

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2023

Lucia Cvanigová

Univerzita Palackého v Olomouci
Prírodovedecká fakulta
Katedra bunkovej biológie a genetiky



Model *in vitro* angiogenézy

Bakalárska práca

Lucia Cvanigová

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: Molekulárna a bunková biológia

Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2023

Vedúca práce: RNDr. Lenka Hrubá

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lucia CVANIGOVÁ
Osobní číslo: R20694
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Model in vitro angiogeneze
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Vytvoření in vitro modelu pro studium angiogeneze
Optimalizace pro potřeby screeningu knihoven chemických látek
Testování potenciálních inhibitorů in vitro angiogeneze

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tisková**
Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

Amaoutova, L., Kleinman, H. *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc* 5, 628–635 (2010).
<https://doi.org/10.1038/nprot.2010.6>
Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res.* 2007;74(2-3):172-183.
doi:10.1016/j.mvr.2007.05.006

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lenka Hrubá**
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 29. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2022

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora:	Lucia Cvanigová
Názov práce:	Model <i>in vitro</i> angiogenézy
Typ práce:	Bakalárska
Pracovisko:	Katedra bunkovej biológie a genetiky, PrF UP v Olomouci
Vedúci práce:	RNDr. Lenka Hrubá
Rok obhajoby práce:	2023
Kľúčové slová:	HUVEC, angiogenéza, inhibítory angiogenézy
Počet strán:	43
Počet príloh:	0
Jazyk:	Slovenský

Súhrn:

Angiogenéza je komplexný viacstupňový proces, počas ktorého vznikajú krvné kapiláry z už existujúcich ciev. Za fyziologických podmienok je tento jav zásadný pre embryogenézu, hojenie rán, alebo obnovu endometria počas menštruačného cyklu. Angiogenéza je zásadná aj pre patologické procesy, ako je napr. rakovina.

Modely *in vitro* angiogenézy sa využívajú na štúdium potencionálnych inhibítorov angiogenézy. Predložená bakalárska práca sa zaoberá vývojom modelu *in vitro* angiogenézy za použitia dvoch rôznych matricových gélov, Geltrexu a Matrigelu. Po prevedení viacerých optimalizačných krokov boli stanovené optimálne podmienky, ktoré udávajú optimálny objem Matrigelu na 50 μ l za použitia 96 jamkového panelu. Ako optimálna koncentrácia buniek bola stanovená 51 300 – 62 000 buniek na jamku.

Vyvinutá metóda bude teraz využívaná pre potreby skríningu nových látok s potencionálnym inhibičným účinkom v rámci testovaní na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny.

Bibliographical identification

Author's name and surname:	Lucia Cvanigová
Title:	<i>In vitro</i> angiogenesis model
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor:	RNDr. Lenka Hrubá
The year of presentation:	2023
Keywords:	HUVEC, angiogenesis, inhibitors of angiogenesis
Number of pages:	43
Number of appendices:	0
Language:	Slovak

Summary:

Angiogenesis is a complex multi staged process, in which new capillaries out of existing blood vessels are created. In physiological conditions is angiogenesis necessary during embryogenesis, wound healing or endometrial renewal during menstrual cycle. Angiogenesis is crucial for pathological processes as well, such as cancer.

The *in vitro* angiogenesis model I used for studying potential inhibitors of the process. This thesis is creating a model for *in vitro* angiogenesis using two different basement membranes matrix, Geltrex and Matrigel. Several conditions were decided after conducting several optimisation steps which determine the optimal volume of Matrigel to 50 μ l when using the 96-well plate. 51 300 – 62 000 cells/well was concluded to be an optimal concentration of cells.

The created method will be used when there will be a need of screening of new substances with potential inhibition impact during experiments at Institute of Molecular and Translational Medicine.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením RNDr. Lenky Hrubej s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce RNDr. Lenke Hrubej, za jej ochotu, trpezlivosť, cenné a odborné rady a čas, ktorý mi venovala. Taktiež by som rada poďakovala svojej rodine za podporu a vytvorenie podmienok pre štúdium. Bakalárska práca bola podporená grantovým projektom IGA_LF_2021_038.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1 ANGIOGENÉZA	3
3.1.1 <i>Mechanizmus fyziologickej angiogenézy</i>	3
3.1.2 <i>Mechanizmus nádorovej angiogenézy</i>	4
3.1.3 <i>Angiogénne faktory</i>	5
3.1.4 <i>Antiangiogénne faktory</i>	8
3.2 INHIBÍCIA NÁDOROVEJ ANGIOGENÉZY AKO LIEČEBNÁ STRATÉGIA	10
3.2.1 <i>Použitie prirodzených antagonistov</i>	10
3.2.2 <i>Blokáda angiogénnych faktorov</i>	10
3.3 METÓDY VYUŽÍVANÉ PRE ŠTÚDIUM ANGIOGENÉZY	13
3.3.1 <i>Metódy in vivo</i>	13
3.3.2 <i>Metódy in vitro</i>	14
3.3.3 <i>Metódy in ovo</i>	15
4 MATERIÁL A METÓDY	16
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	16
4.2 ZOZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ	16
4.3 ZOZNAM POUŽITÝCH LABORATÓRNYCH PRÍSTROJOV A INÝCH POMÔCOK	16
4.4 METÓDY	17
4.4.1 <i>Kultivácia buniek</i>	17
4.4.2 <i>Optimalizácia metódy</i>	17
4.4.3 <i>MTS test cytotoxicity</i>	20
5 VÝSLEDKY	21
5.1 OPTIMALIZÁCIA METÓDY	21
5.2 MTS TEST CYTOTOXICITY	33
6 DISKUSIA	34
7 ZÁVER	36
8 LITERATÚRA	37

Zoznam symbolov a skratiek

ABT-510	z angl. thrombospondin mimetic peptid – TSP-1
AGM-1470	z angl. „angiogenesis modulator“ o-chlor-acetyl-karbamoyl-fumagilol
ANG	Angiopoietín
BAEC	Bovinné aortálne endotelové bunky
c - kit	Receptor pre „stem cell factor“
CAM	z angl. chicken chorio-allantoic membrane assay
DMSO	Dimethyl sulfoxid
EGF	z angl. epidermal growth factor
FGF	z angl. fibroblast growth factor
HGF	z angl. hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxiou indukovaný faktor
HUVEC	Endotelové bunky ľudského pupočníku
IC50	Polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie
IgG1	Imunoglobulín G1
IL	Interleukin
MMP	z angl. matrix metalloproteases
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2(4-sulfonyl)- 2H tetrazolium
NSCLC	Nemálobunkový karcinóm pľúc
PD-ECGF	z angl. platelet derived endothelial cell growth factor
PDGF	z angl. platelet derived growth factor
PDGFR	z angl. platelet derived growth factor receptor
PF-4	Doštičkový faktor 4
PGF	z angl. placental growth factor
TGF- α/β	z angl. transforming growth factor
TKI	Tyrozínkinázový inhibítor
TNF- α	z angl. tumor necrosis factor
TNP – 470	Syntetický analóg fumagilínu
TSP-1	Trombospondin-1

VDA	z angl. vascular disrution agents
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	z angl. vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von Hippel Lindau gén

Zoznam obrázkov

- Obrázok 1** - Mechanizmus nádorovej angiogenézy. Angiogénne faktory, ako napr. VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) a FGF (fibroblast growth factor) sú sekretované nádorom a okolitými bunkami, následkom čoho dochádza k navodeniu a regulácii kľúčových krokov angiogenézy. bFGF – basic fibroblast growth factor; bFGFR – basic fibroblast growth factor receptor; PDGFR – platelet derived growth factor receptor; MMP – matrix metalloproteinase; VEGFR-2 – vascular endothelial growth factor receptor 2 (prevzaté a upravené z Zhao et Adjei, 2015). 5
- Obrázok 2** - VEGF a ich príslušné receptory (prevzaté a upravené z Cébe-Suarez, Zehnder-Fjällman et Ballmer-Hofer, 2006)..... 7
- Obrázok 3** – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (50 μ l), po 24 hodinách inkubácie. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie. 22
- Obrázok 4** – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (60 μ l), po 24 hodinách inkubácie.. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie. 23
- Obrázok 5** – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (75 μ l), po 24 hodinách inkubácie. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie. 24
- Obrázok 6** – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (90 μ l), po 24 hodinách inkubácie. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie. 25
- Obrázok 7** - Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 384 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 12,5 μ l Geltrexu a 30 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 3 750 buniek na jamku. A) Suramin v koncentrácii 100 μ mol \cdot l $^{-1}$. B) Neca v koncentrácii 100 μ mol \cdot l $^{-1}$. C) MRS1220 v koncentrácii 20 μ mol \cdot l $^{-1}$. D) CIM v koncentrácii 10 μ mol \cdot l $^{-1}$. E) AB61 v koncentrácii 1 μ mol \cdot l $^{-1}$. F) PNH173 v koncentrácii 0,3 μ mol \cdot l $^{-1}$. G) PNH192 v koncentrácii 0,3 μ mol \cdot l $^{-1}$. H) Kontrola bez inhibítorov. 26

- Obrázok 8** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 6 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 800 µl matricea a 1960 µl suspenzie média a buniek o koncentrácii 165 120 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 27
- Obrázok 9** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 12 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 400 µl matrice, 960 µl suspenzie média a buniek o koncentrácii 82 560 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel. D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 27
- Obrázok 10** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 24 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 200 µl matrice a 480 µl suspenzie média a buniek o koncentrácii 41 280 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 28
- Obrázok 11** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 96 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 50 µl matrice a 120 µl suspenzie média a buniek o koncentrácii 10 320 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 28
- Obrázok 12** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 384 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 12,5 µl matrice a 30 µl suspenzie média a buniek o koncentrácii 2 580 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 29
- Obrázok 13** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 6 jamkovom paneli s 800 µl Matrigelu, 1960 µl suspenzie média a buniek o koncentrácii 165 120 buniek na jamku. A) 120 hodín inkubácie, B) 120 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) 144 hodín inkubácie, D) 144 hodín, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. E) 192 hodín inkubácie, F) 192 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 30
- Obrázok 14** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 12 jamkovom paneli s 400 µl Matrigelu a 960 µl suspenzie média a buniek o koncentrácii 82 560 buniek na jamku. A) 120 hodín inkubácie, B) 120 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) 144 hodín inkubácie, D) 144 hodín, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. E) 192 hodín inkubácie, F) 192 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 30
- Obrázok 15** – Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 24 jamkovom paneli s 200 µl Matrigelu a 480 µl suspenzie média a buniek 41 280 buniek na jamku. A)

120 hodín inkubácie, B) 120 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) 144 hodín inkubácie, D) 144 hodín, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. E) 192 hodín inkubácie, F) 192 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 31

Obrázok 16 - Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μl Matrigelu, 120 μl suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 30 780 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 31

Obrázok 17 - Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μl Matrigelu, 120 μl suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 41 040 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 32

Obrázok 18 - Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μl Matrigelu, 120 μl suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 51 300 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 32

Obrázok 19 - Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μl Matrigelu, 120 μl suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 61 560 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 32

Obrázok 20 - Mikroskopická vizualizácia modelu in vitro angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μl Matrigelu, 140 μl suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 71 820 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 33

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 – Najvýznamnejšie angiogénne faktory a ich funkcie (prevzaté a upravené z Klener, 2002).....	6
Tabuľka 2 – Príklady endogénnych angiogénnych a angiogénnych faktorov (prevzaté a upravené z Pang and Poon, 2006)	9
Tabuľka 3 – Prehľad použitých koncentrácií testovaných látok	18
Tabuľka 4 – Hodnoty IC ₅₀ a smerodajná odchýlka stanovené pomocou MTS testu cytotoxicity	33

1 Úvod

Angiogenéza je komplexný proces, ktorý spočíva v tvorbe nových krvných kapilár z už existujúcich ciev a je regulovaný prostredníctvom celej rady látok, ako sú napr. integriny, adhézne molekuly a rastové faktory (Carmeliet, 2000). Angiogenéza je fyziologický proces, ktorý je zásadný, napr. pre embryogenézu, pri hojení rán a pri obnove endometria počas menštruačného cyklu (Klener, 2002). Nádorové ochorenia sú poháňané neregulovanou angiogenézou (Folkman *et Shing*, 1992). Nádor bez cievneho zásobovania nemôže dosiahnuť väčšieho rozmeru než 1 – 2 mm³ (Klener P, 2010; Kieran, *et al.*, 2012).

Modely *in vitro* angiogenézy sú využívané pre klinické testovania potencionalných inhibítorov. Z fyziologického hľadiska by mal ideálny *in vitro* model zohľadňovať všetky kroky *in vivo* angiogenézy, od oddelenia endoteliálnych buniek od cievnej steny až po konečnú tubulárnu morfogenézu, dozrievanie a pripojenie k funkčnej vaskulárnej sieti. Okrem toho by mal byť rýchly, ľahko použiteľný a reprodukovateľný (Vailhé *et al.*, 2001).

2 Ciele práce

1. Spracovanie literárnej rešerše.
2. Vytvorenie *in vitro* modelu pre štúdium angiogenézy.
3. Optimalizácia pre potreby screeningu knižnice chemických látok.
4. Testovanie potenciónálnych inhibítorov *in vitro* angiogenézy.

3 Literárny prehľad

3.1 Angiogenéza

Krvné cievy môžu vznikáť rôznymi spôsobmi, a to vaskulogenézou, angiogenézou a arteriogenézou. Vaskulogenéza prebieha v skorých embryonálnych štádiách, pričom dochádza k diferenciácii angioblastov na krvné ostrovčeky, ktoré sa následne organizujú do primárneho kapilárneho plexu (Buschmann *et Schaper*, 1999). Angiogenéza je proces, pri ktorom sa formujú nové krvné kapiláry z už existujúcich ciev. Ide o fyziologickú vlastnosť všetkých vyšších organizmov (Folkman *et Shing*, 1992; Folkman, 2001). Do procesu angiogenézy sa zapájajú rôzne faktory, jedným z nich je napríklad VEGF (vascular endothelial growth factor), ktorý stimuluje proliferáciu endotelových buniek (Sadler, 2010).

3.1.1 Mechanizmus fyziologickej angiogenézy

Ako už bolo vyššie spomenuté, angiogenéza predstavuje proces novotvorby krvných kapilár z už existujúcich ciev (Folkman *et Shing*, 1992; Hanahan *et Folkman*, 1996; Folkman, 2001). Tento proces je potrebný, napr. počas procesu embryogenézy, nakoľko je dôležitý pre vývoj orgánov a tkanív (Carmeliet, 2005a), pri hojení rán, keďže dochádza k prenosu živín a kyslíka do postihnutého miesta (Knighton, *et al.*, 1981), pri obnovení endometria počas menštruačného cyklu (Novotný *et Zikán*, 2010) a taktiež je počas reprodukcie angiogenéza dôležitá pre správnu funkciu vaječníkov a vývoj folikulov (Fraser, 2006).

Mechanizmus angiogenézy prebieha kaskádovite, čo znamená, že ide o zložitý niekoľkostupňový proces. Proces je regulovaný pôsobením celej rady látok ako sú cytokiny a integríny, adhézne molekuly, proteolytické enzýmy a nízkomolekulárne látky. Angiogenézu je možné rozdeliť na tri etapy (Carmeliet, 2000; Klener, 2002; Novotný *et Zikán*, 2010).

