

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Hodnocení exprese iNOS a HO-1 v aortě myši s vysokými
hladinami sérového endoglinu pomocí Western blot analýzy**

**Western blot analysis of iNOS and HO-1 protein expression in
aorta of mice with high soluble endoglin levels**

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

Hradec Králové, 2015

Kristýna Tysoňová

„Moc ráda bych poděkovala PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, za cenné rady i čas, který mi kdykoliv poskytla. Další poděkování patří i ostatním zaměstnancům Katedry biologických a lékařských věd, kteří byli i nad rámec své práce ochotni vždy se vším poradit. Děkuji také svým blízkým a hlavně rodičům, kteří mě po celou dobu studia plně podporovali.“

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

V Hradci Králové, dne:

Podpis:

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Hodnocení exprese iNOS a HO-1 v aortě myši s vysokými hladinami sérového endoglinu pomocí Western blot analýzy

Autor diplomové práce: Kristýna Tysoňová

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

Cíl práce: Záměrem této diplomové práce bylo zhodnotit rozdíly exprese iNOS a HO-1 (markery nitračního/oxidačního stresu) v aortě dvou skupin geneticky modifikovaných myši na cholesterolové dietě, které se lišily hladinami lidského sérového endoglinu.

Metody: Pro studii se použily 6 měsíců staré transgenní myši samice kmene CBaxC57BL/6J s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu. Pomocí ELISA analýzy byla stanovena hladina tohoto endoglinu a myši byly rozděleny do dvou srovnávaných skupin. Sledovaná skupina (*Sol-Eng*⁺) vykazovala vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu a jejich sourozenské myši s nízkými (nedetekovatelnými) plazmatickými hladinami lidského endoglinu byly použity jako myši kontrolní. Po dobu 3 měsíců byly obě skupiny krmeny speciální stravou s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Biochemickou analýzou byla zjištěna hladina celkového cholesterolu. Pro detekci a kvantifikaci exprese markerů iNOS a HO-1 byla použita analýza Western blot.

Výsledky: Po tříměsíční cholesterolové dietě se skupina myši *Sol-Eng*⁺ v hladinách celkového cholesterolu nelišila v porovnání se skupinou kontrolních myši. Western blot analýza prokázala statisticky významně vyšší expresi HO-1, a to v hodnotě 222,6% i signifikantně vyšší expresi iNOS ve skupině *Sol-Eng*⁺ v hodnotě 221,5% oproti kontrolní skupině (100% pro oba markery).

Závěr: Výsledky uvedené v této práci dokládají, že při podání cholesterolové diety může zvýšený sérový endoglin indukovat expresi markerů oxidačního/nitračního stresu v aortě transgenních myši, což teoreticky může přispívat k dysfunkci endotelu. Zda se sérový endoglin skutečně podílí na indukci funkčního poškození cév, to mohou naznačit další studie.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Western blot analysis of iNOS and HO-1 protein expression in aorta of mice with high soluble endoglin levels

Author of diploma thesis: Kristýna Tysoňová

Supervisor: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Background: The aim of this thesis was to evaluate differences in the expression of iNOS and HO-1 (markers of nitration/oxidative stress) in the aorta of two groups of genetically modified mice on cholesterol diet that differed in levels of human soluble endoglin.

Methods: For the study we used 6 months old female transgenic mice on a CBAxC57BL/6J strain background with high level of human soluble endoglin. Using the ELISA analysis, soluble endoglin levels was determined and mice were divided into two groups according to the levels. The study group (*Sol-Eng*⁺) showed high levels of human soluble endoglin and their sibling mice with low (undetectable) plasma levels of the human endoglin were used as control group. Both groups were fed a special high fat and cholesterol diet for a period of 3 months. Biochemical analysis revealed total cholesterol levels. For detection and quantification of iNOS and HO-1 Western blot analysis was used.

Results: After three months on cholesterol diet, the *Sol-Eng*⁺ group did not differ in the levels of total cholesterol in comparison with the control group. Western blot analysis showed a statistically significant higher HO-1 expression in the *Sol-Eng*⁺ mice in the value of 222,6% as well as iNOS expression increase 221,5% in comparison with the control group (100% for both markers).

Conclusions: The results presented in this study demonstrate that on cholesterol diet the increased soluble endoglin may induce the expression of markers of oxidative/nitration stress in transgenic mice aorta, which theoretically may contribute to endothelial dysfunction. Further studies may indicate whether the soluble endoglin is really involved in the induction of functional vascular damage.

SEZNAM ZKRATEK

APS= persíran amonný (ammonium persulfate)

AT II= angiotenzin II

BH₂= dihydrobiopterin

BH₄= tetrahydrobiopterin

BSA= bovinní sérový albumin

BVR= biliverdin reduktáza

CD 105= endoglin

cGMP= cyklický guanosinmonofosfát

CO= oxid uhelnatý

EDHF= endoteliální hyperpolarizační faktor

EGR-1= transkripční faktor (early growth response-1)

ELISA= enzymová metoda detekce antigenu (enzyme – linked immuno sorbent assay)

eNOS / NOS-III= endoteliální syntáza oxidu dusnatého

ET-1= endotelin-1

FAD= flavinadenindinukleotid

FMN= flavinmononukleotid

GAPDH= glycerinaldehyd – 3 – fosfát dehydrogenáza

GM-CSF= faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte macrophage-colony stimulating

HDL= lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)

HHT-1= hereditární hemoragická telangiektázie

HO= hemoxygenáza

HRP= křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)

HSP= heat-shock proteiny

ICAM-1= leukocytární adhezní molekula-1 (intercellular cell adhesion molecule-1)

IFN- γ = interferon gama

IgG= imunoglobulin G (protilátka)

IL-1= interleukin-1

IL-10= interleukin-10

IL-6= interleukin-6

iNOS / NOS-II= inducibilní syntáza oxidu dusnatého

LDL= lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)

MCP-1= monocytární chemotaktický protein-1 (monocyte chemotactic protein-1)

M-CSF= faktor stimuluující kolonie makrofágů (macrophage-colony stimulating factor)

MMP-14 / MT1-MMP= membránový typ matrix metaloproteinázy-1

NADPH= nikotinamidadeninukleotidfosfát

NF κ B= nukleární faktor kappa B

nNOS / NOS-I= neuronální syntáza oxidu dusnatého

NO= oxid dusnatý

NOS= syntáza oxidu dusnatého

PAI-1= inhibitor aktivátoru plazminogenu

PDGF= růstový faktor uvolněný z trombocytů

PGI₂= prostacyklin

PLGF= placentární růstový faktor

RNS= reakční formy dusíku (reactive nitrogen species)

ROS= reakční formy kyslíku (reactive oxygen species)

RTG= rentgenové

SDS= dodecylsírán sodný (sodiumdodecylsulfate)

sENG / sCD 105= sérový (solubilní) endoglin

sFlt1= solubilní receptor tyrozinkinázového typu-1

SGC= solubilní guanylátcykláza

Smad= intracelulární signální protein

TEMED= N, N, N', N' – tetramethylethyldiamin

TGF- β = transformující růstový faktor beta

TNF- α = tumor nekrotizující faktor

t-PA= tkáňový aktivátor plazminogenu

TRIS base= tris(hydroxymethyl)aminomethane

TWEEN= polyoxyethylensorbitanmonolaurate

TXA II= tromboxan A2

T β R-I= receptor typu I pro transformující růstový faktor beta

T β R-II= receptor typu II pro transformující růstový faktor beta

T β R-III= receptor typu III pro transformující růstový faktor beta

VCAM-1= vaskulární buněčná adhezní molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1)

VEGF= vaskulární endoteliální růstový faktor

ZP= zona pellucida

OBSAH

1. ÚVOD.....	11
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 Stavba cévní stěny.....	13
2.2 Endotel.....	15
2.2.1 Role a funkce endotelových buněk.....	15
2.2.2 Endotelová dysfunkce.....	17
2.2.3 Oxidační, nitrační stres a dysfunkce endotelu.....	19
2.3 Oxid dusnatý (NO).....	21
2.3.1 NO-syntáza a její izoformy.....	22
2.4 Hemoxygenáza (HO).....	24
2.4.1 HO-1 a její účinky.....	24
2.4.2 Protektivní účinky HO-1 při zánětu a poškození cévy.....	26
2.5 Transformující růstový faktor beta (TGF- β).....	28
2.5.1 Význam a charakteristika.....	28
2.5.2 TGF- β a ateroskleróza.....	29
2.6 Endoglin.....	32
2.6.1 Struktura, exprese a funkce endoglinu.....	32
2.6.2 Endoglin a NO.....	33
2.6.3 Role CD 105 v aterogenezi.....	34
2.6.4 Sérový endoglin.....	35
3. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
4.1 Použitá zvířata.....	39
4.2 Pracovní postup pro Western blot analýzu.....	40
4.2.1 Homogenizace a izolace proteinů.....	40
4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku.....	40
4.2.3 Zpracování vzorků.....	42
4.2.4 Western blot analýza.....	42
4.2.4.1 Příprava roztoků pro analýzu Western blot.....	42
4.2.4.2 Příprava gelů.....	45

4.2.4.3	Příprava vzorků	47
4.2.4.4	Aplikace vzorků a elektroforéza	47
4.2.4.5	Blotování polosuchou cestou	48
4.2.4.6	Imunodetekce	50
4.2.4.7	Chemiluminiscenční detekce	51
4.2.4.8	Statistická analýza	52
5.	VÝSLEDKY	53
5.1	Biochemická analýza	53
5.2	Western blot analýza	54
6.	DISKUZE	57
7.	ZÁVĚR	60
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

1. ÚVOD

I když se v posledních letech snažíme zajistit kvalitní terapii a dochází k nespornému zlepšení prevence, zůstává kardiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou morbidit a mortality v řadě vyspělých zemí světa. Příčina a progresse vaskulárního onemocnění úzce souvisí se stavem vnitřní stěny cévy a její normální funkcí. Zánětlivé onemocnění arteriální stěny, jako je ateroskleróza, vede ke změnám cévního lumen a následným komplikacím, které často vyústí v závažné akutní ischemické syndromy. Bohužel v iničiálních fázích rozvoje tohoto procesu nejsou příznaky a komplikace klinicky zřejmé. Jsou zjistitelné pouze na základě funkční změny cévy, která souvisí s porušením buněk endotelu, známé také pod pojmem endotelová dysfunkce.

Za poškozením endotelu stojí řada faktorů. Může se jednat o mechanické, biochemické, toxické nebo imunologické vlivy, působení rizikových faktorů aterosklerózy a oxidační stres. Aktivované endotelové buňky se potom vyznačují zvýšenou propustností cévní stěny, proliferací buněk hladkého svalstva, prozánětlivým stavem a zvýšenou expresí adhezních molekul a cytokinů.

V této diplomové práci jsme se věnovali studiu TGF- β receptoru III, který je součástí signalizace TGF- β cytokinu, konkrétně jeho sérové (solubilní) formě, s možným vlivem na funkční stav cévy. Tento receptor, nazývaný endoglin, je transmembránový glykoprotein lokalizovaný na povrchu buněk endotelu a řadou studií je dokázáno, že jeho exprese hraje důležitou roli v patogenezi kardiovaskulárních chorob (Barbara et al., 1999; Llorca et al., 2007). Je označován za potencionální marker s ateroprotektivním charakterem (Conley et al., 2000; Nachtigal et al., 2012). Konkrétní úloha však ještě nebyla zcela vyjasněna. Zaměřili jsme se na jeho sérovou složku, která se odštěpuje do cirkulace proteolytickým štěpením. Jde o jeho extracelulární doménu, kterou nalezneme v krevním oběhu. Změněné hladiny tohoto sérového endoglinu (sENG) byly popsány u řady závažných onemocnění, včetně aterosklerózy (Blann et al., 1996; Strasky et al., 2011), těhotenské preeklampsie (Venkatesha et al., 2006), diabetes mellitus, hypertenze (Blazquez-Medela et al., 2010) a dalších. Bylo prokázáno, že sENG vede k poškození TGF- β signalizace v cévách a může tak vyvolávat poškození endotelu (Levine et al., 2006; Hawinkels et al., 2010). Jestli bude sENG v klinické praxi považován pouze za marker endotelové dysfunkce a kardiovaskulárních chorob, nebo se

bude na funkčním poškození i podílet, například prostřednictvím indukce endotelové dysfunkce, je stále otázkou a předmětem bádání.

