation*, 2004, vol. 84, no. 5, p 553-561.
90. ZIMA, T. *et al.* *Laboratorní diagnostika*. 3. Edition, Praha: Galén, 2013. p. 1146. ISBN 978074920622.

8. Zoznam obrázkov

Obrázok č. 1: TGF β signalizačná dráha popisujúca dva druhy receptorov spolu s transkripčnými faktormi a väzbou endoglinu	15
Obrázok č. 2: Membránový a solubilný endoglin na obrázku je znázornené miesto odštiepenia.....	18
Obrázok č. 3: SYBR Green I a TaqMan a hybridizačné próby a ich odlišná aktivita značenia pri real-time PCR	31
Obrázok č.4:Priebeh krivky pri real-time PCR.....	33
Obrázok.č. 5:Grafické znázornenie mRNA expresie výsledkov na marker <i>NOS3</i>	41
Obrázok.č. 6:Grafické znázornenie mRNA expresie výsledkov na marker <i>CDH5</i>	41
Obrázok.č. 7:Grafické znázornenie mRNA expresie výsledkov na marker <i>PTGS2</i>	42
Obrázok.č. 8:Grafické znázornenie mRNA expresie výsledkov na marker <i>VEGF</i>	42
Obrázok.č. 9:Grafické znázornenie mRNA expresie výsledkov na marker <i>ICAM1</i>	42
Obrázok.č.10:Grafické znázornenie mRNA expresie výsledkov na marker <i>VCAM1</i>	43

9. Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1 Zloženie reakčnej zmesi na prepis mRNA.....	37
Tabuľka č.2 Primery použité pre real-time PCR	38
Tabuľka č.3 Percentuálne údaje z expresie génov po 3 hodinovom ošetrení sEng kvantifikáciou $\Delta\Delta C_t$ metódou	40
Tabuľka č.4 Percentuálne údaje z expresie génov po 16 hodinovom ošetrení sEng kvantifikáciou $\Delta\Delta C_t$ metódou	41