Úlohou prvej fáze je narušenie bazálnej membrány. Tomuto kroku spravidla predchádza rozšírenie ciev, pri ktorom dochádza k preťahovaniu endotelových buniek. Postupne sa narúša plynulosť bazálnej membrány mechanicky, môže však byť narúšaná aj enzymaticky pôsobením proteolytických enzýmov a matrixmetalloproteáz. Cez takto porušenú membránu unikajú plazminogén a fibrinogén, ktoré sa následne premieňajú na plazmin a fibrin. Plazmin napomáha narušeniu bazálnej membrány a extracelulárnej matrix. Fibrinové vlákna sú oporou pre vznikanie nových ciev (Klener, 2002; Lukešová *et al.*, 2006).

Počas druhej fáze dochádza k proliferácii a migrácii endotelových buniek. Vytvárajú sa útvary, ktoré pripomínajú pupene. Endotelové bunky následne migrujú a uchyťávajú sa na sieť fibrínových vláken (Klener, 2002; Lukešová *et al.*, 2006).

V poslednej fázi prebieha morfogénza novej cievy. K morfogénze novej cievy je potrebná aktivácia pericytov, obnovenie bazálnej membrány a lumeny ciev. Pôsobením PD-ECGF (platelet derived endothelial cell growth factor) a TGF- α (transforming growth factor) dochádza k zvýšenej syntéze kolagénu a fibroblastu (Klener, 2002; Lukešová *et al.*, 2006).

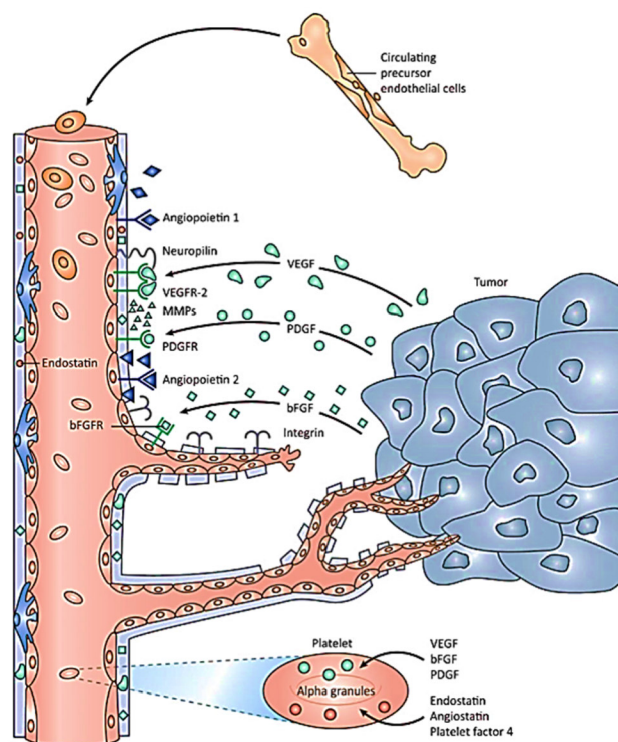
3.1.2 Mechanizmus nádorovej angiogenézy

Angiogenéza je za fyziologických podmienok vysoko regulovaný proces, mnohé ochorenia sú však poháňané neregulovanou angiogénzou (Folkman *et Shing*, 1992). Nádorové ochorenia využívajú angiogénzu k stimulácii rastu nádoru, nakoľko nádor bez cievneho zásobovania môže dosiahnuť veľkosti nanajvýš 1 – 2 mm³ (tzn. 10⁶ – 10⁷ buniek). Rozdiel oproti angiogénze prebiehajúcej za fyziologických podmienok spočíva v tom, že nádorová angiogenéza nekončí vznikom novej cievy (Klener, 2010; Kieran *et al.*, 2012). Zatiaľ čo sú novovzniknuté úspešne využívané pri dodávke živín k nádoru, proces morfogénzy nových ciev neprebíha úplne bezchybne (Vinay Kumar *et al.*, 2020). Novovzniknuté cievy bývajú nevyzreté, pokrútené, chaoticky usporiadané a majú zvýšenú permeabilitu. Kvôli tomu tiež dochádza k poklesu schopnosti prieniku liečiv k nádoru (Carmeliet, 2005b; Klener, 2010).

Jedným z kľúčových faktorov pri priebehu nádorovej nádorovej angiogenézy je HIF (hypoxiou indukovaný faktor). Ide o heterodimér, ktorý pozostáva z dvoch podjednotiek, a to HIF-1 α a HIF-1 β . Existuje aj ďalší stabilný gén – HIF2 α , ktorý je taktiež vyvolávaný hypoxiou (Harris, 2003). Aktivita HIF-1 je určovaná stabilitou proteínom HIF-1 α . Exprimované sú obidve podjednotky, ak je však v bunke normálna koncentrácia kyslíka, proteín HIF-1 α je degradovaný. Hlavným faktorom, ktorý podmieňuje zvýšenú expresiu faktoru VEGF je HIF-1 α . Agresívnejšie nádory sú potenciálne spojené so zvýšenou hladinou HIF-1 α (Bos *et al.*, 2001; Harris, 2003). Hypoxia, vznikajúca pri raste nádoru, spôsobí genetickú nestabilitu, ktorá potlačí uvoľňovanie antiangiogénnych faktorov, čo zapríčiní nerovnováhu medzi angiogénymi a antiangiogénymi faktormi. Následne dochádza k tzv. angiogénnemu prepnutiu (angiogénny switch), dôsledkom čoho, vzniká nový fenotyp nádorových buniek (Witz, 2009; Klener, 2010; Novotný *et Zikán*, 2010; Kieran *et al.*, 2012). Vďaka angiogénnemu prepnutiu môže začať novo vaskularizovaný nádor veľmi rýchlo rásť, spustiť bunkovú inváziu a metastázovanie. Prechod

na angiogénny fenotyp je vlastne výsledkom zmeny angiogénnych a antiangiogénnych faktorov produkovaných nádorovými bunkami. Výsledkom je zmena mikroprostredia a zvýšenie rastu nádorových ciev (Kay *et al.*, 2001; Lukešová *et al.*, 2006).

Dôležitú úlohu v procese angiogenéze hrá tumor – supresorový gén VHL (Von Hippel Lindau gén), ktorý bol lokalizovaný na chromozóme 3p25.5. Pri mutácii vo VHL géne dochádza k expresii mnohých hypoxiou indukovaných génov (HIF-1 α), ktoré sú za fyziologických podmienok v bunke ubikvitinované a degradované proteázomom. K jeho mutácii dochádza pri narušení regulácie angiogenézy (Kamura *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000; Bos *et al.*, 2001; Harris, 2003).



Obrázok 1 - Mechanizmus nádorovej angiogenézy. Angiogénne faktory, ako napr. VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) a FGF (fibroblast growth factor) sú sekretované nádorom a okolitými bunkami, následkom čoho dochádza k navodeniu a regulácii kľúčových krokov angiogenézy. bFGF – basic fibroblast growth factor; bFGFR – basic fibroblast growth factor receptor; PDGFR – platelet derived growth factor receptor; MMP – matrix metalloproteinase; VEGFR-2 – vascular endothelial growth factor receptor 2 (prevzaté a upravené z Zhao *et Adjei*, 2015).

3.1.3 Angiogénne faktory

Angiogénne faktory stimulujú angiogenézu rôznymi mechanizmami, v rôznych etapách (Klener, 2002). Proangiogénne faktory bývajú v rovnováhe s antiangiogénnymi faktormi, pri narušení tejto rovnováhy môžu vzniknúť rôzne imunitné, zápalové a nádorové ochorenia

(Italiano Jr *et al.*, 2008). Medzi najlepšie charakterizované angiogénne faktory regulujúce novotvorbu ciev patria VEGF, bFGF, PDGF, PLGF (placental growth factor), HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor) a angiopoetíny (Gacche, 2015).

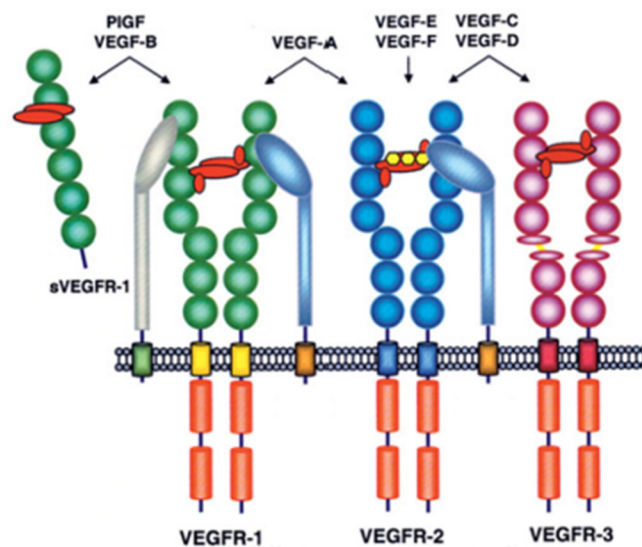
Tabuľka 1 – Najvýznamnejšie angiogénne faktory a ich funkcie (prevzaté a upravené z Klener, 2002)

Angiogénny faktor	Mechanizmus účinku
VEGF (vascular endothelial grow factor) VEGF A-E PGF (placental growth factor)	Indukcia proliferácie endotelii, zvýšenie permeability bazálnej membrány
FGF (fibroblast growth factor) aFGF, bFGF	Mitogénny účinok na endotelie
HGF (hepatocyte growth factor)	Morfogenéza novej cievy
MMP (matrix metalloproteases) –matrilysin, stromelysin, gelatinázy, kolagenázy	Proteolýza bazálnej membrány a extracelulárnej matrix
Angiopoetíny – angiopoetin-1, angiogenin, angiotropin	Komplexné antiangiogénne účinky, obmedzenie expície adhézných molekúl, aktivácia pericytov
PDGF (platelet derived growth factor)	Stimulácia a proliferácia fibroblastov a produkcia kolagénu
PD-ECGF (platelet derived endothelial cell growth factor)	Uľahčenie migrácie endotelii
TNF- α (tumor necrosis factor)	Aktivácia MMP
EGF (epidermal growth factor)	Nepriame účinky, stimulácia výdaja VEGF
TGF- α (transforming growth factor)	Nepriame účinky, stimulácia výdaja VEGF
Interleukíny (IL-1, IL-6, IL-8)	Stimulácia mitogenézy a migrácie endotelii
Integríny	Uľahčenie migrácie buniek

VEGF

VEGF (vascular endothelial grow factor) je signálny proteín, ktorý je považovaný za najvýznamnejší faktor účastniaci sa procesu angiogenézy. VEGF často označovaný ako VEGF-A, ďalej tam patria faktory ako VEGF- B, VEGF- C, VEGF- D, VEGF- E. Mechanizmom alternatívneho zstrihu je tvorených 5 izoforiem faktoru VEGF, zložených z 123, 145, 165, 189 a 206 aminokyselín dlhých reťazcov, pričom sa najčastejšie vyskytuje VEGF₁₆₅ (Papetti *et* Herman, 2002; Ferrara, 2004; Carmeliet, 2005b).

VEGF sú dimérne glykoproteíny, ktoré obsahujú osem cysteinových zvyškov, tie sa viažu na špecifické receptory na membránu endotelových buniek. Touto väzbou dôjde k aktivovaniu tyrosinkinázy a spustí sa tak stimulácia proliferácie, migrácia endotelii a permeabilita ciev (Klener, 2010). VEGF sa viaže na špecifické receptory lokalizované na membráne endotelových buniek a touto väzbou aktivuje receptorové tyrosinkinázy (Klener, 2002). Existujú tri receptory pro VEGF: VEGFR1/FLT1 (fms-like tyrosine kinase-1), VEGFR - 2/FLK1/KDR (fetal liver kinase 1/kinase domain receptor) a VEGFR3/FLT4 (fms-like tyrosine kinase-4). VEGF-A sa viaže na receptory VEGFR-1 a VEGFR-2. VEGF-B a PlGF sa viažu na receptory VEGFR-1 a zvyšné faktory sa viažu na receptory VEGFR-3 (Ferrara, 2004).



Obrázok 2 - VEGF a ich príslušné receptory (prevzaté a upravené z Cébe-Suarez, Zehnder-Fjällman *et* Ballmer-Hofer, 2006)

Ďalšie angiogénne faktory

MMP (matrix metalloproteases) metaloproteinázy matrix pozostávajú z 23 odlišných proteáz, sú závislé od zinka a vápnika. MMP sú zodpovedné za metabolizmus proteínov extracelulárnej matrix a podieľajú sa na procesoch remodelácie tkaniva ako je hojenie rán, tehotenstvo a angiogenéza (Borkakoti, 1998; Klein *et Bischoff*, 2011).

FGF (fibroblast growth factor) je významný stimulátor angiogenézy. Existujú dve formy aFGF – acidická a bFGF – bázická. FGF hrá kľúčovú úlohu pri bunkovej proliferácii, migrácii buniek, angiogenézi, embryogenézi a hojení rán. FGF charakterizuje vysoká väzbová afinita pre heparín, čo vysvetľuje ich väzbu na heparansulfát proteoglykán (Klener, 2002; Teven *et al.*, 2014).

HGF (hepatocyte growth factor) je dôležitý faktor angiogenézy, stimuluje proliferáciu hepatocytov, keratinocytov a endotelií (Klener, 2002).

PDGF (platelet derived growth factor) bol pôvodne objavený ako zložka krvných doštičiek, následne sa však zistilo, že má aj mnoho iných funkcií, ovplyvňuje diferenciáciu špecifických typov buniek a podporuje ich prežitie. Taktiež je dôležitý pri embryonálnom vývoji, hojení rán a udržiavaní homeostázy spojivových tkanív (Heldin, 2003).

Angiopoietíny (ANG) sa zapájajú do skorých procesov angiogenézy a vaskulogenézy. Boli popísané štyri izotypy angiopoietínov: ANG1, ANG2, ANG3, ANG4, z ktorých sú najlepšie popísané ANG1 a ANG2, ANG3 sa nachádza u myši a ANG4 u ľudí. Angiopoietín 1 (ANG1) sa nachádza v tkanivách, ktoré susedia s krvnými cievami. Angiopoietín 2 (ANG2) sa nachádza iba na miestach prestavby tkanív. Všetky štyri izotypy angiopoetínov boli identifikované ako ligandy pre Tie-2 receptor (Davis *et al.*, 1996; Kuwano *et al.*, 2001; Felmeden *et al.*, 2003).

3.1.4 Antiangiogénne faktory

Trombospondin-1 (TSP-1) je najdlhšie známy antiangiogénny faktor a patrí medzi proteíny, ktoré interagujú s extracelulárnou matrix (Bornstein, 2009). Ide o glykoprotein s pleiotrofnými účinkami, ktorý reguluje adhéziu, delenie a prežitie endotelových buniek (Rusk *et al.*, 2006). Do rodiny TSP taktiež patria TSP-2, TSP-3, TSP-4 a COMP/TSP-5 (Adams, 1997).

Angiostatin je štiepny produkt plasminogénu a jeho veľkosť sa pohybuje okolo 38 kDa. Blokuje migráciu a proliferáciu endotelových buniek a vyvoláva u nich apoptózu (O'Reilly *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2000).

Endostatin je 20 kDa veľký fragment kolagénu XVIII. Špecificky inhibuje proliferáciu endotelu, dôsledkom je inhibícia angiogenézy a rastu nádoru (O'Reilly *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000).

Vasostatin je malá, rozpustná molekula, zameriava sa na proliferujúce endotelové bunky, ktoré následne inhibuje (Pike *et al.*, 1998)

Ďalšie antiangiogénne faktory sú napríklad interferon- α/β , interleukin-12, rastový faktor krvných doštičiek 4, tkanivový inhibítor metalloproteináz-1/2, human macrophage metalloelastase a vaskulárny endoteliálny rastový inhibítor (viď tabuľka 2) (Pang *et Poon*, 2006).