My jsme v experimentální práci sledovali expresi proteinů iNOS (inducibilní NO-syntázy) a HO-1 (hemoxygenázy-1) a možné změny jejich exprese v souvislosti se zvýšenou hladinou sENG. Tyto molekuly oxidačního a nitračního stresu mají totiž význam v patogenezi onemocnění cév, dysfunkci endotelu a rozvoji kardiovaskulárních chorob (Giuliano et al., 1995; Wever et al., 1998; Ryter and Choi, 2009). iNOS je molekula uvolňována na základě prozánětlivých stimulů. Její exprese byla zjištěna i v buňkách hladkého svalstva cév u aterosklerotických lézí. Zvýšená tvorba oxidu dusnatého katalyzovaného iNOS se obvykle vyskytuje v oxidačním prostředí a je cytotoxická (Wever et al., 1998; Forstermann and Sessa, 2012). Exprese HO-1 je reakcí na oxidační stres, hypoxii, cévní poranění nebo působení prozánětlivých cytokinů. Je považována za modulátora zánětlivé reakce a funguje jako cytoprotektivní molekula s antioxidantním účinkem (Ryter et al., 2006; Pae et al., 2008).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Stavba cévní stěny

Cévní stěna je složená ze tří základních vrstev, které se nazývají tunica intima, tunica media a tunica adventitia (Konrádová et al., 2000). Poměr jednotlivých vrstev se u tepen a žil liší podle funkčních nároků cévy (Trojan et al., 2003).

Tunica intima

Tunica intima je výstelkou, která lemuje vnitřní povrch cévy. Složena je z vrstvy endotelových buněk a subendotelové vrstvy, která je tvořena řídkým kolagenním vazivem a buňkami hladké svaloviny (Konrádová et al., 2000).

Tunica media

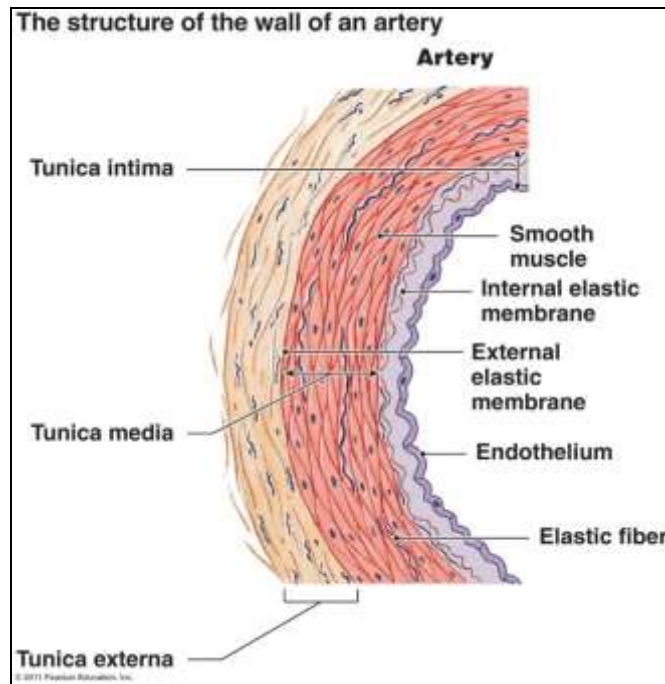
Tato střední vrstva je složena převážně z buněk hladké svaloviny, které produkují mezibuněčnou hmotu tvořenou proteoglykany a chondroitinsulfátem. Dále se skládá z vláken retikulárních a elastických. Elastická vlákna se mohou koncentrovat na hranicích média a vytvářet tak vnitřní a vnější elastickou membránu oddělující jednotlivé vrstvy cévy (viz níže Obrázek 1). Tunica media tepny je mnohem silnější než žíly (Konrádová et al., 2000; Lullmann-Rauch, 2012).

Tunica adventitia

Je vnější vazivová vrstva, která je tvořena sítí elastických a kolagenních vláken. U větších cév jsou přítomny i malé krevní cévy (tzv. vasa vasorum) vyživující tuto vrstvu a nervová vlákna inervující buňky hladké svaloviny (Trojan et al., 2003).

Obrázek 1: Stavba stěny artérie

Tři základní vrstvy cévní stěny: vnitřní tunica intima, střední tunica media a vnější tunica adventitia. Smooth muscle – hladké svalstvo cév; Internal elastic membrane – vnitřní elastická membrána; External elastic membrane – vnější elastická membrána; Endothelium – endotel; Elastic fiber – elastická vlákna.



Převzato:

<http://www.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2122/images/art_tunics.jpg> [2015-04-15]

Obrázek 2: Tunica intima – endotelové buňky s jádry

Ploché, vzájemně pevně propojené buňky, které jsou protáhlé v podélném směru cévy, s jádrem uprostřed. Vystylají vnitřní povrch cév.



Převzato: <<http://www.pathguy.com/histo/096z.jpg>> [2015-04-18]

2.2 Endotel

Endotel je tvořený jednou vrstvou buněk z plochého epitelu. Vystýlá vnitřní povrch krevních, lymfatických cév a kryje mnoho tělesných dutin či srdeční chlopně. Endotelové buňky tvoří nesmáčivé a netrombogenní rozhraní mezi cirkulující krví a okolními tkáněmi (Karetová, 2002; Karásek et al., 2004; Vráblík et al., 2011).

2.2.1 Role a funkce endotelových buněk

Donedávna se předpokládalo, že endotel slouží pouze jako mechanická bariéra bez dalších specifických funkcí. V posledních letech však výzkum prokázal, že buňky mají odlišné a jedinečné fyziologické funkce (Rajendran et al., 2013). Představují metabolicky velmi aktivní tkáň (Vráblík et al., 2011), která je schopna reagovat na fyzikální a chemické signály a díky mnoha faktorům udržovat homeostázu, regulovat permeabilitu, cévní tonus, buněčnou adhezi, proliferaci buněk hladkého svalstva cévní stěny, trombo rezistenci a ostatní cévní funkce (Deanfield et al., 2007). Úloha endotelu se děje prostřednictvím přítomnosti membránově vázaných receptorů (Rajendran et al., 2013) a především syntézou lokálně působících chemických substancí (Vráblík et al., 2011).

Jednou ze základních funkcí endotelu je zajištění regulované propustnosti mezi krevním řečištěm a okolními tkáněmi. Endotel kontroluje průnik buněčných i nebuněčných komponent, makromolekul, iontů a tekutin. Prostup látek je umožněn celou řadou transportních mechanismů a pomocí adhezních molekul (Bultas et al., 1999; Karásek et al., 2004).

Endotelové buňky hrají klíčovou roli v regulaci napětí cévní stěny a průtoku krve (Rajendran et al., 2013). Dochází k produkci vazoaktivních látek zajišťujících vazodilataci či vazokonstrikci cévy. Mezi nejdůležitější relaxační faktory patří oxid dusnatý (NO), jehož role byla objevena již v roce 1980 v průkopnickém experimentu Furchgotta a Zawadzkiho, kteří zkoumali dilataci králičí aorty v reakci na acetylcholin (Furchgott and Zawadzki, 1980; Celermajer, 1997). Mezi další významné působky patří také prostacyklin (PGI₂), který má antitrombotické, antiagregační vlastnosti a uvolňuje se zvýšeným průtokem krve či vlivem hypoxie. Synergicky mohou působit látky, jako je bradykinin, natriuretický peptid typu C (Celermajer, 1997; Karetová, 2002; Karásek

et al., 2004; Deanfield et al., 2007) či endoteliální hyperpolarizační faktor (EDHF), který může kompenzovat ztráty NO zprostředkované vazodilatace, je-li snížena biologická dostupnost NO (Halcox et al., 2001). K zachování rovnováhy jsou endotelem produkovány vazokonstrikční látky angiotenzin II (AT II), tromboxan A2 (TXA II), superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) a především endothelin-1 (ET-1), který působí konstrikčně, zároveň je však mírněn současnou stimulací NO a PGI₂. Dysfunkce těchto regulačních systémů endotelu může hrát úlohu u řady kardiovaskulárních onemocnění (Celermajer, 1997; Rajendran et al., 2013).

Pro zajištění integrity cévního řečiště musí neustále fungovat rovnováha mezi pro- a anti-koagulačními systémy. Za fyziologických podmínek mají endotelové buňky antikoagulační, antiagregační i fibrinolytické vlastnosti (Rajendran et al., 2013). Ochrana před vznikem trombózy se děje prostřednictvím NO, inhibicí adheze a agregace trombocytů, obdobně i PGI₂ či působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA), ze kterého vzniká plazmin štěpící molekuly nerozpustného fibrinu. Opačně potom působí AT II, a to skrze potenciaci tvorby inhibitoru plazminogenového aktivátoru (PAI-1) (Bultas et al., 1999; Karásek et al., 2004; Vojáček and Fiedler, 2004). Endotel váže na svém povrchu trombomodulin s vysokou afinitou k trombinu. Jakmile dojde k jeho navázání, má trombin omezenou schopnost štěpit fibrinogen a působit v koagulační kaskádě a navíc aktivuje protein C, který v komplexu s proteinem S inaktivuje faktory Va, VIIa a tím dojde k inhibici koagulace (Stary et al., 1992).

Endotelové buňky mohou zasahovat i do reparativních procesů, angiogeneze a mitogeneze. Tyto pochody jsou zajišťovány řadou cytokinů a růstových faktorů, jako je například transformující růstový faktor beta (TGF- β), růstový faktor uvolněný z trombocytů (PDGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), interleukin-1 (IL-1), apod. Mají stimulační účinky na růst a migraci buněk hladké svaloviny z média do subendotelového prostoru, dochází k hyperplazii intimy a hypertrofii cévní stěny. Za fyziologických podmínek tvoří endotel i antimitogeny, jako například NO, který zabraňuje proliferaci a růstu cévní stěny, a tím opět zachovává rovnováhu (Bultas et al., 1999; Karetová, 2002).

2.2.2 Endotelová dysfunkce

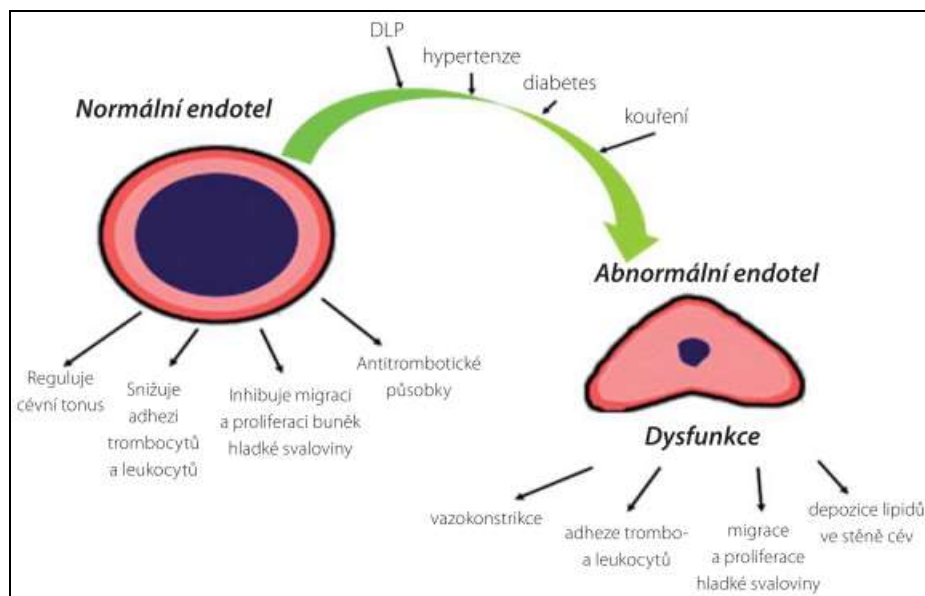
Endotelová dysfunkce je široký pojem. Vede k poruše dilatace cév, podporuje agregaci trombocytů, zvyšuje proliferaci hladké svaloviny a dochází k expresi povrchových adhezních molekul (Masopust et al., 2003; Verma et al., 2003). Lze ji charakterizovat jako generalizovaný defekt všech mechanismů homeostázy, kterou endotel zajišťuje. Dochází k nerovnováze mezi inhibitory a stimulatory růstu, vazoaktivními faktory, hemokoagulačními činiteli, zvyšuje se propustnost cévní stěny a výsledkem je převaha protrombotických, aterogenních vlastností a prozánětlivého stavu (Verma et al., 2003; Karetová, 2002).

Za poškození endotelu a jeho aktivaci stojí mnoho faktorů. Kromě mechanického vlivu, jako je zvýšení smykového napětí při arteriální hypertenzi, to mohou být i imunologické, toxické, biochemické vlivy či infekční agens a působení některých cytokinů. Velkým dílem mezi ně řadíme rizikové faktory aterosklerózy, například hyperlipoproteinémii (oxidované, glykované LDL částice), hyperglykémii, hyperinzulinémii, hypoxii, hyperhomocysteinémii, kouření, obezitu a další (Češka, 1999; Karetová, 2002; Rajendran et al., 2013).

Aktivované endotelové buňky se vyznačují zvýšenou permeabilitou pro aterogenní lipidy, vyšší proliferací a migrací buněk vazivové tkáně, protrombotickým účinkem a značná je i zvýšená exprese adhezních molekul (Karetová, 2002; Karásek et al., 2004). Příkladem je leukocytární adhezní molekula (ICAM-1), vaskulární buněčná adhezní molekula (VCAM-1) a P-, L-, E- selektiny, které usnadňují adhezi a kumulaci krevních buněk k povrchu endotelu, jejich přeměnu v makrofágy a pěnové buňky. Dochází i k syntéze cytokinů, jako je IL-1, tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1) a faktor stimující kolonie makrofágů (M-CSF), faktor stimující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), které mají prozánětlivé vlastnosti a přispívají k aktivaci makrofágů (Karásek et al., 2004; Vojáček and Fiedler, 2004).

Dle některých autorů se endotelová dysfunkce považuje za první stadium aterosklerózy. V dostatečném předstihu předchází strukturální manifestaci a v iniciální fázi rozvoje, kdy nejsou příznaky ještě klinicky zřejmé, může sloužit jako nezávislý marker tohoto onemocnění. (Verma et al., 2003; Vráblík et al., 2011). Kromě aterogeneze je funkční poškození endotelu spojeno i s patogenezí kardiovaskulárních chorob, jako je ischemická choroba srdeční, hypertenze, chronické srdeční selhávání, onemocnění periferních cév, potom i komplikací diabetes mellitus, chronického selhávání ledvin, závažných virových infekcí, sepse a dalších onemocnění (Rubanyi and Vanhoutte, 1986; Karásek et al., 2004).

Obrázek 3: Vznik endotelové dysfunkce a následky



Převzato: (Vráblík et al., 2011)

2.2.3 Oxidační, nitrační stres a dysfunkce endotelu

Oxidanty, superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$ anion), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($\cdot\text{HO}$) a radikál $\cdot\text{NO}$, označovány jako reakční formy kyslíku (ROS= reactive oxygen species) a dusíku (RNS= reactive nitrogen species), jsou molekuly vyráběné normálním aerobním metabolismem a bývají vysoce reaktivní s jinými biologickými molekulami.

Za fyziologických podmínek je produkce ROS vyvážena účinným systémem antioxidantů, molekul, které jsou schopné neutralizovat a bránit tak škodám oxidantů. Příkladem mohou být enzymatické antioxidanty, přirozeně se vyskytující ve tkáních, jako je superoxid dismutáza a glutathionperoxidáza. Snižují reaktivní formy kyslíku generované oxidačním stresem a inhibují aktivaci endotelových buněk. Několik neenzymatických antioxidantů, vitamín E, C či β -karoten, které chrání lipidy před peroxidací. Nebo HDL cholesterol a apolipoprotein A-1, které mají ochranné účinky proti rozvoji chorob srdce a cév, odebírají nadbytečný cholesterol ve tkáních a tlumí dysfunkci endotelu (Esper et al., 2006).

Reaktivní formy kyslíku jsou syntetizovány v lidském organismu řadou enzymů, xantin oxidázou, monoaminoxidázou nebo cyklooxygenázou (Ledvina et al., 2004; Vanhoutte et al., 2009). V patologických stavech mohou být ROS přítomny v relativním přebytku. Tento posun rovnováhy ve prospěch oxidace je nazýván oxidační stres. Může mít škodlivé účinky na buněčné či tkáňové funkce a je významným faktorem v patogenezi mnoha chorobných stavů, včetně endotelové dysfunkce, ischemie, zánětů, oxidaci lipidů, aterosklerózy, nádorového onemocnění a dalších (Verma et al., 2003; Esper et al., 2006).

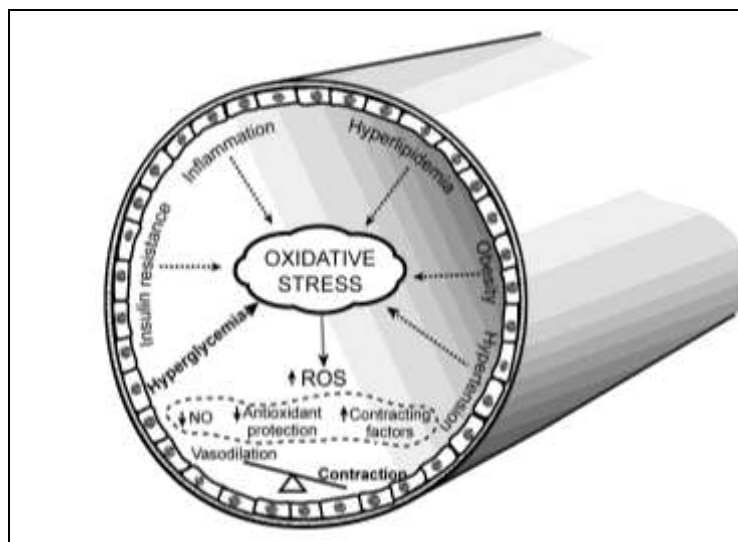
Nadměrná tvorba oxidových anionů a zvláště pak superoxidového anionu, který je produkován nikotinamidadeninukleotidfosfát-oxidázou, může vést k inhibici syntézy oxidu dusnatého a podílet se na ztrátě protektivních účinků NO na endotel. Vedle oxidačního stresu se pak rozvíjí i nitrační stres, při kterém vznikají reaktivní formy dusíku. Superoxidový anion způsobuje oxidaci NO a přeměnu na peroxynitrit ($\cdot\text{NO} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \cdot\text{OONO}^-$), nestabilní molekulu, která může vést k další oxidaci látek. Reaguje s tyrozinem polypeptidů za vzniku cytotoxického nitrotyrozinu, degraduje sacharidy, štěpí DNA a navozuje peroxidaci lipidů (Masopust et al., 2003; Esper et al., 2006). Peroxynitrit oxiduje kofaktor endoteliální NO-syntázy tetrahydrobiopterin (BH_4)

na dihydrobiopterin (BH₂), sníží jeho dostupnost a dojde k transformaci funkce endoteliální NO-syntázy, která produkuje O₂⁻ místo NO a zvyšuje oxidační stres (Ledvina et al., 2004; Esper et al., 2006).

Endotelová ROS signalizace může být iniciována vyplavením zánětlivých cytokinů a růstových faktorů či interakcí endotelu s leukocyty. Bez ohledu na zdroj nadprodukce oxidantů, v konečném důsledku vždy záleží na vzájemném působení s antioxidanty, které mají ochranné účinky a zachovávají rovnováhu (Esper et al., 2006; Deanfield et al., 2007).

Obrázek 4: Oxidační stres jako důsledek rizikových faktorů aterosklerózy

Oxidační stres a jeho škody jsou důsledkem mnoha jevů, mezi které můžeme řadit i rizikové faktory aterosklerózy (hypertenze, hyperglykémie, hyperinzulinémie, hyperlipidémie, obezita a zánětlivé stavy). Nadměrná tvorba ROS vede k oxidaci NO, sníží jeho intracelulární koncentraci, naruší vazodilataci artérie a další fyziologické účinky NO.



Převzato: <<http://www.intechopen.com/source/html/18542/media/image2.png>> [2015-04-18]

2.3 Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý (dříve označovaný jako EDRF – endothelium-derived relaxing factor) je důležitou signální molekulou a má vliv na řadu fyziologických funkcí, včetně trávení, krevního oběhu, paměti, učení a zánětu (Forstermann and Sessa, 2012). Jak už bylo zmíněno, hlavní biologickou funkcí NO je mohutný vazodilatační účinek (Karetová, 2002). Důležité je i protizánětlivé působení zamezující procesům proliferace a udržení cévní stěny v klidovém stavu, a to prostřednictvím inhibice adheze, agregace trombocytů a exprese adhezních molekul (Karetová, 2002; Deanfield et al., 2007; Karásek et al., 2004).

Prekurzorem NO je aminokyselina L-arginin, která se přeměňuje na L-citrullin působením enzymu NO-syntázy (NOS) v přítomnosti některých kofaktorů, jako je například tetrahydrobiopterin (BH₄), nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH), flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD) (Forstermann and Munzel, 2006).

Nejdůležitějším aktivátorem a následnou stimulací uvolňování NO je smykové napětí krevního proudu (hemodynamická námaha, tzv. „shear stress“) (Esper et al., 2006). Uvolňován může být i signálními molekulami, jako je bradykinin, acetylcholin, substance P, TGF-β, HO-1 nebo VEGF v reakci na hypoxii či serotoninem při agregaci destiček (Govers and Rabelink, 2001).

Koncentrace NO závisí na řadě okolností (dostupnost kofaktorů, oxidační stres, difuzibilita, koncentraci dalších bioreaktantů apod.) a v případě nedostatečné produkce či narušení aktivity vede ke vzniku endotelové dysfunkce a projevům kardiovaskulárního onemocnění (Karásek et al., 2004; Vanhoute et al., 2009).

Pro studium patofyziologické úlohy NO systému vědci často využívají geneticky modifikovaných přístupů u myší, které nabízejí nepřehledné množství informací a neocenitelné nástroje pro další studium NOS. V různých experimentálních modelech mají možnost posouzení přínosu jednotlivých forem NOS a jejich hlavních rolí (Mungrue et al., 2002).