Tabuľka 2 – Príklady endogénnych angiogénnych a angiogénnych faktorov (prevzaté a upravené z Pang *et Poon*, 2006)

Angiogénny faktor	Antiangiogénny faktor
VEGF (vascular endothelial grow factor)	Thrombospondin-1, 2
FGF	Endostatin
TGF- α/β (transforming growth factor)	Angiostatin
PD-ECGF (platelet derived endothelial cell growth factor)	Interferon- α/β
HGF (hepatocyte growth factor)	Interleukin-12
TNF- α (tumor necrosis factor)	Platelet factor 4 fragment
EGF (epidermal growth factor)	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1/2
PGF (placental growth factor)	Human macrophage metalloelastase
IL 6/8 (Interleukin 6/8)	Vascular endothelial growth inhibitor
Angiogenin	Vasostatin

3.2 Inhibícia nádorovej angiogenézy ako liečebná stratégia

V poslednom desaťročí sa angiogenéza stala intenzívne skúmanou oblasťou, nakoľko hrá dôležitú rolu u niektorých nádorov pri raste a ich metastázovaní, čo z nej robí potenciálny terapeutický cieľ (Harris, 2003). Objasnenie priebehu angiogenézy pomohlo objaviť terapeutické prístupy, ktoré sú založené na blokovaní angiogenézy (Scappaticci, 2002). Existujú dva spôsoby, ktorými môže prebiehať inhibícia tohto procesu, a to napr. pomocou použitia prirodzených antagonistov alebo blokády angiogénnych faktorov (Harris, 2003).

3.2.1 Použitie prirodzených antagonistov

Napriek tomu, že pilotné štúdie s niektorými antiangiogénnymi faktormi prinášali sľubné výsledky, sa v klinickej praxi zatiaľ táto stratégia veľmi neuplatňuje. Do skupiny prirodzených inhibítorov angiogenézy patria, napr. ABT-510 (thrombospondin mimetic peptid – TSP-1), rekombinantne pripravený angiotatin, endostatin a doštičkový faktor 4 (PF-4) (O'Reilly *et al.*, 1997; Rusk *et al.*, 2006; Klener P, 2010).

ABT-510 je nonapeptidový analóg TSP-1 (trombospondin – 1), ktorý sa vyznačuje podobnými vlastnosťami ako prirodzený trombospondin. Vyznačuje sa blokáciou odpovede na angiogénne podnety, inhibíciou aktivity endotelií a podporou ich apoptózy (Rusk *et al.*, 2006). TSP-1 je dlhý adhezívny glykoproteín, ktorý je aktivovaný tumor supresorovým génom p53. Jeho antiangiogénna aktivita však závisí od aktivácie p53 a p38MAPK prostredníctvom interakcie s receptorom CD36. ABT-510 súťaží s TSP-1 o väzbu na endotelové bunky, indukuje expresiu Fas ligandu v endotelových bunkách, následkom čoho dochádza k inhibícii migrácie mikrovaskulárnych endotelových buniek stimulovanej faktormi VEGF a bFGF (Lawler, 2000; Hoekstra *et al.*, 2005).

3.2.2 Blokáda angiogénnych faktorov

Blokáda angiogénnych faktorov je častejšie využívaný a efektívnejší prístup. Pre potlačenie účinkov angiogénnych faktorov sa využíva napríklad inhibícia signálnej dráhy VEGF – VEGFR, inhibícia proliferácie endotelových buniek, stabilizácia bazálnej membrány, disrupcia nádorových buniek (Gastl *et al.*, 1997; Hagedorn *et al.*, 2000; Klener, 2002).

Signálna dráha VEGF – VEGFR

Nakoľko má VEGF faktor kľúčové postavenie pri nádorovej angiogenéze, ponúka tak atraktívny cieľ pre terapeutické zásahy (Pandya et al., 2006). Preto patrí inhibícia signálnej dráhy VEGF – VEGFR medzi najlepšie preštudované terapeutické metódy. Angiogénny účinok VEGF je možné inhibovať na niekoľkých úrovniach: blokádu tyrozínkinázovej domény pomocou tyrozínkinázového inhibítora (TKI) alebo použitím monoklonálnej protilátky proti väzobnej doméne príslušných receptorov (Neufeld *et al.*, 1999).

Jedným z prvých činidiel inhibujúcich signálnu dráhu VEGF – VEGFR bol Bevacizumab. Ide o humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá zabraňuje interakcii VEGF s VEGFR. Primárne ide o receptory, ktoré sa nachádzajú na povrchu endoteliálnych buniek, a to VEGFR-1 a VEGFR-2 (Fujita et al., 2008). Bevacizumab bol FDA (US Food and Drug Administration) schválený v roku 2004, ide tak o prvú cieleňú antiangiogénnu látku schválenú na použitie v onkológii (Shih et Lindley, 2006; Zhao et Adjei, 2015). V kombinácii s chemoterapiou je Bevacizumab schválený na liečbu pokročilého kolorektálneho karcinómu a pokročilého karcinómu obličiek (Kazazi-Hyseni et al., 2010). Využíva sa taktiež na liečbu karcinómu prsníka spolu s paclitaxelom (Patrick, 2017).

Ďalším inhibítorom spomínanej signálnej dráhy je Aflibercept. Ide o fúzny proteín, ktorý je tvorený extracelulárnymi doménami z VEGFR - 1 a VEGFR - 2 sfúzovanými s Fc časťou imunoglobulínu G1 (IgG1). Dokáže sa naviazať na všetky izoformy VEGF a PGF, čím sa stávajú nedostupnými pre väzbu s príslušným receptorom (Fujita et al., 2008; Zhao et Adjei, 2015).

Sunitinib je perorálne podávaný multikinázový inhibítor VEGFR - 1, VEGFR - 2, VEGFR - 3, PDGFR a c - kit (receptor pre „stem cell factor (SCF)“) (Meadows and Hurwitz, 2012). Štúdie preukázali povzbudivé výsledky pri liečbe gastrointestinálnych stromálnych tumorov, NSCLC (nemálobunkový karcinóm pľúc) a uroteliálnych karcinómov (Fujita et al., 2008; Meadows et Hurwitz, 2012).

Ďalšie potencionálne ciele inhibície účinkov angiogénnych faktorov

Pre potlačenie účinkov angiogénnych faktorov sa napríklad využíva inhibícia proliferácie endotelových buniek, ku ktorej môže dochádzať pomocou látky fumagillin, ktorá pochádza z extraktu huby *Aspergillus fumigatus*, avšak kvôli svojej toxicite sa v praxi neuplatnila (Griffith *et al.*, 1998; Klener P, 2010). Použitie AGM-1470 („angiogenesis

modulator“ o-chlor-acetyl-karbamoyl-fumagilol), menej toxického derivátu fumagilínu, sa taktiež nepremietlo do klinickej praxe, napriek jeho priaznivému efektu pri Kaposiho sarkóme (Klener, 2005). Netoxický, syntetický analóg fumagilínu, TNP – 470 (Lodamin), našiel uplatnenie v praxi, pri liečbe pečenej metastáz (Griffith *et al.*, 1998; Benny *et al.*, 2008).

Ďalším možným spôsobom je stabilizácia bazálnej membrány, nakoľko na začiatku angiogénneho procesu musí dôjsť k narušeniu bazálnej membrány endotelových buniek existujúcej cievy preto, aby mohla vzniknúť nová. Za pomoci inhibítorov matrixmetaloproteáz dochádza ku stabilizácii bazálnej membrány (Rydlova *et al.*, 2008).

Alternatívnym spôsobom inhibície rastu nádoru je disrupcia nádorových buniek za použitia cytostatík VDA (vascular disruption agents). Vykazujú cytostatický účinok voči už vytvoreným nádorovým cievam (Gridelli *et al.*, 2009). Medzi VDA látky patrí napr. plinabulin (NPI-2358), ktorý sa označuje ako jeden z najúčinnějších VDA látok (Bertelsen *et al.*, 2011).

3.3 Metódy využívané pre štúdium angiogenézy

Tvorba krvných ciev je telom riadená aby sa nenarušila prirodzená rovnováha. Ak je táto rovnováha narušená, dochádza buď k prílišnému rastu, alebo k prílišnej inhibícii angiogenézy. Pri inhibícii angiogenézy nedôjde k vzniku malígneho nádoru, z tohto dôvodu je vývoj antiangiogénnych liekov veľmi zaujímavý a dôležitý (Liekens et al., 2001; Almalki et al., 2014). Existuje mnoho *in vivo*, *in vitro*, *in ovo* metód pre štúdium angiogenézy, náročnou úlohou, ale je vybrať správnu metódu (Almalki et al., 2014).

3.3.1 Metódy *in vivo*

Testy *in vivo* sú náročné na realizáciu a zaberajú veľa času, preto sa nemôže vykonávať viac testov naraz. Poskytujú najspolahlivejšie výsledky o tom, ako môže biomolekula ovplyvniť angiogenézu v organizme. Medzi *in vivo* metódy patrí napríklad sponge implantation assay, corneal angiogenesis assay, zebrafish assay, Matrigel plug assay (Stryker et al., 2019).

„Sponge implantation assay“ bol prispôsobený tak, aby charakterizoval esenciálne komponenty a ich úlohy pri tvorbe nových krvných ciev za rôznych fyziologických či patofyziologických podmienok (Couffinhal et al., 1997; Almalki et al., 2014).

„Matrigel plug assay“ sa využíva na detekciu tvorby nových krvných ciev v transplantovaných gélových zátkach u myši. Výhodou tejto metódy je, že umožňuje presnejšiu vizualizáciu angiogénneho procesu, nie je technicky náročná a kvantifikácia sa môže vykonávať meraním množstva hemoglobínu v zátku (Almalki et al., 2014; Stryker et al., 2019).

„Corneal angiogenesis assay“ je založená na zavedení angiogénneho induktora do vaku rohovky, aby sa vytvoril vaskulárny výrastok z limbálnej vaskulatúry okolia (Almalki et al., 2014).

„Zebrafish assay“ je metóda, pri ktorej sa využíva ryba *Danio rerio*. Výhodou tejto metódy je vysoký počet embryí, vďaka čomu je tento typ testu výhodný pre skrining. Nakoľko sú embryá priehľadné, procesy sú ľahko pozorovateľné pomocou mikroskopu (Stryker et al., 2019).

3.3.2 Metódy *in vitro*

In vitro metódy sa môžu praktizovať v krátkom časovom úseku a poskytujú presné a spoľahlivé výsledky. Pre získanie maximálne spoľahlivých výsledkov je potrebné vykonať viacero testov (Almalki *et al.*, 2014).

Do procesu angiogenézy sa zapájajú prevažne endotelové bunky, ktoré lemujú všetky krvné cievy a vytvárajú celé krvné kapiláry. Predchádza tomu niekoľko krokov, najskôr dochádza k prerušeniu bazálnej membrány, následne migrujú smerom k angiogénnym stimulom a nakoniec sa organizujú do tubulárnych štruktúr (Auerbach *et al.*, 2003).

Významným nástrojom pre *in vitro* štúdium angiogenézy sú endotelové bunky (EC), ako sú napríklad bovinné aortálne endotelové bunky (BAEC), alebo endotelové bunky ľudského pupočníku (HUVEC) (Stryker *et al.*, 2019). HUVEC boli najčastejšie využívané pre *in vitro* štúdie, v súčasnej dobe sa hľadajú nové alternatívy, nakoľko tieto bunky nie sú imortalizované a po niekoľkých dňoch vymierajú (Tat *et al.*, 2015).

Medzi metódy prebiehajúce *in vitro* patria napríklad cell culture assay, cord formation assay, tube formation assay, cell proliferation assay, cell migration assay (Almalki *et al.*, 2014).

„Cell culture assay“ ako už bolo vyššie spomenuté endotelové bunky sú dôležité pre *in vitro* štúdium angiogenézy. Bežne sa používajú endotelové bunky ľudského pupočníku (HUVEC). Problémom týchto testov však sú fenotypové rozdiely v endotelových bunkách, nakoľko nie vždy sú rovnakého druhu. Okrem toho, endotelové bunky môžu vykazovať zmenené charakteristiky pri porovnaní pokojových podmienok s kultivačnými (Almalki *et al.*, 2014).

„Cord formation assay“ je pomerne jednoduchá metóda, pri ktorej sa využíva Matrigel so zníženým obsahom rastových faktorov. Matrigel so zníženým obsahom rastových faktorov sa polymerizuje 30 minút pri 37 °C v 48-jamkovej doštičke. Endotelové bunky (napr. HUVEC) sú inkubované v rastovom médiu obsahujúcom 1% FBS po dobu 12 hodín. Následne sú použité endotelové bunky trypsinizované, rozsuspendované a rozptýlené na Matrigel. Po 18 hodinách je tvorba šnúrkovitých útvarov monitorovaná pomocou inverzného mikroskopu (Park *et al.*, 2007).

„Tube formation assay“ je jedným z najčastejšie sa využívajúcim testom pri štúdiu angiogenézy. Využíva sa na meranie schopnosti endotelových buniek vytvárať trojrozmerné tubulárne štruktúry. Zlúčeniny, ktoré dokážu zabrániť tvorbe tubulárnych štruktúr, by mohli

mať potenciál pri mnohých nádorových ochoreniach (Auerbach *et al.*, 2003; Almalki *et al.*, 2014; Stryker *et al.*, 2019).

„Cell proliferation assay“ je založený na počítaní buniek, inkorporácii tymidínu, imunohistochemickom farbení alebo bunkovej smrti (Huh *et al.*, 2005).

3.3.3 Metódy *in ovo*

Medzi *in ovo* testy patrí „Chicken chorio-allantoic membrane assay (CAM)“. Táto metóda nie je náročná, drahá, ani zdĺhavá. Vývoj a zmeny, ktoré nastávajú sa dajú ľahko pozorovať vďaka CAM metóde, ktorá je jednoduchá na manipuláciu. Táto metóda sa využíva na výskumné účely z dôvodu jednoduchého pozorovania tvorby srdca a vývoja embrya (Almalki *et al.*, 2014).

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

V experimentálnej časti bola použitá adherentná bunková línia endotelových buniek HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, PromoCell). Kultivácia prebehla pri 37°C a 5% CO₂ v atmosfére, v rastovom médiu pre endoteliálne bunky so zníženým obsahom fetálneho bovinného séra (2%).