2.3.1 NO-syntáza a její izoformy

NOS jsou skupinou příbuzných proteinů, které produkují NO. U savců jsou známy tři izoformy této genové rodiny (Mungrue et al., 2002). Neuronální NOS (nNOS/NOS-I), endoteliální NOS (eNOS/NOS-III) a indukibilní NOS (iNOS/NOS-II). nNOS a eNOS jsou konstitučně exprimované formy z nervové tkáně a endotelových buněk. Forma iNOS je uvolňována na základě prozánětlivých cytokinů, makrofágů a stimulovaná koncentrace NO je pak trvale vysoká (Celermajer, 1997; Vojáček and Fiedler, 2004). nNOS a eNOS produkují NO na krátkou dobu, kdy jsou indukovány vazodilatátory, jako je acetylcholin nebo bradykinin. Indukovatelná iNOS může syntetizovat NO po delší dobu a konstantním způsobem (Esper et al., 2006).

nNOS

Je spojen s plazmatickou membránou a slouží především pro buněčnou komunikaci (Southan and Szabo, 1996). NO je uvolňován v nervové tkáni v centrálním i periferním nervovém systému (Forstermann and Sessa, 2012).

eNOS

Je známá pro mnoho důležitých biologických funkcí, včetně cévní homeostázy, regulace angiogeneze a hlavně při kontrole cévního tonu. NO difunduje do buněk hladkého svalstva cév a aktivuje guanylátcyklázu, což vede k tvorbě cyklického 3', 5'-guanosin monofosfátu (cGMP), který snižuje koncentraci intracelulárního Ca^{2+} , aktivují se K^+ kanály, dojde k hyperpolarizaci a zprostředkované vazodilataci (Celermajer, 1997; Corson et al., 1996).

iNOS

Tato izoforma je syntetizována v řadě buněčných typů, včetně endotelu, hepatocytů, makrofágů, neutrofilů, fibroblastů či žírných buněk (Toborek and Kaiser, 1999; Colman et al., 2006). Exprese je aktivována prozánětlivými cytokiny tumor nekrotizujícím faktorem- α (TNF- α), IL-1 a interferonem gama (Esper et al., 2006). Dále pak bakteriálními patogeny, které generují vysoké koncentrace NO prostřednictvím aktivace indukovatelných nukleárních faktorů, včetně NF κ B, a pomocí dalších

prozánětlivých stimulů. Aktivace tohoto enzymu se upravuje zejména na transkripční úrovni prostřednictvím účinků na stabilitu, dimerizaci, fosforylaci proteinu a dostupnost kyslíku a L-argininu jako substrátů (Aktan, 2004; Esper et al., 2006).

Zvýšená tvorba NO, která je katalyzována iNOS v reakci na prozánětlivé procesy, se obvykle vyskytuje v oxidačním prostředí a je cytotoxická pro řadu intracelulárních patogenů, parazitů a pro některé nádorové buňky. iNOS zastává funkci vrozené imunitní odpovědi a NO produkuje jako obranný mechanismus. Pokud dojde k nadprodukcí NO a uvolnění na nesprávném místě, může poškozovat i okolní tkáň a zdravé buňky. Tyto vlastnosti mohou definovat roli iNOS v imunitě hostitele, umožňující účast v antibakteriální a protinádorové aktivitě (Nathan and Hibbs, 1991; Forstermann and Sessa, 2012).

Kromě role v zánětu a infekci je NO produkovaný iNOS dáván do spojení s cévním onemocněním a aterosklerózou. Byla zjištěna indukce iNOS v buňkách hladkého svalstva cév u aterosklerotických lézí a vzájemný výskyt oxidovaných lipidů s expresí iNOS v nekrotických jádrech ateromových plátů. Stimulace exprese v plátech může být způsobena zvýšenými hladinami oxidových anionů, které vedou ke zvýšení oxidačního stresu a poškození tkáně (Wever et al., 1998). Exprese iNOS koreluje se sníženým obsahem kolagenu, proapoptickým účinkem a nestabilitou plátu. Některé studie však uvádí, že NO může v ateromových plátech naopak fungovat jako antioxidant a zabraňovat zánětlivým a imunologickým reakcím v cévní stěně. Je tedy nejasné, zda iNOS odráží patologické či ochranné účinky nebo obojí. Přesná role iNOS u aterogeneze není zcela definována (Colman et al., 2006).

Nadměrná tvorba NO je spojena i s endotoxemií, sepsí a oběhovým šokem. Tento stav je charakterizovaný masivní hypotenzí, sníženou perfuzí tkání a selháváním orgánů. V patogenezi se uplatňují cytokiny, histamin, prostaglandiny a mediátory TNF- α nebo interferony, které se uvolňují z buněk makrofágů, působením bakteriálních endotoxinů. To souvisí i s aktivací a uvolněním iNOS v buňkách hladkého svalstva cév a následným zvýšením tvorby NO. V tomto procesu přispívá k systémové hypotenzii (Wong and Billiar, 1994; Forstermann and Sessa, 2012).

2.4 Hemoxygenáza (HO)

Hemoxygenáza (HO) je zásadním enzymem v metabolismu hemu, cyklického tetrapyrrolového porfyrinu s centrálně navázaným atomem železa (Maines, 1988; Vítek, 2009). Katalyzuje první určující krok v oxidační degradaci volného hemu, za vzniku ekvimolárních množství žlučového pigmentu biliverdinu, oxidu uhelnatého (CO) a železa (Abraham and Kappas, 2008; Pae et al., 2008). Tato reakce vyžaduje molekulární kyslík a stejně tak redukční ekvivalenty z NADPH a cytochrom P450 reduktázy. Vzniklý biliverdin se následně převede pomocí NADPH biliverdin reduktázy (BVR) na bilirubin a volné železo se recykluje pro syntézu hemu (Maines, 1988; Pae et al., 2008). HO se nevyznačuje pouze enzymovou aktivitou. Na buněčné membráně se může uplatnit jako signální molekula nebo funguje jako transkripční faktor v jádře buňky (Vítek, 2009; Lundvig et al., 2012).

V lidském organismu byly popsány dvě hlavní geneticky odlišné izoformy HO: indukovatelná forma, hemoxygenáza-1 (HO-1) a konstitučně tvořená forma, hemoxygenáza-2 (HO-2) (Pae et al., 2008). HO-1 a HO-2 jsou produkty dvou genů a liší se v primární aminokyselinové sekvenci a biochemických nebo biofyzikálních vlastnostech. HO-2 (protein 36 kDa) je vysoce exprimována za bazálních podmínek a vyskytuje se ve většině lidských tkání, včetně jater, sleziny, varlat a kardiovaskulárním či nervovém systému (Ryter and Choi, 2009).

2.4.1 HO-1 a její účinky

HO-1 patří do skupiny heat-shock proteinů (HSP) o molekulové hmotnosti 32 kDa (Barton et al., 2003). Vyskytuje se na vysoké úrovni exprese ve slezině a dalších tkání, které degradují zestárlé červené krvinky, včetně specializovaných retikuloendotelových buněk jater a kostní dřeně. Jinak je za fyziologických podmínek ve většině ostatních tkání a buňkách exprimována v nízkých, někdy až nedetekovatelných koncentracích (Ryter et al., 2006; Ryter and Choi, 2009). Aktivní je však i při nízkých koncentracích substrátu, její aktivita se zvyšuje, jakmile se zvyšuje fyziologická koncentrace hemu (Maines et al., 1988). HO-1 patří do širší rodiny stresových proteinů, je schopná rychle reagovat na mnoho chemických a fyzikálních stimulů a potencionálně tak fungovat jako transkripční regulátor (Barton et al., 2003). Genová exprese HO-1 byla doposud popsána jako jedna z nejvíce indukovatelných

enzymů v těle, zahrnuje množství signálních drah (Maines et al., 1988; Wagener et al., 2003) a je buněčně i druhově specifická (Morse and Choi, 2002).

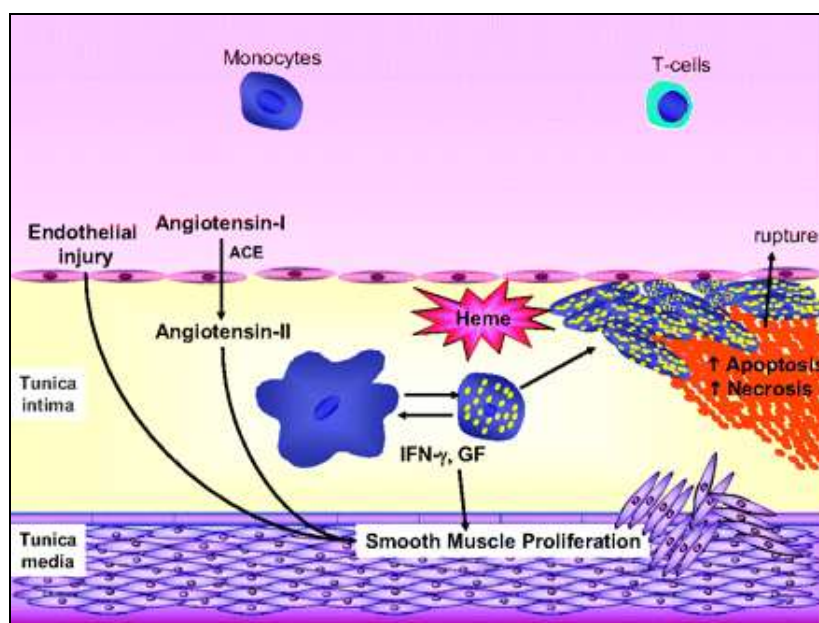
Indukce HO-1 je reakcí na oxidační stres, teplotní šok nebo hypoxii (Abraham and Kappas, 2008). Probíhá celou řadou faktorů, jako jsou například reaktivní kyslíkové metabolity (ROM), hem (Barton et al., 2003), ultrafialové světlo, bakteriální lipopolysacharidy (Vítek, 2009), těžké kovy, NO, CO nebo prozánětlivé cytokiny, záněty a různá poranění (Ryter et al., 2006). HO-1 indukci mohou však zajišťovat i protizánětlivé mediátory, jako je interleukin-10 (IL-10), klíčová molekula pro kontrolu zánětu. Bylo zjištěno, že mnoho z IL-10 protizánětlivých účinků zprostředkovává právě pomocí upregulace HO-1 (Vachharajani et al., 2000; Wagener et al., 2003).

Vzhledem k tomu, že mnoho z indukčních podmínek je spojeno se stimulací peroxidačního stavu, je HO-1 považována za inducibilní ochranný systém před oxidačním stresem (Ryter and Choi, 2009). Řadou studií je prokázáno, že se HO-1 podílí na ochraně různých tkání a orgánů a funguje jako kritická cytoprotektivní molekula s antioxidantními, protizánětlivými, antiproliferačními a antiapoptickými účinky (Pae et al., 2008).

Zvýšená exprese HO-1 může fungovat jako modulátor zánětlivé reakce u některých patologických stavů, kde přispívá k potlačení zánětu. Hraje roli například u aterosklerózy, ischemie myokardu, reperfučním poškození, hypertenze, diabetes mellitus (Giuliano et al., 1995; Yet et al., 2001) nebo u transplantace orgánů (Wagener et al., 2001; Abraham and Kappas, 2008). HO-1 zprostředkovanou ochranu proti tkáňovému poškození potvrdila řada studií. Byly použity například transgenní myši se srdeční specifickou nadměrnou expresí lidského HO-1, které prokazovaly ochranu před ischemicko-reperfučním poškozením a zlepšení funkčního zotavení (Yet et al., 2001). U plicní specifické nadměrné exprese zase docházelo k ochraně proti plicní hypertenzi a cévní hypertrofii vyvolané chronickou hypoxií (Zampetaki et al., 2003). Nedávné studie nadměrné exprese cílené HO-1 v kůži potvrdily i to, že HO-1 podporuje hojení ran a neovaskularizaci (Grochot-Przeczek et al., 2009). Tyto studie se tedy shodují na ústřední úloze HO-1 v cévní a tkáňové homeostáze (Ryter and Choi, 2009).