4.2 Zoznam použitých chemikálií

- Dimethyl sulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, D8418)
- Deionizovaná voda
- Rastové médium pre endoteliálne bunky (PromoCell, C – 22010)
- SupplementMix pre rastové médium (PromoCell, C – 39215)
- TrypLE™ (Gibco™, 12604013)
- 10× PBS (Gibco™, 10010002)
- Geltrex (Gibco™, A1413201)
- Matrigel (Corning®, 354230)
- Suramin (Merck, 574625)
- Calcein AM (Invitrogen™, C3099)
- NECA (experimentálna látka z ÚOCHB AV Praha)
- MRS 1220 (experimentálna látka z ÚOCHB AV Praha)
- CI – IB – MECA (CIM; experimentálna látka z ÚOCHB AV Praha)
- AB 61 (experimentálna látka z ÚOCHB AV Praha)
- PNH 173 (experimentálna látka z ÚOCHB AV Praha)
- PNH 192 (experimentálna látka z ÚOCHB AV Praha)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2(4-sulfonyl)-2H tetrazolium (MTS; Promega, G1111)

4.3 Zoznam použitých laboratórnych prístrojov a iných pomôcok

- Multidrop Combi Reagent Dispenser (ThermoScientific™)
- Echo 550 (Labcyte)
- EnVision Plate Reader (PerkinElmer)
- Laminárny box (MSC-ADVANTAGE)
- Fluorescenčný mikroskop Axio Observer (Zeiss)

- Cell voyager cv 8000 (Yokogawa)
- Vi-cell XR (Beckman coulter)
- Vortex (Scientific Industries)
- Mini Spin (Eppendorf)
- Stolná centrifúga 5810 R (Eppendorf)
- CO2 inkubátor HERAcell 150i (ThermoScientific™)
- Kombinovaná chladnička (Gorenje)
- Minicentrifuga (Eppendorf)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Špičky (Eppendorf)

4.4 Metódy

4.4.1 Kultivácia buniek

Bunková línia HUVEC bola kultivovaná v kultivačných fľašiach v rastovom médiu pre endotelové bunky so zníženým obsahom bovinného fetálneho séra (2% v/v) a inkubovaná pri 37°C a 5% CO₂ v atmosfére.

4.4.2 Optimalizácia metódy

V prvom kroku optimalizácie bolo cieľom nájsť optimálne množstvo matricového gélu (Geltrexu) a optimálnu koncentráciu buniek. Boli zvolené štyri rôzne objemy Geltrexu (50 µl, 60 µl, 75 µl a 90 µl), ktoré boli napipetované do 96 jamkového panelu v pentaplikátoch. Nasledovala inkubácia pri 37°C a 5% CO₂ po dobu 30 min. Následne boli na pripravený Geltrex nanášané bunky v piatich rôznych koncentráciách, a to 15 000, 20 000, 25 000, 30 000 a 35 000 buniek na jamku. Takto pripravená doštička bola inkubovaná po dobu 24 h pri 37°C a 5% CO₂ v atmosfére. Vizualizácia prebehla pomocou fluorescenčného mikroskopu Zeiss Axio Observer.

Ďalším krokom optimalizácie bolo pozorovanie inhibície angiogenézy za pôsobenia rôznych látok ako je suramin, NECA, MRS120, CI – IB MECA (CIM), AB61, PNH173 a PNH192. Bola využitá fluorescenčná mikroskopia pomocou farbiva calcein AM. Ide o nefluorescenčné farbivo, ktoré sa po hydrolýze acetoxymethylesteru intracelulárnymi esterázami v živých bunkách mení na zelené fluorescenčné farbivo calcein. Pre potreby daného testu boli využité čierne 384 jamkové panely. Do všetkých jamiek bolo napipetované 30 µl

suspenzie média a buniek, 12,5 μ l Geltrexu a testované látky v štyroch rôznych koncentráciách (suramin, NECA, MRS1220, CI – IB – MECA (CIM), AB61, PNH173, PNH192). Nasledovala inkubácia pri 37°C a 5% CO₂ po dobu 24 h. Následne bola nanosená fluorescenčná farba calcein AM. Takto pripravený panel bol opäť inkubovaný pri 37°C a 5% CO₂ po dobu 30 min. Vizualizácia prebehla pomocou Cell Voyager cv 8000.

Tabuľka 3 – Prehľad použitých koncentrácií testovaných látok

Testované látky	Koncentrácie testovaných látok [μ mol·l ⁻¹]			
Suramin	15	30	56	100
Neca	15	30	56	100
MRS1220	5	10	15	20
CIM	1	3	5	10
AB61	0,01	0,1	0,5	1
PNH173	0,01	0,1	0,2	0,3
PNH192	0,01	0,1	0,2	0,3

V nasledujúcom kroku optimalizácie bolo cieľom zoptimalizovať čas inkubácie a nájsť optimálnu veľkosť panelu pre tvorbu angiogénnych štruktúr. Taktiež boli porovnávané dve rôzne matricové gély, Geltrex a Matrigel. Pre potreby daného experimentu bolo využitých päť rôznych panelov a to, 384, 96, 24, 12 a 6 jamkový panel.

- Do 384 jamkového panelu bolo v tetraplikáte napipetované 12,5 μ l matricového gélu a 30 μ l suspenzie média a buniek pričom koncentrácia buniek bola 2 580 buniek na jamku. Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bol pridaný navyše do dvoch jamiek.
- Do 96 jamkového panelu bolo v tetraplikáte napipetované 50 μ l matricového gélu a 120 μ l suspenzie média a buniek pričom koncentrácia buniek bola 10 320 buniek na jamku. Do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Do 24 jamkového panelu bolo v tetraplikáte napipetované 200 μ l matricového gélu a 480 μ l suspenzie média a buniek pričom koncentrácia buniek bola 41 280 buniek na jamku. Do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

- Do 12 jamkového panelu bolo v tetraplikáte napipetované 400 μl matricového gélu a 960 μl suspenzie média a buniek pričom koncentrácia buniek bola 82 560 buniek na jamku. Do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Do 6 jamkového panelu bolo v tetraplikáte napipetované 800 μl matricového gélu a 1 920 μl suspenzie média a buniek pričom koncentrácia buniek bola 165 120 buniek na jamku. Do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Postup bol rovnaký ako pre Matrigel, tak aj pre Geltrex.

Takto pripravené panely boli inkubované po dobu 72 hodín pri 37°C a 5% CO_2 . Následná vizualizácia prebehla pomocou fluorescenčného mikroskopu Zeiss Axio Observer.

Cieľom posledného kroku optimalizácie bolo nájsť optimálnu koncentráciu buniek pre 96 jamkový panel, na ktorý bolo nanosených 50 μl Matrigelu. Bolo zvolených päť rôznych koncentrácií buniek napipetovaných v tetraplikátoch, z čoho dve jamky slúžili ako kontrola a do ďalších dvoch bol pridaný suramin.

- V prvom tetraplikáte bolo napipetované 140 μl suspenzie média a buniek o koncentrácii 71 820 buniek na jamku a do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Bolo napipetované 120 μl suspenzie média a buniek o koncentrácii 61 560 buniek na jamku a do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Ďalej bolo napipetované 120 μl suspenzie média a buniek o koncentrácii 51 300 buniek na jamku a do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Následne bolo napipetované 120 μl suspenzie média a buniek o koncentrácii 41 040 buniek na jamku a do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Do posledného tetraplikátu bolo napipetované 120 μl suspenzie média a buniek o koncentrácii 30 780 buniek na jamku a do dvoch jamiek bol pridaný suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Takto pripravené panely boli inkubované pri 37°C a 5% CO_2 po dobu 24 hodín. Následná vizualizácia prebehla pomocou fluorescenčného mikroskopu Zeiss Axio Observer.

4.4.3 MTS test cytotoxicity

Ku stanoveniu cytotoxického účinku rôznych látok na bunkovú líniu HUVEC bol použitý MTS test. MTS test je založený na premene žltého MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2(4-sulfonyl)-2H tetrazolium) na fialový, vo vode nerozpustný formazán pomocou mitochondriálnych dehydrogenáz, ktoré sa nachádzajú v metabolicky aktívnych bunkách. Množstvo produkovaného formazánu je priamo úmerné počtu živých buniek, meria sa spektrofotometricky pri absorbancii okolo 490 nm (Malich, Markovic and Winder, 1997).

Pre potreby MTS testu boli využité 384 jamkové panely. Prvý a posledný stĺpec predstavoval pozadie experimentu a obsahoval 30 μ l média. 2. – 23. stĺpec obsahoval 30 μ l suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia predstavovala 3 750 buniek na jamku. Takto pripravená doštička bola inkubovaná po dobu 24 h. Následne boli k bunkám pridané testované látky (suramin, AB61, PNH173, PNH192) v štyroch technických replikátoch, v deviatich koncentračných bodoch, pričom najvyššia koncentrácia bola 50 μ mol \cdot l⁻¹ a vo štvorkovom riedení pomocou Echo 550.

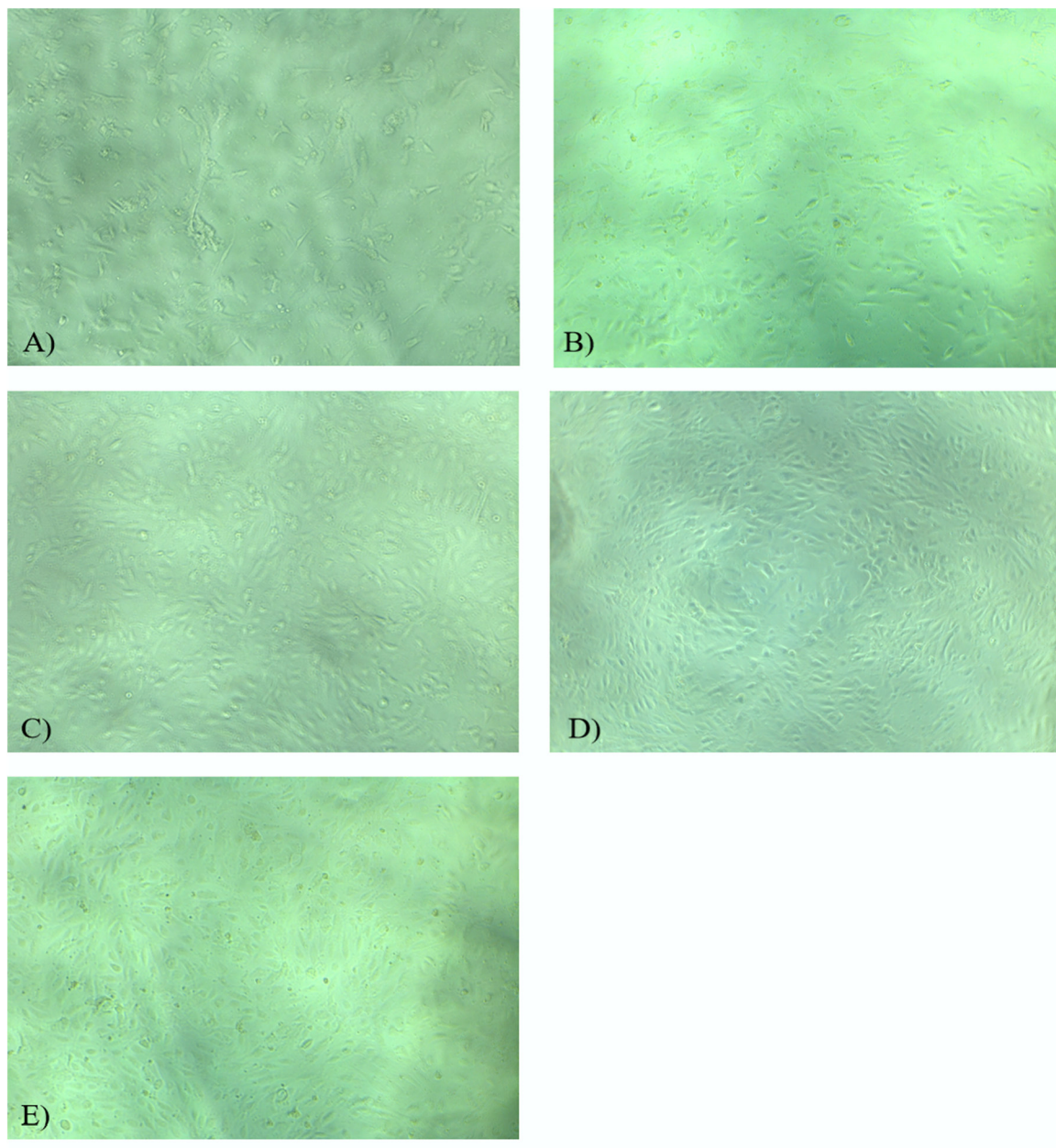
Bunky boli testovaným látkam vystavené pri 37°C a 5% CO₂ po dobu 72 h a následne bol pridaný roztok MTS. Panely boli opäť uložené do inkubátoru na 3 h. Meranie množstva formazánu prebehla pomocou Perkin Elmer Envision pri absorbancii 490 nm.

Rovnaký postup bol opakovaný aj pri druhom MTS teste. Prvý a posledný stĺpec predstavoval pozadie experimentu a obsahoval 30 μ l média. 2. – 23. stĺpec obsahoval 30 μ l suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia predstavovala 7260 buniek na jamku. Takto pripravená doštička bola inkubovaná po dobu 24 h. Následne bol k bunkám pridaný suramin v štyroch technických replikátoch, 9 koncentračných bodoch, pričom najvyššia koncentrácia bola 200 μ mol \cdot l⁻¹ a v dvojkovom riedení pomocou Echo 550.

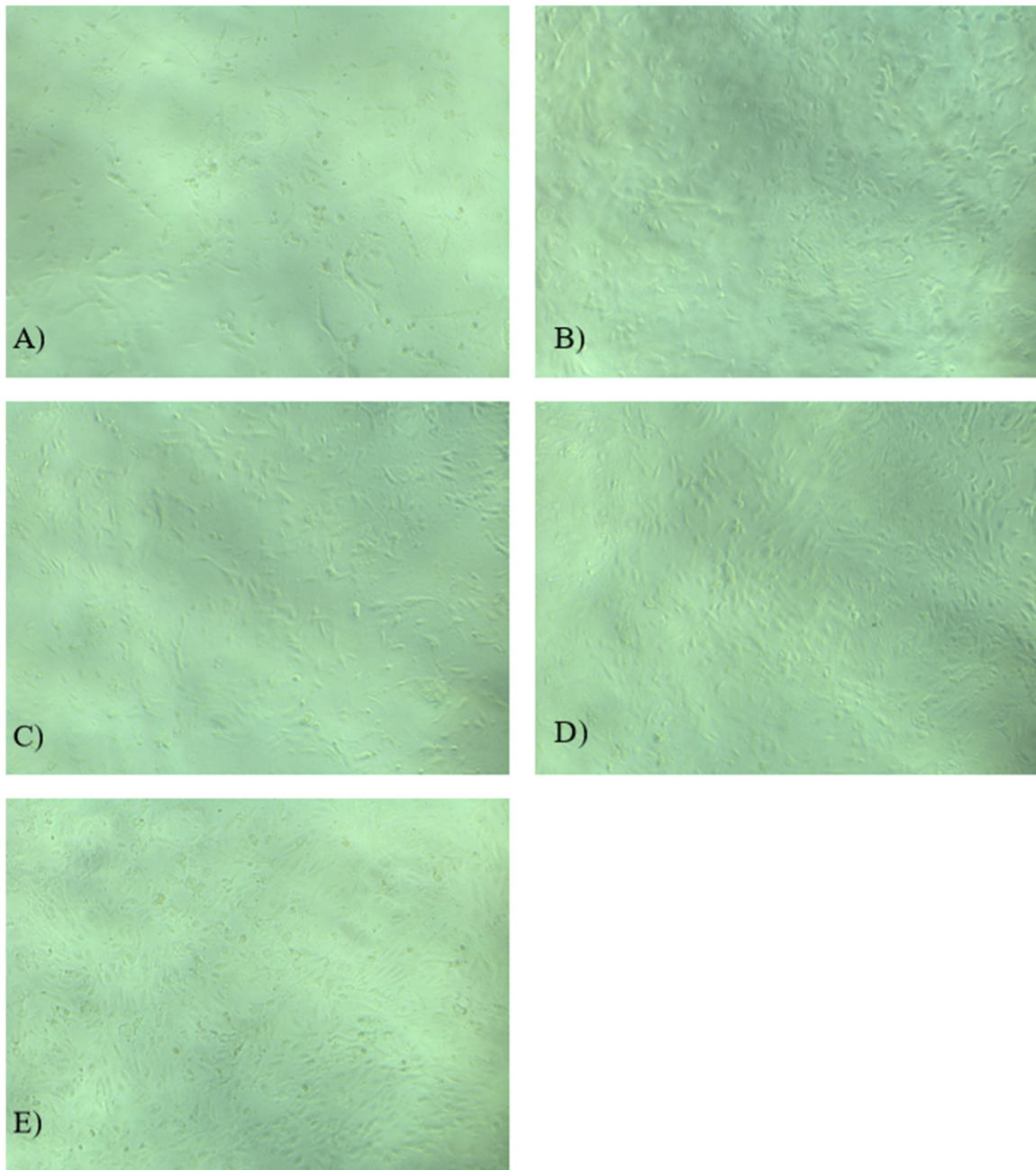
5 Výsledky

5.1 Optimalizácia metódy

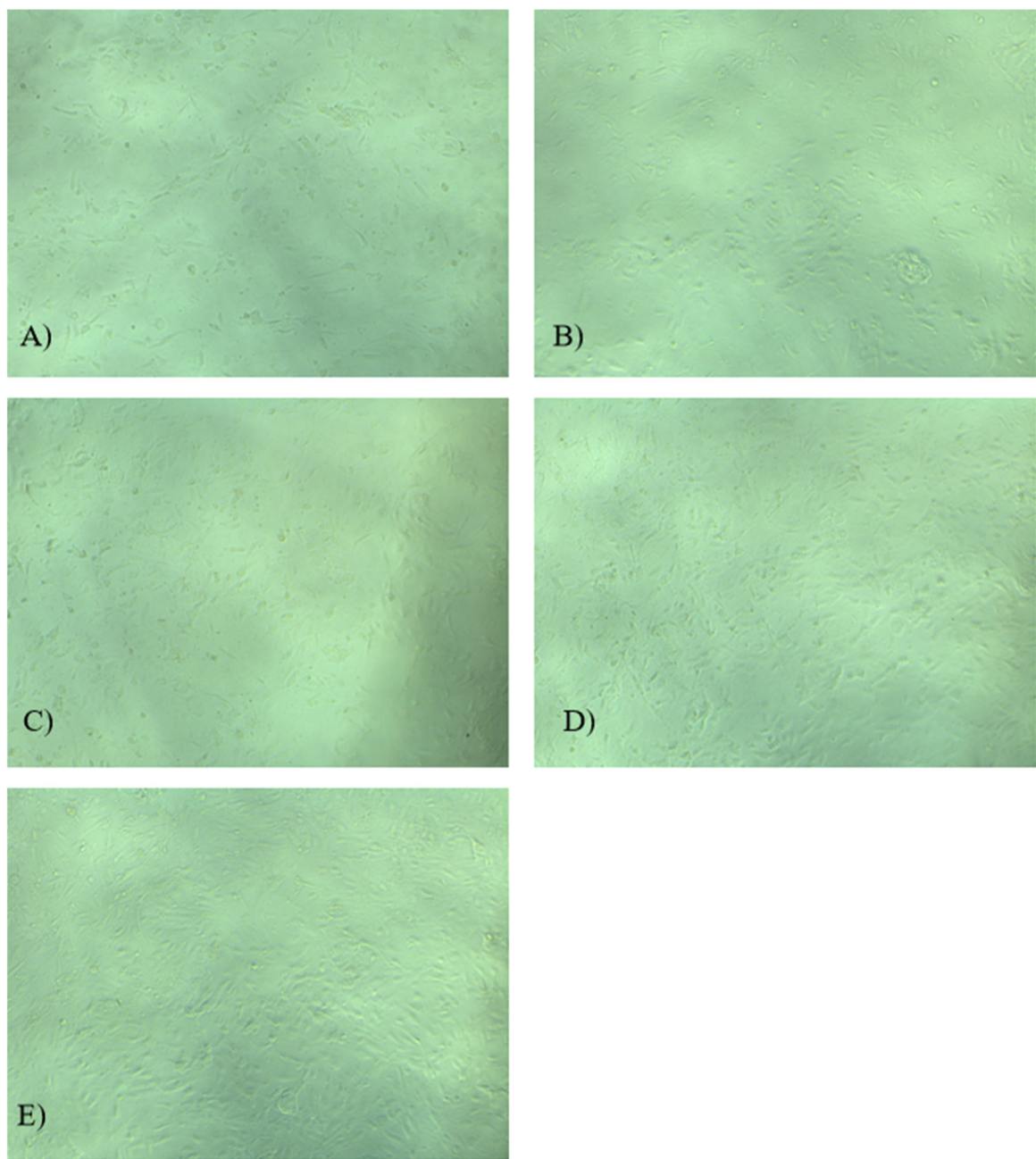
Optimalizácia prebiehala podľa postupu uvedeného v metodike (viď kapitola 4.4.2). Cieľom prvého kroku optimalizácie bolo nájsť vhodný objem matricového gélu (Geltrexu) a koncentráciu buniek (HUVEC) pre vytvorenie optimálneho modelu *in vitro* angiogenézy. Z toho dôvodu boli aplikované rôzne koncentrácie buniek na rôzne objemy Geltrexu. Na nasledujúcich fotkách (viď Obrázok 3 – 6) je možné pozorovať priebeh optimalizácie a aplikáciu rôznych koncentrácií buniek na rôzne objemy Geltrexu. Ako vhodné množstvo Geltrexu na 96 jamkovom paneli bol zvolený objem 50 μ l a optimálna koncentrácia buniek bola 15 000 buniek na jamku.



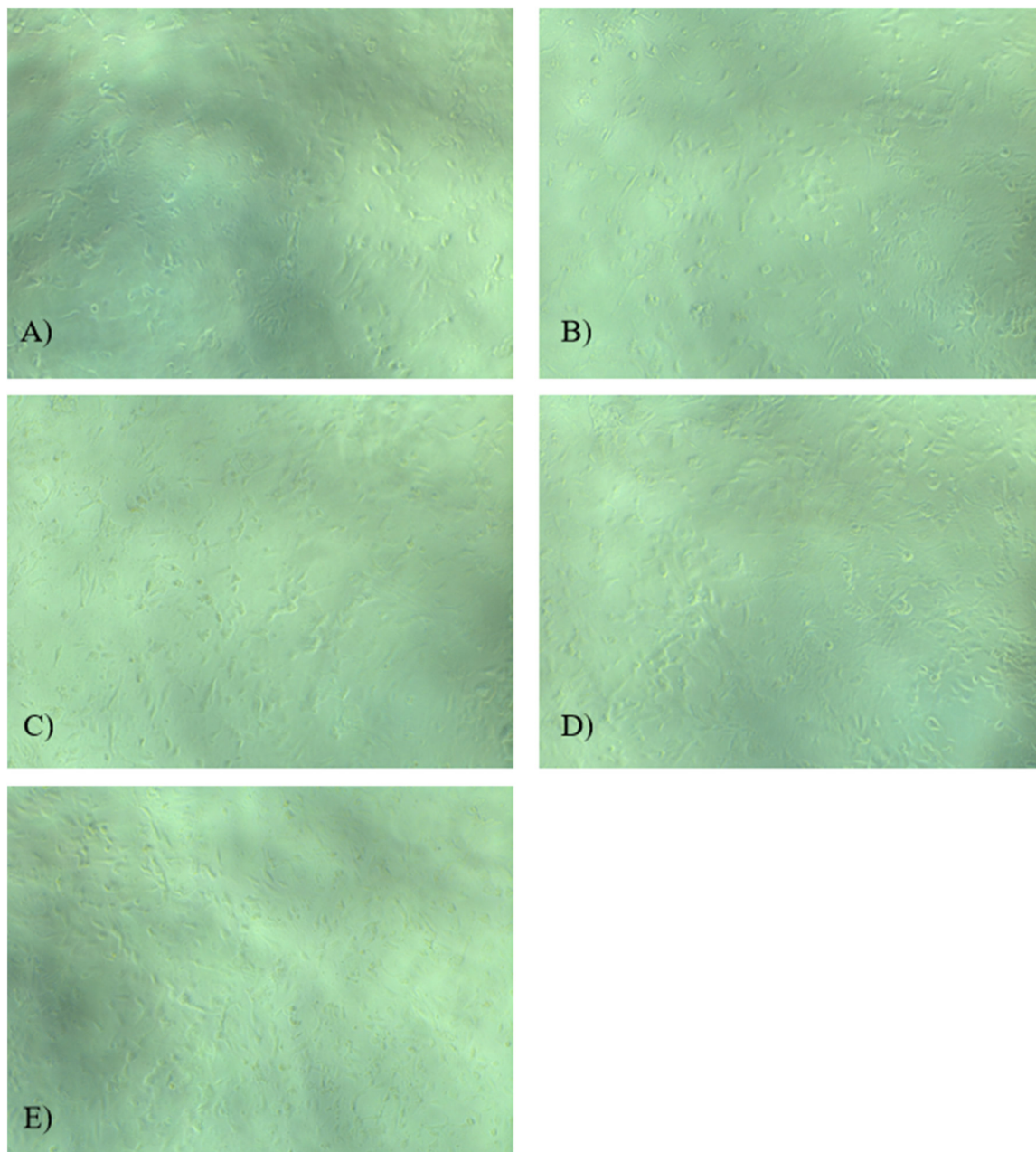
Obrázok 3 – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (50 μ l), po 24 hodinách inkubácie. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie.



Obrázok 4 – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (60 μ l), po 24 hodinách inkubácie. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie.

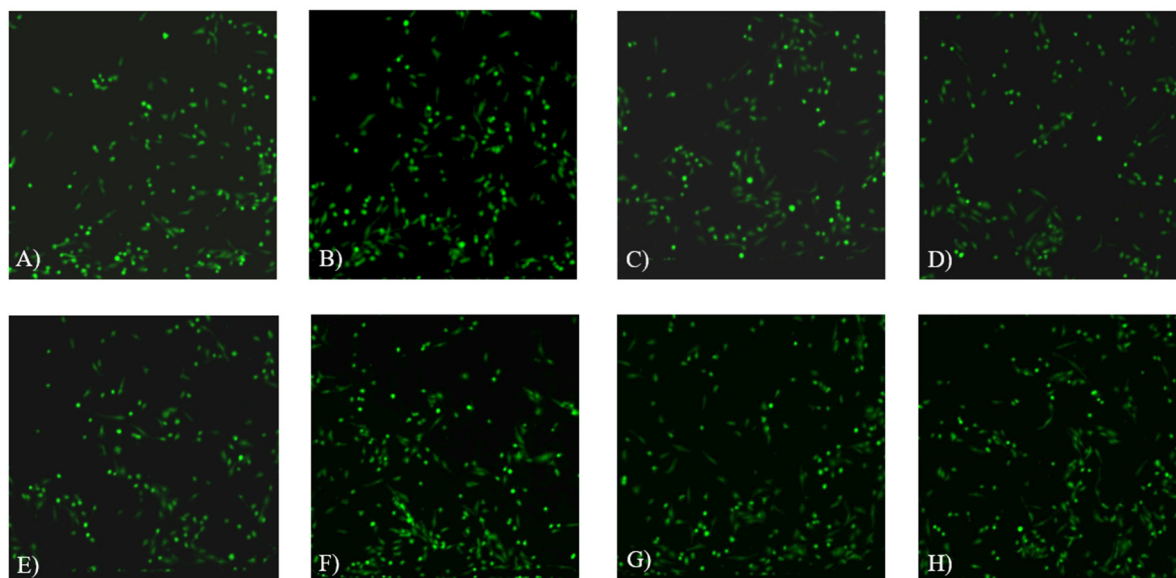


Obrázok 5 – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (75 μ l), po 24 hodinách inkubácie. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie.



Obrázok 6 – Mikroskopická vizualizácia optimalizácie koncentrácie buniek pri stabilnom objeme Geltrexu (90 μ l), po 24 hodinách inkubácie. A) 15 000 buniek na jamku, B) 20 000 buniek na jamku, C) 25 000 buniek na jamku, D) 30 000 buniek na jamku, (E) 35 000 buniek na jamku. Vizualizácia prebehla po 24 hodinách inkubácie.

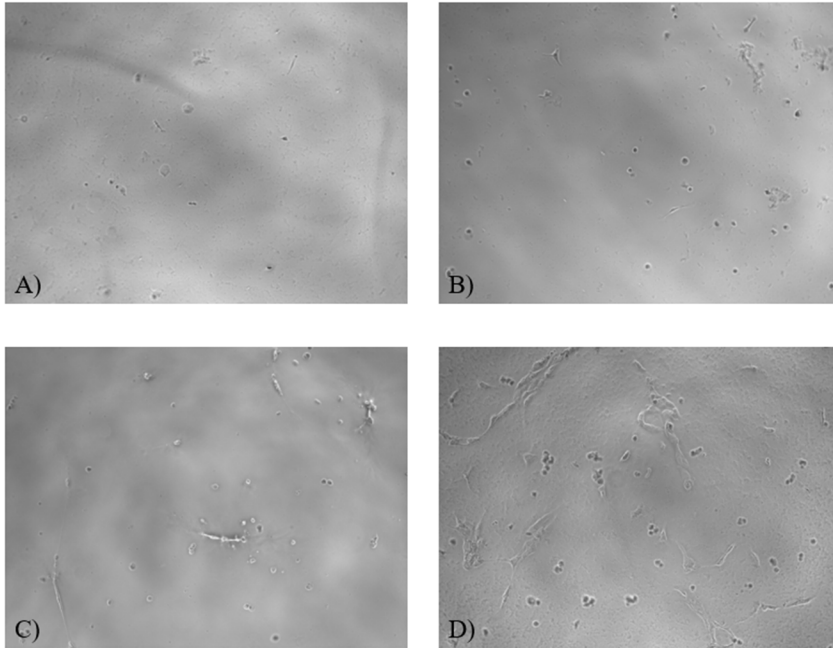
V optimalizovaných podmienkach z prvého kroku, prebehol krok druhý, pri ktorom bola využitá fluorescenčná mikroskopia. Cieľom tohto kroku bolo pozorovanie inhibície angiogenézy za pôsobenia rôznych látok ako je suramin, NECA, MRS120, CI – IB MECA (CIM), AB61, PNH173 a PNH192 (viď Obrázok 7). Angiogénne štruktúry sa však nezačali optimálne vytvárať a nebol pozorovaný zásadný rozdiel medzi neovplyvnenou kontrolou a bunkami ovplyvnenými suraminom, ktorý je preukázaným inhibítorom angiogenézy.