Obrázek 5: Navrhovaná ochranná úloha HO-1 v regulaci NO a iNOS u aterosklerózy

HO-1 inhibuje reaktivní formy kyslíku (ROS), iNOS a další kroky v patogenezi aterosklerózy, včetně aktivace endotelu, proliferace buněk hladkého svalstva cév, migrace leukocytů, oxidace LDL, tvorby pěnových buněk, prozánětlivých cytokinů a vytvoření plátu. Angiotenzin konvertující enzym (ACE) umožňuje konverzi angiotenzinu I na vazokonstrikční angiotenzin II, který působí při vzniku a rozvoji aterosklerózy a zvyšuje hladiny prozánětlivých cytokinů. HO-1 přispívá k potlačení zánětlivé infiltrace.



Převzato: (Abraham and Kappas, 2008)

2.4.2 Protektivní účinky HO-1 při zánětu a poškození cévy

Ačkoliv byly ochranné účinky HO-1 potvrzeny v několika experimentálních modelech, mechanismus, kterým HO-1 tyto účinky poskytuje, není zcela objasněn. Nedávné důkazy akorát naznačují, že reakční produkty HO aktivity (železo, CO, bilirubin) přispívají, ať už samostatně nebo ve vzájemné shodě, k obnovení buněčné homeostázy (Ryter et al., 2006; Pae et al., 2008; Ryter and Choi, 2009).

Důležitou roli hraje schopnost katabolizace hemu, která vede k uvolnění volného železa a oxidu uhelnatého. Zvýšená dostupnost volného železa nabízí toxické účinky na tkáň a orgány. Prostřednictvím oxidačního stresu vytváří reaktivní molekuly, které

vedou k sérii radikálových reakcí a poškození tkáně, čímž se podílí i na progresi zánětlivé reakce a oxidaci LDL v ateroskleróze. Železo je tedy obecně považováno za katalyzátora škodlivých prooxidačních reakcí a HO-1 je důležitým antioxidantem (Barton et al., 2003; Wagener et al., 2003). Pokud by došlo k inhibici aktivace HO-1, zvýšila by se permeabilita cév a ve tkáních by stoupla hladina peroxidu vodíku a zánětlivých cytokinů (Wagener et al., 2001). Na druhé straně, volné železo, i přes vlastní toxicitu, může potencionálně přispívat k cytoprotekci prostřednictvím nepřímých mechanismů, jako je stimulace syntézy ferritinu, který doprovází indukci HO-1 a reaktivní železo izoluje (Ryter and Choi, 2009).

Dalším konečným produktem degradace hemu je nazelenalý biliverdin, který se rychle převede biliverdin reduktázou na nažloutlý bilirubin. Skupina Ryter et al. prokázala, že tento pigment působí jako silný antioxidant a lze jej farmakologicky použít pro ochranu kultivovaných buněk před oxidačním nebo nitračním stresem (Ryter et al., 2007). Tyto pigmenty jsou schopné vychytávat reaktivní oxidanty a taktéž zabraňovat oxidaci LDL. Kromě toho jsou plazmatické koncentrace bilirubinu spojeny s nízkým výskytem kardiovaskulárních onemocnění, jako je ateroskleróza nebo ischemická choroba srdeční (Pae et al., 2008).

Poslední produkt degradace hemu je oxid uhelnatý. Obvykle se na CO pohlíželo jako na nebezpečný jedovatý plyn (Johnson et al., 1999). Nedávné studie však ukázaly, že CO má hluboký vliv na intracelulární signální procesy a uděluje protizánětlivé, antiapoptické a antiproliferační funkce (Wagener et al., 2003; Pae et al., 2008). Aplikace CO v nízkých koncentracích může ovlivnit množství signálních drah v kultivovaných buňkách, včetně těch, které upravuje solubilní guanylátcykláza (SGC). CO stimuluje SGC ke zvýšení produkce cGMP, který způsobuje ochrannou cévní relaxaci, inhibici proliferace buněk hladkého svalstva a agregace destiček (Ryter and Choi, 2009; Abraham and Kappas., 2008). Navíc CO může indukovat expresi HO-1 a prohlubovat tak její antioxidační účinky (Pae et al., 2008).

2.5 Transformující růstový faktor beta (TGF- β)

2.5.1 Význam a charakteristika

Transformující růstový faktor- β nadrodina se skládá z mnoha multifunkčních cytokinů (Bobik, 2006). Podporují růst tkání a morfogenezi již během embryonálního vývoje, regulují diferenciaci mezenchymálních buněk a v dospělosti se podílejí na imunitních funkcích organismu (Massagué and Gomis, 2006). Biologické akce TGF- β zahrnují regulaci buněčné proliferace, degradace, kontrolu produkce extracelulární matrix či ovlivnění činnosti buněk imunitního systému (Shull et al., 1992). Narušení TGF- β signalizace pak může vést k řadě vaskulárních poruch, jako je ateroskleróza a restenóza nebo k hereditární hemoragické telangiektázii (HHT) a dalším vývojovým vadám (Lebrin et al., 2005; Marek et al., 2010).

U savců byly identifikovány tři TGF- β izoformy, TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3, které spolu navzájem strukturně i funkčně souvisejí (Wang et al., 1997). Obvykle jsou vylučovány bez biologické aktivity jako dimerní latentní prekurzory. Aby se mohly navázat na své specifické receptory typu I (T β R-I) a II (T β R-II) serin/treonin kinázy, musí se pro uvolnění ligandů nejprve v extracelulárním prostředí aktivovat (Grainger, 2004; Lebrin et al., 2005). Aktivaci a uvolnění zralého TGF- β lze provést prostřednictvím změny pH, tepla, aktivací integrinů nebo přímo proteolytickými enzymy a řadou dalších mechanismů (Wang et al., 1997; Bobik, 2006; Jenkins, 2008). Aktivace tohoto komplexu je klíčovým kontrolním bodem pro řízení biologické dostupnosti jednotlivých forem TGF- β a pro vazbu na jejich receptory (Jenkins, 2008). Jakmile dojde k navázání ligandů a aktivaci receptorů, signály TGF- β jsou transdukovány z membrány do jádra přes intracelulární efektozy nazývané Smady (Lebrin et al., 2005).

Mezi nejprozkoumanější izoformu se řadí TGF- β 1 cytokin, je syntetizovaný prakticky ve všech typech buněk (Wang et al., 1997) – cévních, endotelových, buněk hladkého svalstva cév, včetně makrofágů a různých typů lymfocytů (Bobik, 2006). Ve vysokých koncentracích ho nalezneme ve zdravé cévní stěně (Gorelik and Flavell, 2000) a je hlavním druhem TGF- β konstitutivně přítomný v séru (Grainger, 2004).

TGF- β 1 má velký význam na regulaci imunitního systému. Může aktivovat i deaktivovat buňky makrofágů, které jsou na něho velmi citlivé a samy ho i produkují. Během zánětu podporuje adhezi monocytů a pomocí jaderného efektoru Smad3 stimuluje jejich chemotaxi. Zánět může potencovat i prostřednictvím indukce sekrece interleukinu-6 (IL-6) a IL-1 (Bobik, 2006). Mnohé studie prokazují nekontrolovatelnou aktivaci T-buněk, jejich diferenciaci a proliferaci, způsobenou dysregulací a narušením TGF- β signalizace. Tento proces vede k řadě autoimunitních onemocnění a zvyšuje závažnost kardiovaskulárních chorob (Bobik, 2006; Gorelik and Flavell, 2000).

V závislosti na experimentálních podmínkách bylo prokázáno, že TGF- β 1 působí jako inhibitor nebo stimulator angiogeneze. U angiogeneze stimuluje fázi rozlišení, která zahrnuje inhibici proliferace endotelových buněk a diferenciaci mezenchymálních buněk do buněk hladkého svalstva a pericytů. Podílí se tak na tvorbě nových cév a udržení strukturální integrity organismu (Lebrin et al., 2005). Obecně na proliferaci a migraci endotelových buněk má TGF- β 1 bifunkční účinky. Při nízké koncentraci tyto procesy stimuluje, zatímco při vyšších hladinách inhibuje (Bobik, 2006). Tyto účinky TGF- β projevuje například během vývoje nádoru. V počátečních fázích se chová jako inhibitor proliferace, nicméně v pokročilých fázích nádorové buňky vylučují velké množství TGF- β 1 podporující invazi buněk, metastáze a nepřímo vytváří příznivé mikroprostředí nádoru prostřednictvím podpory neovaskularizace (Lebrin et al., 2005; Laverty et al., 2009).

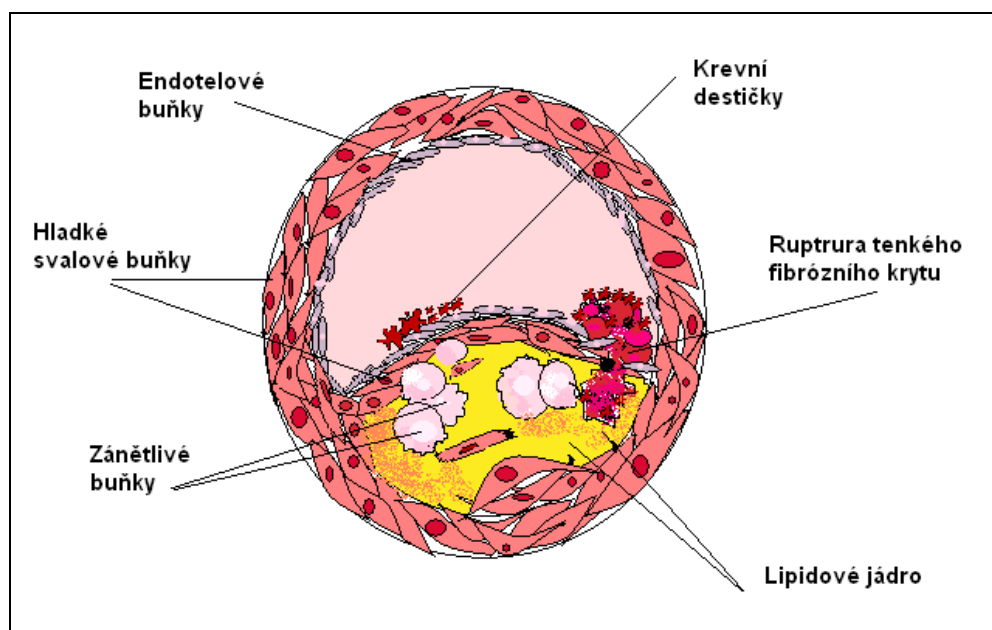
2.5.2 TGF- β a ateroskleróza

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění arteriální stěny, které vede ke vzniku tukových plátů a následnému zúžení cévního lumen (Ross, 1999; Vlček et al., 2010). Pokročilé léze s rizikem ruptury plátu mohou omezit tok do klíčových orgánů, uzavřít tepnu a vyvolat okluzivní trombózu, jejímž výsledkem jsou klinicky závažné akutní ischemické syndromy (Mallat et al., 2001; Toma and McCaffrey, 2012). Jedním z hlavních rizikových faktorů v iniciaci a progresi aterosklerotické léze je endotelová aktivace a zvýšení plazmatických koncentrací cholesterolu. LDL o nízké hustotě se ukládají se do stěny artérií, oxidované zvyšují adhezi mononukleárních buněk z oběhu a vyvolávají zánětlivou reakci (Ross, 1999; Blankenberg et al., 2003; Vlček et al., 2010). Zánět je kritickým faktorem stability plátu. Cytokiny, jako zánětlivé mediátory, mohou

tedy ovlivnit některé biologické procesy regulující stabilitu a odolnost proti roztržení (Libby, 2006).