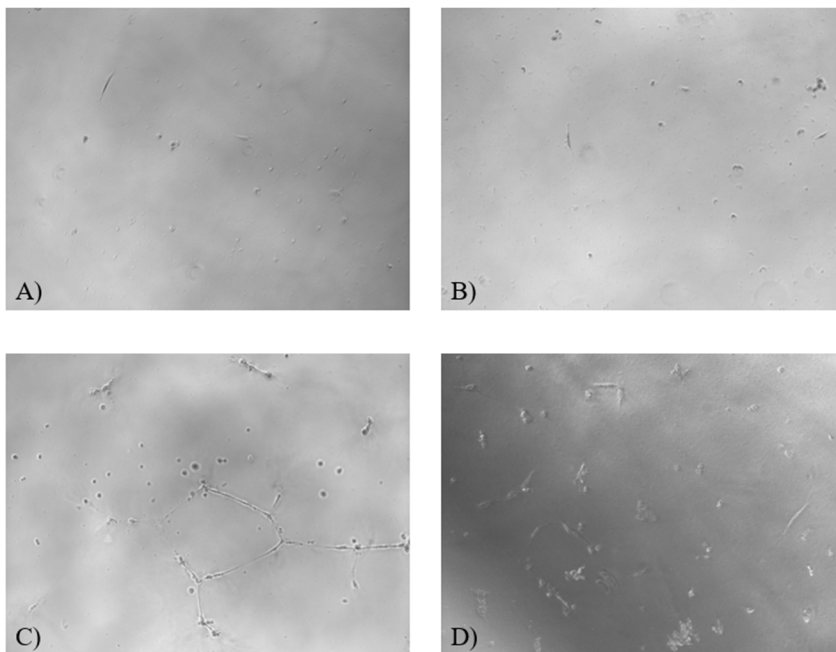
Obrázok 7 - Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 384 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 12,5 μl Geltrexu a 30 μl suspenzie média a buniek o koncentrácii 3 750 buniek na jamku. A) Suramin v koncentrácii 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. B) Neca v koncentrácii 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. C) MRS1220 v koncentrácii 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. D) CIM v koncentrácii 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. E) AB61 v koncentrácii 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. F) PNH173 v koncentrácii 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. G) PNH192 v koncentrácii 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. H) Kontrola bez inhibítorov.

V ďalšom kroku bolo potrebné zoptimalizovať dĺžku inkubácie a veľkosť panelu, pričom bol využitý 6, 12, 24, 96 a 384 jamkový panel. Tento krok prebehol z dôvodu, že sa počas predošlého kroku nezačali angiogénne štruktúry vytvárať optimálne a bolo potrebné zistiť aká dĺžka inkubácie je potrebná pre správnu tvorbu angiogénnych štruktúr. Rôzne veľkosti panelu boli využité, aby bolo možné definovať, ktorý panel je najvhodnejší pre tento druh experimentu. Z dôvodu, že sa na Geltrexe nevytvárali angiogénne štruktúry optimálne, bola otestovaná aj druhý matricový gél, Matrigel. S Matrigelom sa začalo pracovať až v tomto kroku z dôvodu výpadku u dodávateľa.

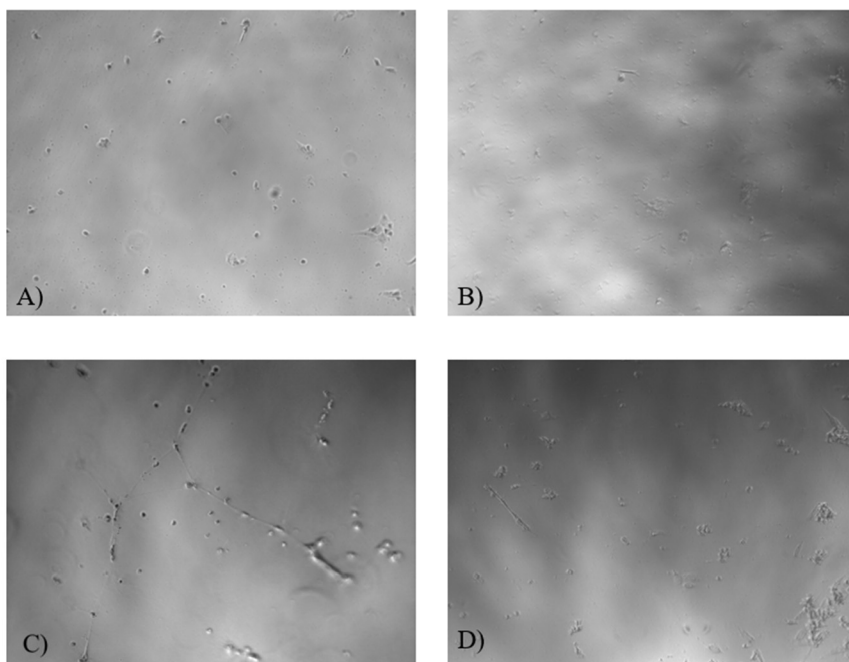
Prvá vizualizácia prebehla po 72 hodinách inkubácie (viď Obrázok 8 – 12). Už po 72 hodinách boli viditeľné markantné rozdiely medzi Matrigelom a Geltrexom. V jamkách, v ktorých bol nanosený Matrigel, sa angiogénne štruktúry tvoriť začali, naopak v jamkách s nanoseným Geltrexom tento jav pozorovaný nebol, a preto bol vyhodnotený ako nevyhovujúci a v nasledujúcich krokoch už nebol využívaný. V jamkách, do ktorých bol pridaný suramin, je viditeľný jeho inhibičný účinok, nakoľko sa v daných jamkách angiogénne štruktúry taktiež nevytvárali optimálne.



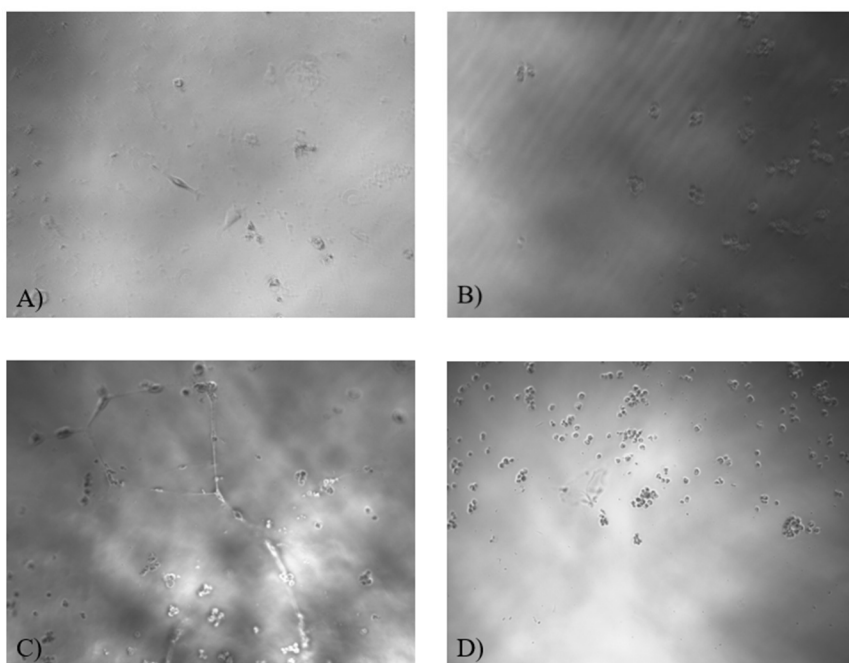
Obrázok 8 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 6 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 800 μ l matrice a 1960 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 165 120 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



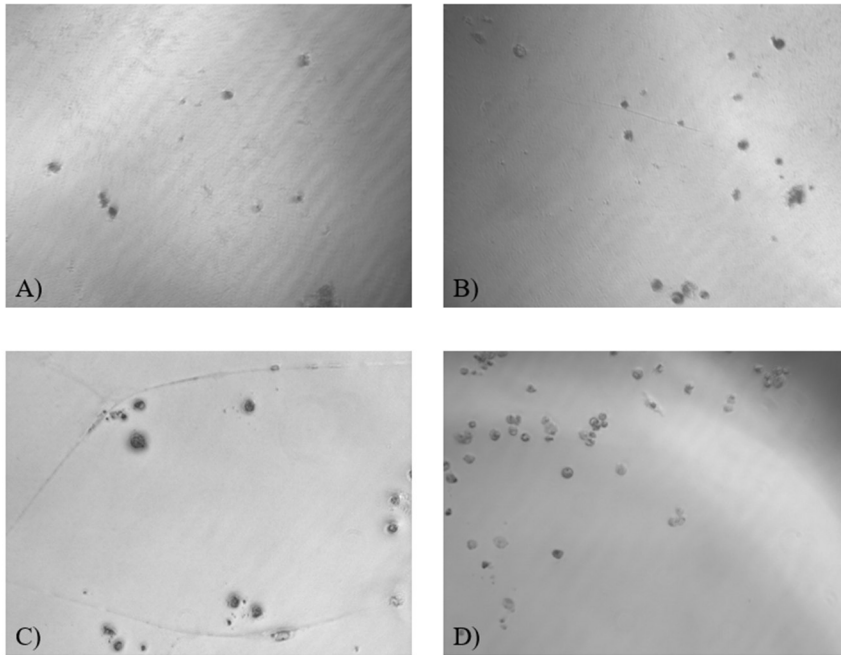
Obrázok 9 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 12 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 400 μ l matrice, 960 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 82 560 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázok 10 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 24 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 200 μ l matrice a 480 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 41 280 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

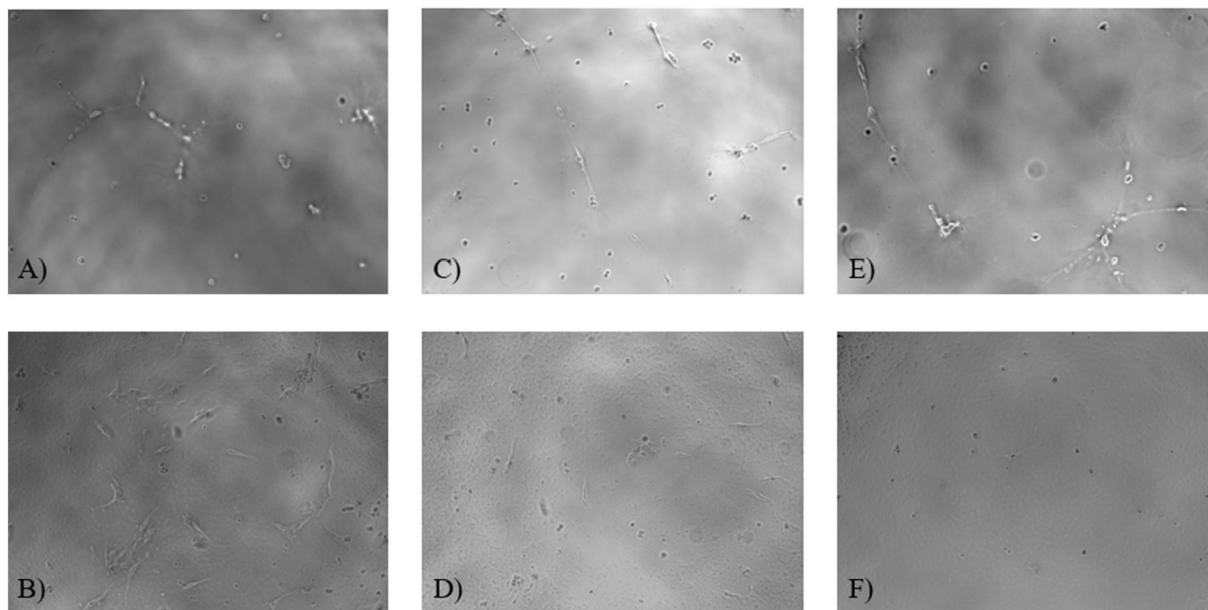


Obrázok 11 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 96 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 50 μ l matrice a 120 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 10 320 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

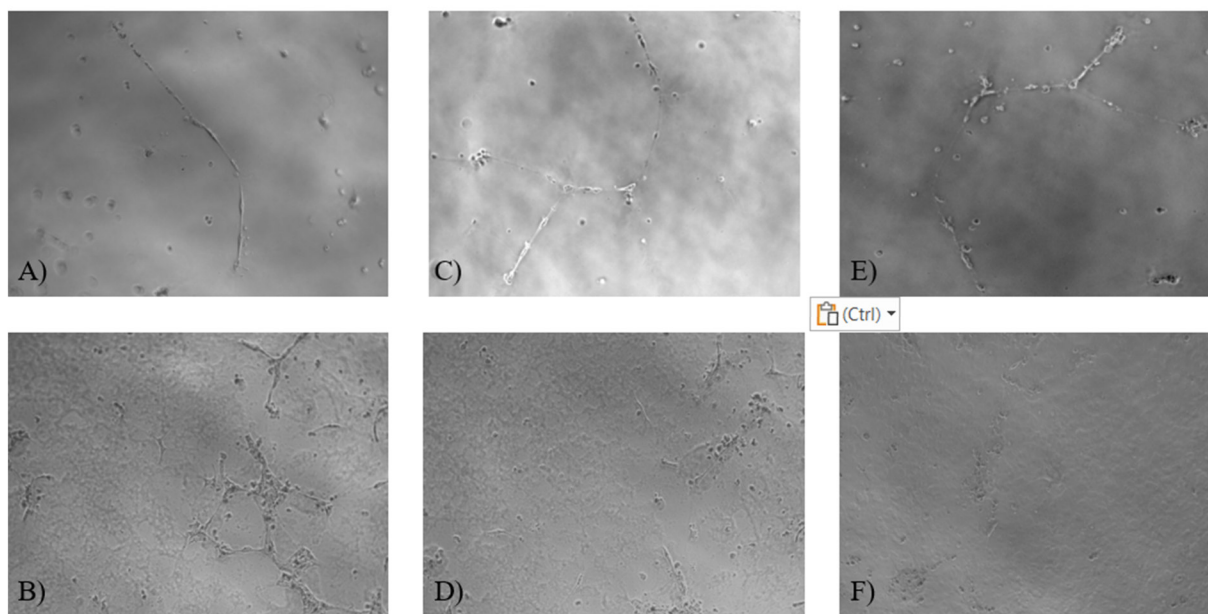


Obrázok 12 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 384 jamkovom paneli, po 72 hodinách s 12,5 μ l matrice a 30 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 2 580 buniek na jamku. A) Geltrex, B) Geltrex a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, C) Matrigel, D) Matrigelu a suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

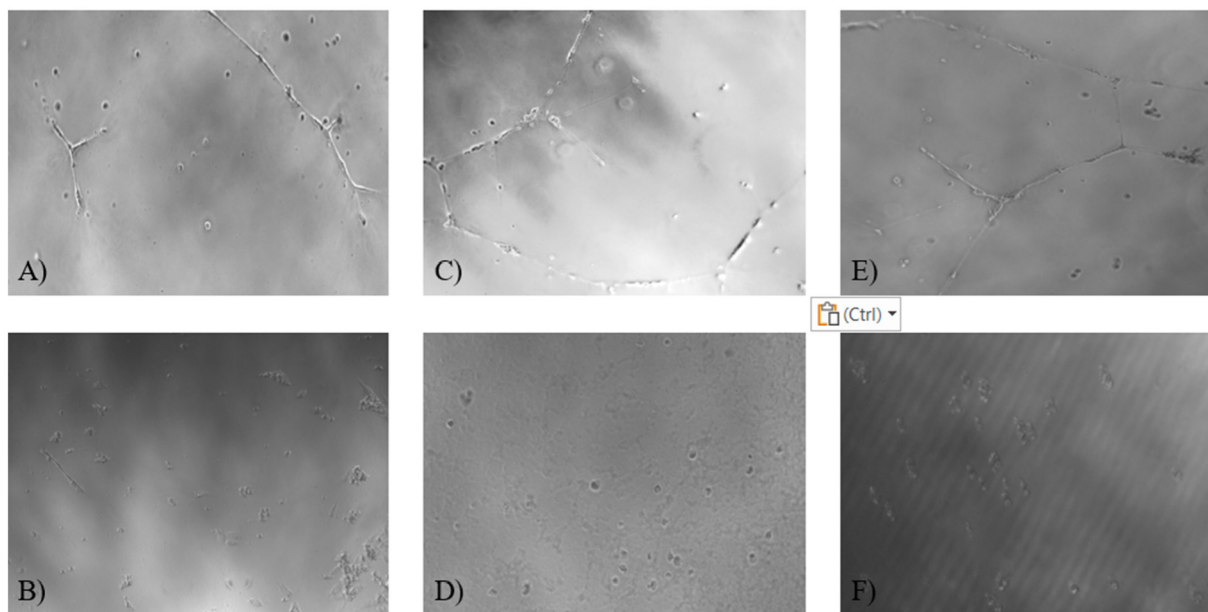
Prvá vizualizácia prebehla po 72 hodinách inkubácie a vzhľadom na to, že sa po tomto časovom úseku začali vytvárať angiogénne štruktúry, tak fotenie prebehlo ešte po ďalších časových úsekoch. Na nasledujúcich fotkách je možné vidieť tvorbu angiogénnych štruktúr na jednotlivých paneloch (6, 12 a 24 jamkový panel) v troch rôznych časových bodoch, a to po 120, 144 a 192 hodinovej inkubácie (viď Obrázok 13 – 15). Vyhodnotenie 384 a 96 jamkového panelu už neprebehlo z dôvodu vyschnutia panelov. V každej jamke s naneseným Matrigelom bola pozorovaná tvorba angiogénnych štruktúr, na rozdiel od Geltrexu, kde bunky adherovali a množili sa, ale nevytvárali sa angiogénne štruktúry. Z tohto dôvodu bol ďalej vizualizovaný už iba Matrigel.