Obrázek 6: Aterosklerotický plát

Nestabilní plát je složen z protrombogenního lipidového jádra s velkým množstvím zánětlivých buněk, makrofágů a krytý je fibrózní čepičkou s malým množstvím kolagenu a hladkých svalových buněk.



Převzato: <<http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/wp-content/uploads/2011/12/6.bmp>> [2015-04-18]

Současné poznatky zdůrazňují důležitost aktivity TGF- β 1 v patogenezi aterosklerózy. Je to cytokin s širokou aktivitou na buňky a tkáně v kardiovaskulárním systému a má silné imunomodulační účinky, což je důležité pro tvorbu aterosklerotických lézí, v nichž může být detekován (Mallat et al., 2001; Feinberg and Jain, 2005). Úloha tohoto cytokinu v procesu aterosklerózy je však předmětem značné debaty (Grainger, 2004). Bývá složité určit, zda zvýšení aktivity TGF- β 1 vzhledem k aterogenezi je ochranné nebo škodlivé (Wang et al., 1997).

Na jedné straně nadprodukce TGF- β 1 v cévní stěně může vést k nadměrné produkci extracelulární matrix, zvětšovat velikost plátů a přispívat k progresi aterosklerózy (Wang et al., 1997). Existují důkazy, že tento pleiotropní cytokin podporuje roli zánětu (Feinberg and Jain, 2005), který v kaskádě událostí nakonec vede k erozi a protrhnutí aterosklerotického plátu. Může tomu přispívat skutečnost, že zvýšená koncentrace TGF- β v lézích stimuluje syntézu proteoglykanu pohlcujícího lipoproteiny, jejich modifikaci a následnou lipoperoxidaci v cévní stěně (Williams and Tabas, 1995; O'brien et al., 1998). Tyto poznatky pak mohou vést k jeho potencionální proaterogenní funkci (Mallat et al., 2001).

Na druhé straně je prokázáno, že se TGF- β 1 zapojuje do udržování normální struktury cévní stěny a zachování funkce endotelu (Wang et al., 1997). Studie u apolipoproteinu E-deficientních myší prokázaly důležitou roli TGF- β v udržování rovnováhy mezi zánětem a fibrózou v aterosklerotických plátech. Tento silný fibrotický cytokin může mít významný dopad na obsah kolagenu a tím pádem na stabilitu plátu. Studie tak dokázala, že inhibice TGF- β signalizace anti-TGF- β protilátkami u myší urychluje tvorbu plátu a jeho nestabilní progresi (Cipollone et al., 2004). K pozitivním vlivům TGF- β 1 patří i inhibice aktivace makrofágů prostřednictvím několika aktivačních markerů, jako je TNF- α , IL-1, matrix metaloproteinázy, včetně inducibilní NO syntázy (Werner et al., 2000). Tyto výsledky vedly k navržení TGF- β 1 jako modulátora imuno-zánětlivé rovnováhy spíše s ateroprotektivní funkcí (Mallat et al., 2001).

Mechanismy odpovědné za ochranné a protizánětlivé účinky tohoto cytokinu nejsou ještě plně objasněny. Jejich přesná identifikace by však v budoucnu mohla poskytnout nové terapeutické cíle pro omezení chorobných cévních onemocnění a rozvíjet imunomodulační strategie založené na podpoře aktivity TGF- β (Mallat et al., 2001; Grainger, 2004; Feinberg and Jain, 2005).

2.6 Endoglin

Endoglin (CD 105) je homodimerní transmembránový glykoprotein (Lebrin et al., 2004), který je součástí receptorového komplexu TGF- β . Je známý jako tzv. přídatný receptor (T β R-III) a podílí se na TGF- β signální transdukci (Lebrin et al., 2005). Několik důkazů svědčí o významné roli endoglinu v cévní remodelaci, angiogenezi a kardiovaskulárním vývoji. Je cílovým genem pro dominantně dědičnou cévní poruchu (HHT-1) a důležitým markerem v patologických procesech, včetně nádorové angiogeneze, srdečních a cévních abnormalit, těhotenské preeklampsie a dalších stavů (Barbara et al., 1999; Llorca et al., 2007).

2.6.1 Struktura, exprese a funkce endoglinu

Lidský endoglin je tvořený ze dvou 95 kDa disulfidicky vázaných podjednotek (Guerrero-Esteo et al., 1999) složených z velké extracelulární domény o 561 aminokyselin, jedné hydrofobní transmembránové domény (25 aminokyselin) a krátké intracelulární cytosolové domény (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Strukturálně patří endoglin do zona pellucida (ZP) rodiny proteinů, které sdílejí ZP doménu skládající se z 260 aminokyselin s 8 cysteinovými zbytky v blízkosti transmembránové oblasti (Llorca et al., 2007). Primární struktura naznačuje, že intracelulární doména je bohatá na serinové a treoninové zbytky, které mohou být prostřednictvím TGF- β kináz fosforylovány (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Hlavním zdrojem endoglinu jsou vaskulární endotelové buňky, buňky hladkého svalstva, stromální buňky (Diez-Marquez et al., 2002) a další typy buněk zapojených do kardiovaskulárního systému, jako jsou fibroblasty (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010), makrofágy, prekurzory erytroblastů a leukemické buňky lymfoidní a myeloidní linie (Cheifetz et al., 1992).

Buněčná a tkáňová distribuce endoglinu naznačuje svou roli ve správném rozvoji cév, angiogenezi a v cévní homeostáze. Endoglin je v klidovém endotelovém systému a buňkách hladké svaloviny zdravých cév exprimován v nízkých hladinách. Vysoká exprese je naopak v proliferujících buňkách endotelu, v místech aktivní angiogeneze, po poranění cév, zánětu tkání, při nádorovém bujení, v průběhu embryogeneze a k nadměrné expresi dochází i v endotelových buňkách u psoriatické

kůže či po ischémii a reperfuzi v srdci a ledvinách (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Jeho hladina je zvýšena i v lidských aterosklerotických plátech, kde ukazuje na úlohu při udržování cévní integrity a reparaci v odezvě na poranění cévní stěny (Conley et al., 2000).

Endoglin, jako T β R-III, je důležitý také pro regulaci vzniku heteromerního komplexu TGF- β a pro modulaci buněčné odpovědi TGF- β u endotelových buněk (Bobik, 2006). Funguje jako pomocný receptor, neváže ligand, ale ve spojení s dalšími signálními TGF- β receptory T β R-I a T β R-II usnadňuje vazbu TGF- β 1 a TGF- β 3, pomáhá tedy vytvářet funkční receptorový komplex (Llorca et al., 2007). Vazbou s receptory reguluje fosforylaci T β R-II a T β R-I a ovlivňuje i aktivitu Smad proteinů, jaderných efektorů TGF- β signalizace (Lebrin et al., 2004).

2.6.2 Endoglin a NO

Úloha endoglinu při udržování cévní homeostázy úzce souvisí i se vztahem k endoteliální NO syntáze (eNOS). Endoglin hraje důležitou roli v regulaci exprese tohoto enzymu, zodpovídajícího za produkci NO, který má protektivní účinky na endotel a snížená exprese může vést až k aterogenezi (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Nachtigal et al., 2012).

Tuto skutečnost potvrdila Jerkic et al. ve své in vivo studii u endoglin haploinsuficientních myší (Eng^{+/-}), kdy v důsledku snížené cévní eNOS exprese docházelo k menší produkci NO a poruchám NO-dependentní vazodilatace (Jerkic et al., 2004; Kapur et al., 2013).

In vitro studie jiných autorů prokázala, že k endoglin závislé indukci eNOS dochází na transkripční úrovni, je zprostředkována TGF- β receptorem typu I a následnou aktivací jaderného efektoru Smad2 se exprese eNOS zvýší (Santibanez et al., 2007). Spolu s regulací eNOS aktivity může endoglinová exprese korelovat také s expresí vaskulární buněčné adhezni molekuly (VCAM-1) či inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS) v průběhu ischemicko-reperfuzního poškození. Tyto výsledky tak mohou být dávány do souvislosti s dysfunkcí endotelu v ateroskleróze. (Kapur et al., 2013).

2.6.3 Role CD 105 v aterogenezi

Působení endoglinu ve vztahu k ateroskleróze není zcela jasné a je stále předmětem bádání. Dosavadní poznatky a výsledky studií nám však naznačují, že by role endoglinu, co by regulátora signalizace TGF- β , mohla mít spíše ateroprotektivní charakter. Toto tvrzení se potvrdilo i v rámci studie, kdy léčba pomocí statinů zvýšila expresi endoglinu v aortě. Zvýšením TGF- β signalizace a jejího ateroprotektivního vlivu se u zkoumaných myší ateroskleróza snížila (Nachtigal et al., 2012). Pokud by došlo k inhibici této signalizační kaskády, například zvýšenou hladinou cholesterolu v krvi, mohlo by to vést k prozánětlivému stavu ve stěně cévy, dysfunkci endotelu a aterogenezi (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Nachtigal et al., 2012).

Bylo prokázáno, že zvýšená exprese endoglinu nastává u proliferujících buněk endotelu, při zánětu či poranění cévy, což naznačuje reakci na stres a poškození způsobené působky aterogeneze. Vysoké hladiny CD 105 exprimují i v lidských aterosklerotických lézích (Conley et al., 2000). Naopak jeho nízká exprese nastává v klidovém stavu endotelového systému, kdy udržuje cévní homeostázu a podílí se na správném rozvoji cév (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Endoglin se podílí i na reparaci cévní stěny a stabilizaci lézí. Aktivace jeho signalizačních cest totiž vede ke zvýšené expresi transkripčního faktoru EGR-1 (early growth response-1). Vyšší hladiny EGR-1 pak stimulují proliferaci buněk hladkého svalstva a syntézu kolagenu, který sníží riziko trombů a aterosklerotické pláty stabilizuje (Bot et al., 2009).

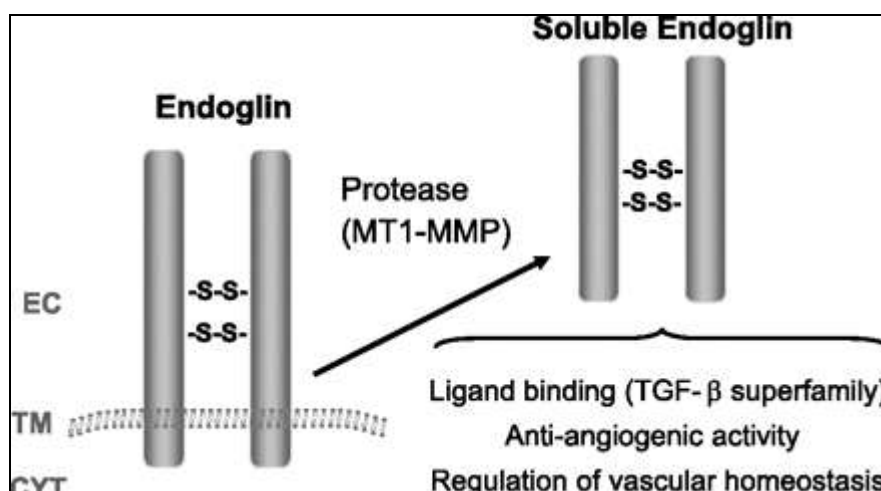
Studie Paigen et al. prokázala, že u myšího kmene C57BL/6 hypercholesterolémie v cévách nepoškozených aterosklerotickými pláty způsobuje vyšší expresi endoglinu v aortě, zatímco v cévách již postižených lézemi, způsobuje inhibici exprese. U lidí je exprese endoglinu prokázána i v buňkách hladké svaloviny cév, u těchto myší však byla prokázána jen na endotelu aorty (Paigen et al., 1987; Conley et al., 2000).