Obrázok 13 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 6 jamkovom paneli s 800 μ l Matrigelu, 1960 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 165 120 buniek na jamku. A) 120 hodín inkubácie, B) 120 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. C) 144 hodín inkubácie, D) 144 hodín, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. E) 192 hodín inkubácie, F) 192 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

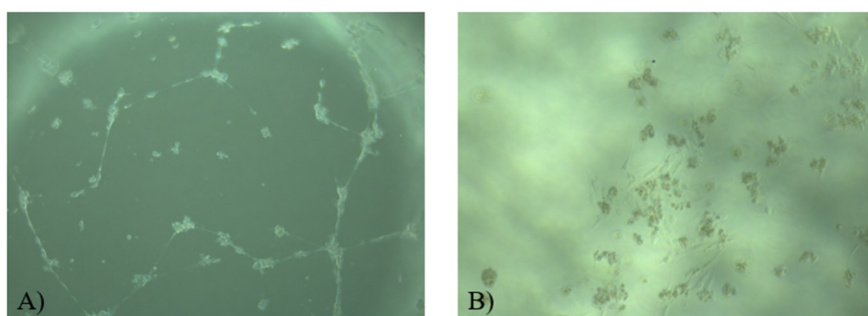


Obrázok 14 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 12 jamkovom paneli s 400 μ l Matrigelu a 960 μ l suspenzie média a buniek o koncentrácii 82 560 buniek na jamku. A) 120 hodín inkubácie, B) 120 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. C) 144 hodín inkubácie, D) 144 hodín, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. E) 192 hodín inkubácie, F) 192 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

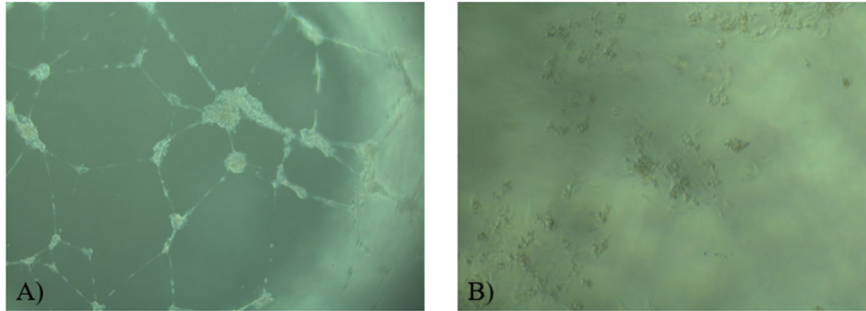


Obrázok 15 – Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 24 jamkovom paneli s 200 μ l Matrigelu a 480 μ l suspenzie média a buniek 41 280 buniek na jamku. A) 120 hodín inkubácie, B) 120 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. C) 144 hodín inkubácie, D) 144 hodín, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. E) 192 hodín inkubácie, F) 192 hodín inkubácie, suramin v koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

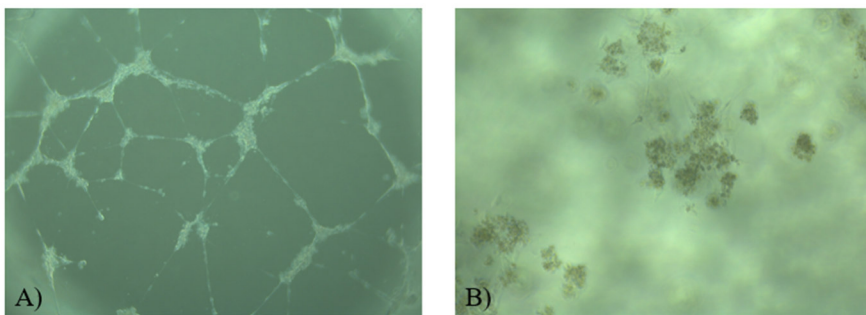
Z už získaných výsledkov sme vychádzali pre finálnu optimalizáciu. Pre tú bol zvolený 96 jamkový panel, nakoľko na ňom bol pozorovaný vznik angiogénnych štruktúr a je vhodnejší pre prípadný skrining látok než väčšie panely. Oproti prvému kroku optimalizácie, kde bola stanovená optimálna koncentrácia 15 000 buniek na jamku, boli nasadené vyššie koncentrácie buniek (30 780, 41 040, 51 300, 61 560, 71 820 buniek na jamku), dôsledkom čoho bol znížený čas tvorby angiogénnych štruktúr (viď Obrázok 16 – 20). Po vyhodnotení bola ako optimálna koncentrácia buniek stanovená hodnota 51 300 – 62 000 buniek na jamku.



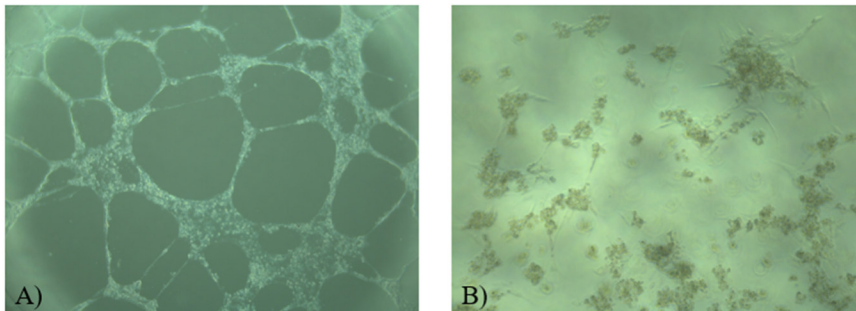
Obrázok 16 - Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μ l Matrigelu, 120 μ l suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 30 780 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



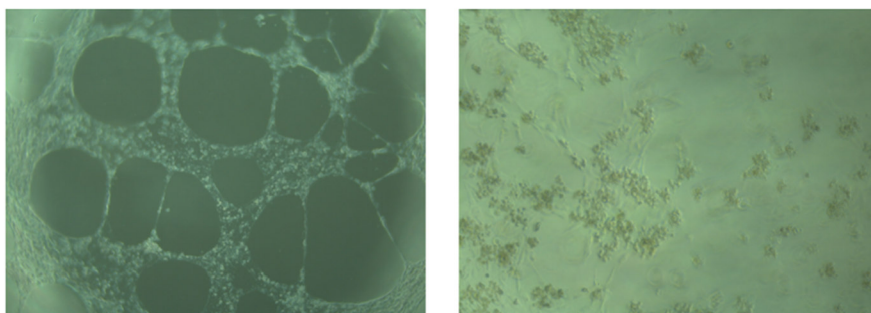
Obrázok 17 - Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μ l Matrigelu, 120 μ l suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 41 040 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázok 18 - Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μ l Matrigelu, 120 μ l suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 51 300 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázok 19 - Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μ l Matrigelu, 120 μ l suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 61 560 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázok 20 - Mikroskopická vizualizácia modelu *in vitro* angiogenézy na 96 jamkovom paneli po 24 hodinách s 50 μ l Matrigelu, 140 μ l suspenzie média a buniek, pričom koncentrácia buniek bola 71 820 buniek na jamku. A) Kontrola. B) Suramin o koncentrácii $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

5.2 MTS test cytotoxicity

Pomocou MTS testu boli stanovené cytotoxické účinky testovaných látok na bunkovú líniu HUVEC (viď Tabuľka 4).

Tabuľka 4 – Hodnoty IC_{50} a smerodajná odchýlka stanovené pomocou MTS testu cytotoxicity

	$\text{IC}_{50} [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	Smerodajná odchýlka
MRS1220	34,387	3,284
Neca	>50	0
CIM	15,872	1,212
Suramin	>200	0
AB61	2,395	1,502
PNH173	0,409	0,150
PNH192	0,385	0,071

6 Diskusia

Štúdium angiogenézy má klinický význam pri rôznych patologických stavoch, ako je napr. rakovina (Evans, 2015). Model *in vitro* angiogenézy je navrhnutý tak, aby stimuloval tvorbu nových krvných ciev. Takýto model má viacero využití, je možné ho ďalej využívať pre klinické testovanie potencionálnych liečiv, alebo pre štúdium procesov diferenciácie endotelových buniek, ako aj skúmanie rôznych molekulárnych mechanizmov spojených s angiogenezou (Ucuzian and Greisler, 2007).

Experimentálna časť mojej bakalárskej práce sa týkala optimalizácie metódy a vytvorenia modelu *in vitro* angiogenézy. Bolo nutné zoptimalizovať niekoľko podmienok, a to typ a objem použitého matricového gélu a koncentráciu buniek za použitia rôzne veľkých panelov. Cieľom prvého kroku optimalizácie bolo nájsť optimálny objem matricového gélu (Geltrexu) a optimálnu koncentráciu buniek za použitia 96 jamkového panelu. Boli testované štyri rôzne objemy Geltrexu (50, 60, 75 a 90 μ l), pričom ako najvhodnejší bol zvolený objem 50 μ l. Vhodné množstvo Geltrexu bolo vyberané podľa schopnosti zaostrenia, avšak zaostrovanie nebolo problematické ani pri jednom zo zvolených objemov. Z dôvodu, že vo viacerých publikáciách bol používaný objem 50 μ l (Zhao *et al.*, 2002; Michaelis *et al.*, 2004; Pierce *et al.*, 2012) bol vyhodnotený aj pre tento experiment ako optimálny. Bola zisťovaná aj optimálna koncentrácia buniek. Po nanesení a následnej vizualizácii 5 rôznych koncentrácií buniek na štyri, už vyššie spomenuté objemy Geltrexu, bola vyhodnotená ako vhodná koncentrácia 15 000 buniek na jamku, ktorá bola ďalej využívaná pri nasledujúcich krokoch optimalizácie. V publikáciách sa tento údaj rôzne líši, v štúdiu Khoo *et al.* (Khoo, Micklem and Watt, 2011) bola použitá rovnaká koncentrácia a to, 15 000 buniek na jamku, ale v štúdiu Zhao *et al.* (Zhao *et al.*, 2002) bola použitá koncentrácia 30 000 buniek na jamku a podľa Pierce *et al.* (Pierce *et al.*, 2012) bolo nasadených 50 000 buniek na jamku. Koncentrácia 15 000 buniek na jamku bola zvolená z dôvodu, že sa v jamke nachádzalo dostatok buniek, ktoré od seba neboli príliš ďaleko, ale ani príliš blízko.

Cieľom ďalšieho kroku bolo pozorovanie vplyvu známeho inhibítora suraminu a vybraných experimentálnych látok (NECA, MRS1220, CI – IB – MECA (CIM), AB61, PNH173, PNH192) na vznik angiogénnych štruktúr pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Pre potreby daného experimentu bolo využité fluorescenčné farbivo calcein AM. V publikáciách sa fluorescenčné farbivo calcein AM bežne využíva pre vizualizáciu (Lu *et al.*, 2022). Angiogénne štruktúry sa však nezačali optimálne vytvárať, a preto nebol pozorovaný zásadný

rozdiel medzi neovplyvnenou kontrolou a bunkami ovplyvnenými suraminom, ktorý je preukázaným inhibítorom angiogenézy (Zaniboni, 1990; Gagliardi *et al.*, 1992).

V rámci tretieho kroku prebehla optimalizácia viacerých podmienok, a to optimalizácia dĺžky inkubácie a veľkosti panelu, za využitia piatich rôzne veľkých panelov, a to z dôvodu, že tvorba angiogénnych štruktúr v predošlom kroku neprebíhala optimálne. Zároveň boli porovnávané dva druhy matricového gélu, Geltrex a Matrigel. Geltrex je Matrigelu podobný v tom, že sú obidva odvodené z nádoru Engelbreth – Holm – Swarm, obsahujú rovnaké hlavné zložky a ako také sa veľmi podobajú svojou štruktúrou (Gargotti *et al.*, 2018). Napriek veľkej podobnosti sa na Geltrexe nezačali optimálne vytvárať angiogénne štruktúry, a preto som vyhodnotila, že pre potreby daného experimentu je vhodnejší Matrigel. Pre potreby optimalizácie dĺžky inkubácie bolo využitých päť panelov rôznych veľkostí a to, 6, 12, 24, 96 a 384 jamkový panel. Po 72 hodinách bola tvorba angiogénnych štruktúr pozorovaná vo všetkých jamkách s Matrigelom s výnimkou tých jamiek, do ktorých bol pridaný suramin. V jamkách s pridaným suraminom, bol pozorovaný jeho inhibičný účinok, nakoľko sa v daných jamkách angiogénne štruktúry nevytvárali optimálne (Bhargava *et al.*, 2007). Najlepšie pozorovateľné angiogénne štruktúry však boli v 12 a 96 jamkovom paneli. Počas neskorších vizualizácií boli angiogénne štruktúry najlepšie pozorovateľné v 12 a 24 jamkovom paneli, nakoľko 96 jamkový panel vyschol a nebolo možné ďalej pozorovať tvorbu angiogénnych štruktúr. Napriek tomu, bol pre ďalší krok zvolený 96 jamkový panel ako optimálny, pretože bol pozorovaný vznik angiogénnych štruktúr a je vhodnejší pre prípadný skrining.

Cieľom posledného optimalizačného kroku bolo urýchlenie procesu tvorby angiogénnych štruktúr pomocou zvýšenia koncentrácie nasadených buniek na 96 jamkovom paneli. Oproti prvému kroku, kde bola zadaná optimálna koncentrácia na 15 000 buniek na jamku, boli teraz testované koncentrácie v rozmedzí 30 780 – 71 820 buniek na jamku. Po 24 hodinovej inkubácii prebehla vizualizácia. Tvorba angiogénnych štruktúr bola pozorovaná pri všetkých zvolených koncentráciách. Na základe tohto kroku optimalizácie bola vyhodnotená najvhodnejšia koncentrácia buniek, v rozmedzí 51 300 – 62 000 buniek. Nakoľko nižšie koncentrácie buniek (30 780 – 41 040 buniek na jamku) tvorili neúplné a tenké angiogénne štruktúry, naopak koncentrácia 71 820 buniek na jamku už bola príliš vysoká a tvorila hrubé angiogénne štruktúry.

7 Záver

Modely *in vitro* angiogenézy sa využívajú na štúdium potencionalných inhibítorov angiogenézy. V rámci experimentálnej časti mojej bakalárskej práce som sa snažila vytvoriť model *in vitro* angiogenézy za použitia dvoch rôznych matricových gélov, Geltrexu a Matrigelu. Pri použití Geltrexu sa angiogénne štruktúry nezačali optimálne vytvárať a z toho dôvodu bol tento matricový gél vyhodnotený ako nevyhovujúci pre daný typ experimentu. Naopak pri použití Matrigelu sa angiogénne štruktúry vytvárali optimálne, a preto bol vyhodnotený ako optimálna matrica pre vývoj modelu *in vitro* angiogenézy. Po prevedení viacerých optimalizačných krokov boli stanovené optimálne podmienky, ktoré udávajú optimálny objem Matrigelu na 50 μ l za použitia 96 jamkového panelu. Ako optimálna koncentrácia buniek bola stanovená 51 300 – 62 000 buniek na jamku.

Vyvinutá metóda bude teraz využívaná pre potreby skríningu nových látok s potencionalným inhibičným účinkom v rámci testovaní na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny.

8 Literatúra

- Adams, J.C. (1997) 'Thrombospondin-1', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(6), pp. 861–865. doi:10.1016/S1357-2725(96)00171-9.
- Almalki, W. *et al.* (2014) 'Assessment methods for angiogenesis and current approaches for its quantification', *Indian Journal of Pharmacology*, 46(3), p. 251. doi:10.4103/0253-7613.132152.
- Auerbach, R. *et al.* (2003) 'Angiogenesis Assays: A Critical Overview', *Clinical Chemistry*, 49(1), pp. 32–40.
- Benny, O. *et al.* (2008) 'An orally delivered small-molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity', *Nat Biotechnol*, 26(7), pp. 799–807. doi:10.1038/nbt1415.
- Bertelsen, L.B. *et al.* (2011) 'Vascular effects of plinabulin (NPI-2358) and the influence on tumour response when given alone or combined with radiation', *Int J Radiat Biol.*, 87(11), pp. 1126–1134. doi:10.3109/09553002.2011.605418.
- Bhargava, S. *et al.* (2007) 'Suramin Inhibits Not Only Tumor Growth and Metastasis but Also Angiogenesis in Experimental Pancreatic Cancer'. doi:10.1007/s11605-006-0081-z.
- Borkakoti, N. (1998) 'Matrix metalloproteases: variations on a theme.', *Progress in biophysics and molecular biology*, 70(1), pp. 73–94. doi:10.1016/s0079-6107(98)00003-0.
- Bornstein, P. (2009) 'Thrombospondins function as regulators of angiogenesis', *J Cell Commun Signal*, 3, pp. 189–200. doi:10.1007/s12079-009-0060-8.
- Bos, R. *et al.* (2001) 'Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 During Breast Carcinogenesis', *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), pp. 309–314. doi:10.1093/jnci/93.4.309.
- Buschmann, I. and Schaper, W. (1999) 'Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth', *News Physiol Sci*, 14, pp. 121–125.
- Carmeliet, P. (2000) 'Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis', *Nature medicine*, 6(3), pp. 389–395.
- Carmeliet, P. (2005a) 'Angiogenesis in life, disease and medicine', *Nature*, pp. 932–936. doi:10.1038/nature04478.

- Carmeliet, P. (2005b) 'VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer', *Oncology*, 69(Suppl. 3), pp. 4–10. doi:10.1159/000088478.
- Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A. and Ballmer-Hofer, K. (2006) 'The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(5), pp. 601–615. doi:10.1007/s00018-005-5426-3.
- Couffinhal, T. *et al.* (1997) 'Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) in Normal and Atherosclerotic Human Arteries', *American journal of Pathology*, 150(5), pp. 1673–1685.
- Davis, S. *et al.* (1996) 'Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning', *Cell*, 87(7), pp. 1161–1169. doi:10.1016/S0092-8674(00)81812-7.
- Evans, I. (2015) 'In vitro angiogenesis assays', *Methods in Molecular Biology*, 1332, pp. 143–150. doi:10.1007/978-1-4939-2917-7_10.
- Felmeden, D.C., Blann, A.D. and Lip, G.Y.H. (2003) 'Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease'. doi:10.1016/S0195-668X(02)00635-8.
- Ferrara, N. (2004) 'Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress'. doi:10.1210/er.2003-0027.
- Folkman, J. (2001) 'Angiogenesis-Dependent Diseases', *Seminars in Oncology*, 28(6), pp. 536–542.
- Folkman, J. and Shing, Y. (1992) 'Angiogenesis.', *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), pp. 10931–10934. doi:10.1016/S0021-9258(19)49853-0.
- Fraser, H.M. (2006) 'Regulation of the ovarian follicular vasculature', *Reproductive Biology and Endocrinology*. doi:10.1186/1477-7827-4-18.
- Fujita, Y., Abe, R. and Shimizu, H. (2008) 'Clinical Approaches Toward Tumor Angiogenesis: Past, Present and Future', *Current Pharmaceutical Design*, 14, pp. 3820–3834.
- Gacche, R.N. (2015) 'Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness', *Oncogenesis*, 4, p. 153. doi:10.1038/oncsis.2015.14.
- Gagliardi, A., Hadd, H. and Collins, D.C. (1992) 'Inhibition of Angiogenesis by Suramin', *CANCER RESEARCH*, 52, pp. 5073–5075.

- Gargotti, M. *et al.* (2018) ‘Comparative studies of cellular viability levels on 2D and 3D in vitro culture matrices’, *Cytotechnology*, 70(1), pp. 261–273. doi:10.1007/s10616-017-0139-7.
- Gastl, G. *et al.* (1997) ‘Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment Angiogenesis Neovascularization Angiogenic inhibitor The Role of A ngiogenesis in Neoplastic Disease’, *ONCOLOGY*, 54, pp. 177–184.
- Gridelli, C. *et al.* (2009) ‘Vascular disrupting agents: a novel mechanism of action in the battle against non-small cell lung cancer.’, *The oncologist*, 14(6), pp. 612–20. doi:10.1634/theoncologist.2008-0287.
- Griffith, E.C. *et al.* (1998) ‘Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2 (TNP-470cancerendothelialcatalysis)’, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, pp. 15183–15188.
- Hagedorn, M. and Bikfalvi, A. (2000) ‘Target molecules for anti-angiogenic therapy: From basic research to clinical trials’, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 34(2), pp. 89–110. doi:10.1016/S1040-8428(00)00056-1.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) ‘Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis’, *Cell*, 86(3), pp. 353–364. doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Harris, A.L. (2003) ‘Angiogenesis as a new target for cancer control’, *European Journal of Cancer Supplements*, 1(2), pp. 1–12. doi:10.1016/S1359-6349(03)00007-7.
- Heldin, C.-H. (2003) ‘Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)’, *Encyclopedia of Hormones*, pp. 231–237. doi:10.1016/B0-12-341103-3/00237-0.
- Hoekstra, R. *et al.* (2005) ‘Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 in patients with advanced cancer’, *Journal of Clinical Oncology*, 23(22), pp. 5188–5197. doi:10.1200/JCO.2005.05.013.
- Huh, J.-E. *et al.* (2005) ‘Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen-activated protein kinase pathways.’, *Carcinogenesis*, 26(8), pp. 1436–45. doi:10.1093/carcin/bgi097.
- Italiano Jr, J.E. *et al.* (2008) ‘Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro-and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet granules and differentially released’. doi:10.1182/blood-2007-09-113837.

- Kamura, T. *et al.* (2000) 'Activation of HIF1 ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex', *National Institutes of Health*, 97(19), pp. 10430–10435.
- Kay, N.E. *et al.* (2001) 'Angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia Commentary on "Clinical relevance of Flt1 and Tie1 angiogenesis receptors expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)" by', *Leukemia Research*, 25, pp. 485–486.
- Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J.H. and Schellens, J.H.M. (2010) 'Bevacizumab', *The Oncologist*, 15(8), pp. 819–825. doi:10.1634/theoncologist.2009-0317.
- Khoo, C.P., Micklem, K. and Watt, S.M. (2011) 'A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the matrigel assay in vitro', *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 17(9), pp. 895–906. doi:10.1089/ten.tec.2011.0150.
- Kieran, M.W., Kalluri, R. and Cho, Y.-J. (2012) 'The VEGF Pathway in Cancer and Disease: Responses, Resistance, and the Path Forward', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12). doi:10.1101/cshperspect.a006593.
- Kim, B. *et al.* (2000) 'Angiostatin and Endostatin: Endogenous inhibitors of tumor growth', *Cancer and Metastasis Reviews*, 19, pp. 181–190.
- Klein, T. and Bischoff, R. (2011) 'Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases', *Amino Acids*, 41, pp. 271–290. doi:10.1007/s00726-010-0689-x.
- Klener, P. (2002) 'Angiogeneze a nádorová onemocnění', *Editorial*, pp. 1–8.
- Klener, P. (2005) 'Význam inhibice angiogeneze v protinádorové léčbě', *Remedia*, 15(4–5), pp. 384–389.
- Klener P (2010) 'Angiogeneze jako součást nádorového „ekosystému“ a možnosti jejího ovlivnění', *Klinická Onkologie*, 23(1), pp. 14–20.
- Knighton, D.R., Silver, I.A. and Hunt, T.K. (1981) 'Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration.', *Surgery*, 90(2), pp. 262–70.
- Kuwano, M. *et al.* (2001) 'Angiogenesis Factors', *Internal Medicine*, 40(7), pp. 565–572.
- Lawler, J. (2000) 'The functions of thrombospondin-1 and -2', *Cell-to-cell contact and extracellular matrix*, 12(5), pp. 634–640.

- Liekens, S., de Clercq, E. and Neyts, J. (2001) 'Angiogenesis: regulators and clinical applications.', *Biochemical pharmacology*, 61(3), pp. 253–70. doi:10.1016/s0006-2952(00)00529-3.
- Lu, C. *et al.* (2022) 'Microcurrent Reverses Cigarette Smoke-Induced Angiogenesis Impairment in Human Keratinocytes In Vitro', *Bioengineering*, 9(9). doi:10.3390/bioengineering9090445.
- Lukešová, Š. *et al.* (2006) 'Nádorová angiogeneze', *Vnitř. Lék.*, 52, pp. 797–800.
- Malich, G., Markovic, B. and Winder, C. (1997) 'The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines', *Toxicology*, 124(3), pp. 179–192. doi:10.1016/S0300-483X(97)00151-0.
- Meadows, K.L. and Hurwitz, H.I. (2012) 'Anti-VEGF therapies in the clinic', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10). doi:10.1101/cshperspect.a006577.
- Michaelis, M. *et al.* (2004) 'Valproic Acid Inhibits Angiogenesis in Vitro and in Vivo', *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 65(3), pp. 520–527.
- Neufeld, G. *et al.* (1999) 'Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors', *The FASEB Journal*, 13, pp. 9–22.
- Novotný, J. and Zikán, M. (2010) 'Nádorová angiogeneze', *Klinická farmakologie a farmacie*, 24, pp. 124–126.
- Ohh, M. *et al.* (2000) 'Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein', *NATURE CELL BIOLOGY*, 2, p. 423.
- O'Reilly, M.S. *et al.* (1994) 'Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma', *Cell*, 79(2), pp. 315–328. doi:10.1016/0092-8674(94)90200-3.
- O'Reilly, M.S. *et al.* (1997) 'Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.', *Cell*, 88(2), pp. 277–85. doi:10.1016/s0092-8674(00)81848-6.
- Pandya, N.M., Dhalla, N.S. and Santani, D.D. (2006) 'Angiogenesis—a new target for future therapy', *Vascular Pharmacology*, 44(5), pp. 265–274. doi:10.1016/j.vph.2006.01.005.
- Pang, R. and Poon, R.T.P. (2006) 'Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma', *Cancer Letters*, 242(2), pp. 151–167. doi:10.1016/j.canlet.2006.01.008.

- Papetti, M. and Herman, I.M. (2002) 'invited review Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis', *AJP-Cell Physiol*, 282, pp. c947–c970. doi:10.1152/ajpcell.00389.2001.-Often.
- Park, M.-J. *et al.* (2007) 'Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor.', *The Journal of biological chemistry*, 282(42), pp. 30485–96. doi:10.1074/jbc.M701081200.
- Patrick, G. (2017) *Introduction to Medicinal Chemistry*. 6th edn. Oxford University Press.
- Pierce, A.D. *et al.* (2012) 'Glucose-activated RUNX2 phosphorylation promotes endothelial cell proliferation and an angiogenic phenotype', *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), pp. 282–292. doi:10.1002/jcb.23354.
- Pike, S.E. *et al.* (1998) 'Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth', *Journal of Experimental Medicine*, 188(12), pp. 2349–2356. doi:10.1084/jem.188.12.2349.
- Rusk, A. *et al.* (2006) 'Preclinical Evaluation of Antiangiogenic Thrombospondin-1 Peptide Mimetics, ABT-526 and ABT-510, in Companion Dogs with Naturally Occurring Cancers', *Clin Cancer Res*, 12(24), pp. 7444–7455. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0109.
- Rydlova, M. *et al.* (2008) 'Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases.', *Anticancer research*, 28(2B), pp. 1389–97.
- Scappaticci, F.A. (2002) 'Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies.', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(18), pp. 3906–27. doi:10.1200/JCO.2002.01.033.
- Shih, T. and Lindley, C. (2006) 'Bevacizumab: An angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies', *Clinical Therapeutics*, 28(11), pp. 1779–1802. doi:10.1016/J.CLINTHERA.2006.11.015.
- Stryker, Z.I. *et al.* (2019) 'biomedicines Evaluation of Angiogenesis Assays'. doi:10.3390/biomedicines7020037.
- Tat, C.N. *et al.* (2015) 'Comparison of invasion by human microvascular endothelial cell lines in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in a three-dimensional (3D) cell culture system', *Malaysian J Pathol*, 37(3), pp. 219–225.

Teven, C.M. *et al.* (2014) 'Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases', *Genes and Diseases*, 1(2), pp. 199–213. doi:10.1016/J.GENDIS.2014.09.005.

Sadler, T.W. (2010) *Langmanova lékařská embryologie*. 10th edn. Edited by M.DrSc. prof. MUDr. Grima and O.Ph.D. doc. MUDr. Naňka. Praha: Grada.

Ucuzian, A.A. and Greisler, H.P. (2007) 'In vitro models of angiogenesis', *World Journal of Surgery*, 31(4), pp. 654–663. doi:10.1007/s00268-006-0763-4.

Vailhé, B., Vittet, D. and Feige, J.-J. (2001) 'In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis', *Laboratory Investigation*, 81(4).

Vinay Kumar, Abul Abbas and Jon Aster (2020) *Robbins & Cotran Pathologic basis of disease*. 10th edn. Elsevier .

Witz, I.P. (2009) 'The Tumor Microenvironment: The Making of a Paradigm', *Cancer Microenvironment*, Suppl 1, pp. 9–17. doi:10.1007/s12307-009-0025-8.

Zaniboni, A. (1990) 'Suramin the discovery of an old anticancer drug', *Med. Oncol. & Tumor Pharrnacother*, 7(4).

Zhao, X., Lu, X. and Feng, Q. (2002) 'Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 238(6), pp. H2371–H2378. doi:10.1152/ajpheart.00383.2002.-We.

Zhao, Y. and Adjei, A.A. (2015) 'New Drug Development and Clinical Pharmacology Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor', *The Oncologist*, 20(6), pp. 660–673. doi:10.1634/theoncologist.2014-0465.