2.6.4 Sérový endoglin

Kromě membránově vázaného endoglinu, který byl doposud zmiňován, existuje v krevním oběhu i netkáňová sérová (tzv. solubilní) forma endoglinu (sENG nebo sCD 105) (Blaha et al., 2008; Hawinkels et al., 2010). Do oběhu se sENG dostává činností membránové matrix metaloproteinázy-1 (MT1-MMP nebo MMP-14), kdy je proteolyticky štěpen ze své tkáňové formy endoglinu (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). Jedná se o jeho extracelulární doménu (Hawinkels et al., 2010). sENG lze detekovat pomocí Western blot analýzy či metody ELISA v plazmě, séru a moči, přičemž změněné hladiny sENG byly popsány u řady patologických stavů (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010), jako je preeklampsie (Venkatesha et al., 2006), rakovina (Bernabeu et al., 2009), ateroskleróza a ischemická choroba srdeční (Blann et al., 1996; Strasky et al., 2011), diabetes, hypertenze (Blazquez-Medela et al., 2010) a další.

Obrázek 7: Vznik solubilního endoglinu

Vznik solubilního endoglinu činností membránové matrix metaloproteinázy-1 (MT1-MMP), kdy je proteolyticky štěpen z tkáňové formy endoglinu. Jedná se o jeho extracelulární doménu (EC). Solubilní endoglin má antiangiogenní účinek a může zasahovat do cévní homeostázy. TM= transmembránová část řetězce a CYT= cytoplazmatická část řetězce.



Převzato: <<http://ajpheart.physiology.org/content/299/4/H959>> [2015-04-01]

Jednou z nejčastěji zmiňovaných patologií v souvislosti se zvýšenými hladinami solubilního endoglinu a dysfunkcí endotelu je preeklampsie. Výrazně zvýšené hladiny sENG byly detekovány u těhotných žen trpících tímto onemocněním, které se vyznačuje hypertenzí, proteinurií, celkovou endotelovou dysfunkcí a často vede k úmrtí matky a dítěte (Hawinkels et al., 2010). Solubilní endoglin je zvýšený v séru těchto preeklamptických jedinců, koreluje se závažností onemocnění a jeho hladina klesá po porodu (Venkatesha et al., 2006). Před vznikem tohoto onemocnění dochází ke zvyšování hladin nejen sENG, ale i některých cirkulujících faktorů placenty, jako je placentární růstový faktor (PLGF), solubilní VEGF receptor 1 (sVEGFR1 nebo sFlt1), které indukují endotelovou dysfunkci a zasahují do patogeneze onemocnění (Levine et al., 2006; Perucci et al., 2014).

Sérový endoglin hraje hlavní roli jako antiangiogenní faktor a to prostřednictvím inhibičního účinku na TGF- β 1, kdy narušuje vazbu na jeho receptory, včetně účinků na aktivaci eNOS a vazodilataci. Vede k poškození TGF- β signalizace v cévách a spolu s sFlt1 vyvolává endotelovou dysfunkci a přispívá k syndromu preeklampsie (Levine et al., 2006). Nadměrná exprese sENG a sFlt1 interferuje s vaskulární funkcí snížením prokrvení cév, zvýšením jejich propustnosti a způsobuje tak vážné poškození cév, vyvolává hypertenzi nebo lokální vazospasmus (Venkatesha et al., 2006; Hawinkels et al., 2010).

Bylo prokázáno, že hypoxie může hrát roli při zvýšeném uvolňování sENG a že endotelová dysfunkce u preeklampsie může být přičítána oxidačnímu stresu placenty, kdy dochází k nadměrné produkci škodlivých reaktivních kyslíkových radikálů. Hemoxygenáza-1 (HO-1) a její metabolit oxid uhelnatý vyvíjí proti oxidačním stimulům ochranný účinek. V této souvislosti bylo uvedeno, že myši postrádající HO-1 produkovaly vyšší hladiny sENG a sFlt1. Inhibice exprese HO-1 v endotelových buňkách tedy zesiluje uvolňování sFlt1 a sENG z endotelu placenty. Naopak po aktivaci HO-1 signalizace dochází k potlačení exprese těchto působků a ochraně před poškozením endotelu (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010; Perucci et al., 2014).

Některé studie ukázaly zvýšené hladiny i u pacientů s nádorovým onemocněním, kde sENG figuroval jako marker špatné prognózy. Bylo však rovněž popsáno, že sENG inhibuje angiogenezi a mohl by tedy být užitečným nástrojem k inhibici nádorové angiogeneze. Přestože přesná úloha sENG u malignit je zatím nejasná, bylo naznačeno,

že inhibice MMP-14 může být terapeutickou strategií pro patologické stavy se zvýšeným uvolňováním endotinu, jako je preeklampsie (Hawinkels et al., 2010).

Obecně je sENG v poslední době popisován jako marker endotelové dysfunkce a jeho zvýšené hladiny byly zjištěny i u řady pacientů s aterosklerózou. sENG může interagovat s TGF- β 1 a inhibovat jeho signalizaci v cévách, což vede k prozánětlivému stavu ve stěně cévy a vzniku nestabilního aterosklerotického plátu. Jeho vliv na endotelovou dysfunkci a aterosklerotickou aktivitu potvrdil i Blaha et al., který sENG zkoumal jako marker pro hodnocení účinnosti léčby u pacientů s familiární hypercholesterolémií léčených mimotělní eliminací LDL-cholesterolu, tzv. LDL aferézou (Mallat et al., 2001; Blaha et al., 2008).

3. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit a kvantifikovat expresi iNOS a HO-1 v aortě dvou skupin geneticky modifikovaných myší, které se lišily hladinami lidského sérového endoglinu, a kterým byla podávána speciální strava s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Hladina lidského solubilního endoglinu v plazmě byla stanovena pomocí ELISA analýzy, biochemickým stanovením se u myší zjistila hladina celkového cholesterolu v krvi a k vyhodnocení exprese zadaných markerů jsme použili analýzu Western blot.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitá zvířata

V tomto experimentu byly použity samice normocholesterolemických myší (n=12), které tvořily dvě srovnávané skupiny. Jednalo se o 6 měsíců staré transgenní myši kmene CBAXC57BL/6J s vysokými hladinami (průměrně 3480 ng/ml) lidského sérového endoglinu *Sol-Eng*⁺ (n=5) a jejich sourozenecké myši s velice nízkými (nedetekovatelnými) plazmatickými hladinami sENG, použité jako myši kontrolní (n=7). Plazma byla extrahována ze špičky ocasu a pomocí analýzy ELISA Kit (R&D Systems, USA) byly u myší stanoveny hladiny lidského sENG (Valbuena-Diez et al., 2012). Následně byly myši rozděleny do zmíněných skupin. Linie těchto geneticky modifikovaných myší byly získány z laboratoře (Genetically Modified Organisms Generation Unit) Univerzity v Salamance (Španělsko).

Myši byly krmeny experimentální dietou s dostatkem vody po celou dobu studie. Po dobu 3 měsíců byla oběma skupinám myší podávána speciální strava s vysokým obsahem tuku 40% a cholesterolu 1,25% (Research Diets, Inc, USA). Chovány byly v klecích při konstantní teplotě, vlhkosti a byl u nich dodržován 12-ti hodinový světelný cyklus. Po usmrcení jim byly z hrudní části aorty odebrány vzorky tkáně, které se pro Western Blot analýzu zmrazily v tekutém dusíku a do provedení experimentu byly uskladněny při -80°C. Krev byla rovněž odebrána do heparinových zkumavek pro biochemické stanovení hladin celkového cholesterolu.

Veškeré experimenty byly provedeny v souladu s českým Zákonem č. 246/1992 Sb. a používání zvířat bylo schváleno Etickou komisí na ochranu zvířat proti týrání na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Praze a Výborem pro bioetiku Univerzity v Salamance.

4.2 Pracovní postup pro Western blot analýzu

4.2.1 Homogenizace a izolace proteinů

Nejčastější formou použitého vzorku pro Western blot analýzu jsou buněčné lyzáty.

- Vzorky myších tkání se zvážily a následně přidaly do 2 ml mikrokumavek s lyačním RIPA pufrem (Radio Immuno Precipitation Assay buffer; Sigma-Aldrich, USA). RIPA pufr umožňuje efektivní lýzu buněk a rozpouštění proteinů. Jeho součástí byly po přidání také inhibitory proteáz (SERVA electrophoresis, Německo) a fosfatáz (Thermo Fisher Scientific, USA), které zabraňují štěpení vzorku vlastními enzymy.
- Po dobu zpracování tkáně se pracovalo při nízkých teplotách, aby se zabránilo denaturaci a degradaci bílkovin.
- Na 1g tkáně se použilo 20 ml RIPA pufru (na 1ml RIPA - 10 μ l inhibitorů proteáz).
- K extrakci proteinů bylo potřeba vzorky dobře zhomogenizovat. Nejprve se tedy tkáně nastříhaly nůžkami a poté pomocí rotor - statoru rozmixovaly do homogenní tekutiny.
- Hrubý homogenát lze rozdělit centrifugací. Odstředivou silou došlo k urychlení sedimentace a oddělení částic ze suspenze. Centrifuga se zapnula 30 min před použitím a nastavila se na 10 000 RPM (Revolution per minute) otáček při 4°C na 10 minut. Vzniklý supernatant (izolované proteiny v RIPA pufru) se bez tukové vrchní vrstvy odsál a vzorky se následně rozpipetovávaly do předem vychlazených 1,5 ml mikrokumavek.

4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku

Pro izolaci proteinu je velmi důležité mít představu o jeho koncentraci. Ta byla stanovena bicinchoniovou metodou (BCA), která je založena na spektrofotometrickém stanovení (měření absorbance).

Nejprve se stanovovala kalibrační křivka albuminu. Použily se standardní roztoky o známé koncentraci, jako je bovinní sérový albumin (BSA).

- Dle stoupající koncentrace standardního roztoku (0 - 1500 µg/ml) se redistilovanou vodou naředil roztok albuminu.
- Pro ředění vzorků se z každé skupiny myši vybral vzorek referenční - céva ve větším množství RIPA roztoku (vzorek č. 26 a č. 30).
- Do jamky první mikrotitrační destičky se aplikovalo 25µl vzorku a naředěného roztoku albuminu. Vše se pipetovalo v duplikátu.
- Pro zahájení barevné enzymatické reakce bylo potřeba přidat do každé jamky 200 µl reagentu (roztok standardů A a B) v poměru 50:1.
- Vzorky byly řádně promíchány a v termostatu se při 37°C nechaly 30 minut inkubovat.
- Po proběhlé inkubaci se pomocí spektrofotometru proměřila kalibrační řada jamek, dávající vznik kalibrační křivce. Dle intenzity zbarvení středu kalibrační křivky byla nalezena barevná reakce vzorku - purpurové zbarvení, které je přímo úměrné množství bílkoviny a detekovatelné při 562 nm. Z daných výsledků bylo vybráno ředění 10x, které se pro aorty ve většině případů, jako i u našich vzorků, ukázalo jako nejlepší.

Následně se stejným způsobem připravila a proměřila absorbance vzorků napipetovaných na druhé mikrotitrační destičce a ze vzniklé kalibrační křivky pomocí aplikace Microsoft Office Excel přístroj přepočítal ředění a hodnotu koncentrace proteinů ve vzorku v mg/ml.

Tabulka 1: Ředící tabulka vzorků

Sol-Eng+	Koncentrace proteinu (mg/ml)	Aplikovaný protein (µl)	Aplikovaný objem (µl)	Připravený objem (µl)	Ředění vzorku vzorek (µl)	Ředění vzorku voda (µl)
Myš 22	8,32	20	10	60	28,83	31,17
Myš 23	9,68	20	10	60	24,81	35,19
Myš 24	8,46	20	10	60	28,36	31,64
Myš 25	8,78	20	10	60	27,34	32,66
Myš 26	8,08	20	10	60	29,70	30,30
Kontrolní sk.						
Myš 27	7,07	20	10	60	33,95	26,05
Myš 28	7,91	20	10	60	30,35	29,65
Myš 29	9,82	20	10	60	24,45	35,55
Myš 30	8,03	20	10	60	29,90	30,10
Myš 31	8,14	20	10	60	29,47	30,53
Myš 32	8,07	20	10	60	29,75	30,25
Myš 33	8,39	20	10	60	28,61	31,39

4.2.3 Zpracování vzorků

Vzorky se naředily (viz výše Tabulka 1) do zásoby. Pro analýzu Western blot tak byly připravené na několik použití.

- Vždy se vzalo x μ l vzorku a y μ l redestilované vody do celkového objemu 60 μ l. Připravený objem se rozdělil do 8 připravených 0,5 ml mikrozkušavek, kde každá obsahovala 7,0 μ l směsi.
- Naředěné a označené vzorky se ihned uskladňovaly do uzavíratelného sáčku a dávaly do hlubokomrazicího boxu s -80°C .

4.2.4 Western blot analýza

Western blot je důležitá technika používaná v buněčné a molekulární biologii. Použitím této techniky jsou vědci schopni identifikovat specifické proteiny ve vzorku homogenátu tkáně nebo složité směsi proteinů v extraktu. Provedení metody Western blot zahrnuje kombinaci tří kroků:

- Prvně dochází k separaci proteinů na základě molekulových hmotností, a to za pomoci polyakrylamidové gelové elektroforézy.
- Tyto proteiny jsou pak přeneseny (blotovány) z gelu na pevný nosič – membránu, která se následně inkubuje s protilátkami specifickými k proteinu.
- Dojde k navázání protilátek a označený cílový protein se může detekovat. Tloušťka pásu odpovídá množství přítomného proteinu. Pomocí standardu se tak může indikovat množství obsažených bílkovin (Mahmood and Yang, 2012).

4.2.4.1 Příprava roztoků pro analýzu Western blot

- Akrylamid (AA); Acrylamide-Bis Solution (Bio-Rad, USA)
- 1,5M TRIS/HCl pH 8,8 pufr (Separating gel buffer):
 - 45,0 g TRIS base (Sigma-Aldrich, USA)
 - Milli-Q voda - doplnit do 250 ml
 - Upravit pH pomocí koncentrované HCl
 - Skladovat při 4°C

- 0,5 M TRIS/HCl pH 6,8 pufr (Stacking gel buffer):
 - 15,0 g TRIS base (Sigma-Aldrich, USA)
 - Milli-Q voda - doplnit do 250 ml
 - Upravit pH pomocí koncentrované HCl
 - Skladovat při 4°C

- 10% Dodecylsírán sodný (SDS); Sodiumdodecylsulfate for electrophoresis:
 - 0,1 g SDS (Sigma-Aldrich, USA)
 - Milli-Q voda – doplnit do 1 ml

- 10% Persírán amonný (APS); Ammonium persulfate:
 - 50 mg APS (Bio-Rad, USA)
 - Milli-Q voda – doplnit do 0,5 ml
 - Skladovat při -70°C

- Isobutanol; sekundární butanol saturovaný H₂O:
 - 50,0 ml 2-butanol (Sigma-Aldrich, USA)
 - 10,0 ml Milli-Q voda
 - Skladovat při 4°C

- Nanášecí (vzorkový) pufr (Sample buffer):
 - 1,25 ml Stacking gel buffer
 - 2,0 ml 10% SDS (Sigma-Aldrich, USA)
 - 1,15 ml Glycerol (USB, USA)
 - 0,5 mg Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)
 - 0,35 ml Milli-Q voda
 - Skladovat při -20°C

- Transferový pufr; pH 8,3 (Transfer buffer):
 - 15,15 g TRIS (25 mM) (Sigma-Aldrich, USA)
 - 72,00 g Glycin (192 mM) (Sigma-Aldrich, USA)
 - 1000 ml Metanol (20%) (Sigma-Aldrich, USA)
 - Milli-Q voda – doplnit do 5000ml

- Pufr pro 1D SDS-PAGE mini; pH 8,3 (Running buffer):
 - 15,0 g TRIS (25 mM) (Sigma-Aldrich, USA)
 - 72,0 g Glycin (192 mM) (Sigma-Aldrich, USA)
 - 2,5 g SDS 0,1% (Sigma-Aldrich, USA)
 - Milli-Q voda - doplnit do 2500 ml
 - Skladovat při 4°C

- 10x koncentrovaný TBS pufr; pH 7,5 (TBS-Tris-buffered saline):
 - 48,8 g TRIS (20 mM) (Sigma-Aldrich, USA)
 - 160,0 g NaCl (137 mM) (Sigma-Aldrich, USA)
 - Milli-Q voda doplnit do 2000ml
 - Upravit pH koncentrovanou HCl
 - Skladovat při 4°C

- Roztok TBS:
 - 200 ml 10x Koncentrovaný TBS pufr
 - 1800 ml Milli-Q voda
 - Skladovat při 4°C

- Roztok TBS s 0,1% TWEEN 20 (TBS-T):
 - 200 ml 10x Koncentrovaný TBS pufr
 - 1800 ml Milli-Q voda
 - 1 ml TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, USA)
 - Skladovat při 4°C

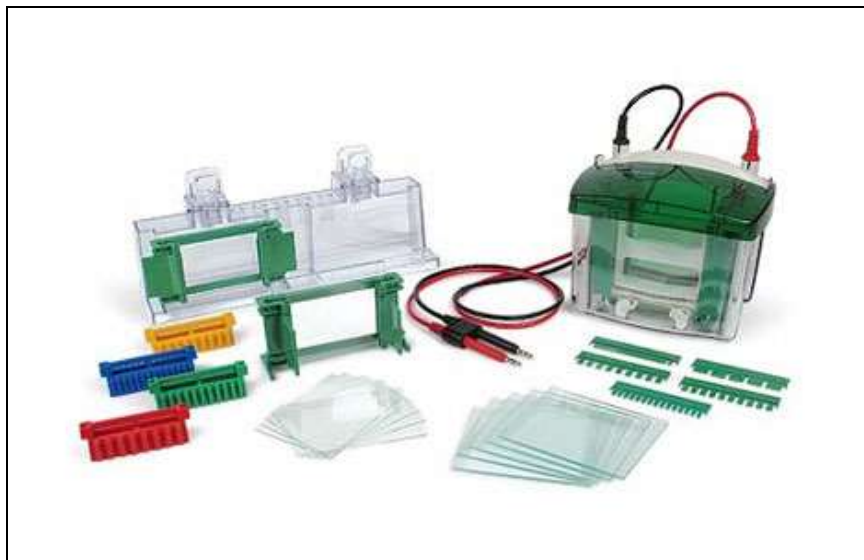
- Roztok 5% mléka v TBS s 0,1% TWEEN 20 (TBS-T 5% mléko); Blocking solution/buffer
 - 5,0 g Netučné mléko (Bio-Rad)
 - 100 ml roztok TBS-T

4.2.4.2 Příprava gelů

Složení aparatury:

- V první řadě se nachystala skla, které byly omyté destilovanou vodou, očištěné 96% etanolem a gázou vyleštěny do sucha. Pro přípravu 1 gelu je potřeba dvou skel - kratší a delší.
- Skla se položila na sebe a zasunuly se do zeleného stojánku s kratším sklem směrem dopředu. Dvířka stojanu se uzavírala směrem do boku. Následně se zelený stojánek připevnil do průhledné aparatury.
- Mezi skla se stříčkou vstříklo menší množství vody, aby se zjistilo, zda aparatura dobře těsní a gel nebude vytékat. Poté se vysušila filtračním papírem či suchou gázou.

Obrázek 8: Aparatura, skla, hřebínky a elektroforetická vana



Převzato: <<http://www.bio-rad.com/en-us/product/electrophoresis-chambers/mini-protean-tetra-handcast-systems>> [2015-04-02]

Nalítí separačního gelu: Koncentrace gelu se vybírá na základě molekulové hmotnosti (kDa) sledované protilátky. Čím bude velikost proteinu menší, tím rychleji a snadněji projde gelem. V tomto případě by tedy byla potřeba koncentrovanějšího gelu, aby se zachytila jejich separace.

- Protein 25 – 200 kDa / 8% gel; 15 – 100 kDa / 10% gel; 10 – 70 kDa / 12% gel; 12 – 45 kDa / 15% gel; 4 – 40 kDa / 20% gel
- Dle výběru sledovaného proteinu byl vybrán separační gel:
 - HO-1 (33 kDa) 12%
 - iNOS (100 – 130 kDa) 8%
- Pro přípravu roztoku se nejprve napipetoval akrylamid s pufrem, vodou a SDS a nakonec se lehce vmíchal TEMED s APS (viz níže Tabulka 2), po jejichž přidání začala polymerace gelu.
- Napipetování separačního gelu do aparatury skel muselo probíhat co nejrychleji. Gel se plnil asi 1,5 cm pod horní hranu kratšího sklíčka (1 mm nad zelený okraj).
- Gel se následně převrstvil (vrstva cca 1 cm) isobutanolem, který vyhnal případně vzniklé bubliny a vyrovnal hladinu po celé délce.
- Polymerace gelu trvala přibližně 40–60 minut. Kontrolou bylo ztuhnutí zbytku gelu v kádince.
- Isobutanol se vylil, několikrát propláchl destilovanou vodou a v zeleném stojanu zbyl pouze separační gel.

Nalítí zaostřovacího gelu: jeho koncentrace (5%) je pro všechny separační gely stejná (viz níže Tabulka 2).

- Zaostřovací gel se pipetou naléval na separační gel až po horní okraj skel, kde začal z aparatury vytékat.
- Ihned se do gelu vložil teflonový hřebínek s počtem zubů dle počtu nanášených vzorků. Po vložení se nesmělo s žebříkem vůbec hýbat. Nutné bylo doplňovat gel po okrajích hřebínku, kde docházelo díky tuhnutí ke snižování hladiny a tvorbě nežádoucích bublinek.
- Aby se vytvořily pěkné jamky pro aplikaci vzorků, gel se musel nechat pořádně zatuhnout. Polymerace probíhala 45-60 minut, někdy i mnohem déle.

Tabulka 2: Složení gelů

Milli-Q= redestilovaná voda; SDS= Sodiumdodecylsulfate; APS= Ammonium persulfate; TEMED= N, N, N', N' – tetramethylethyldiamin.

	Separační gel		Zaostřovací gel
	8% (ml)	12% (ml)	5% (ml)
	1 gel / 2 gely	1 gel / 2 gely	
Milli-Q	5,400 / 10,800	4,400 / 8,800	6,150
Separating gel buffer	2,500 / 5,000	2,500 / 5,000	/
Stacking gel buffer	/	/	2,500
Acrylamid	2,000 / 4,000	3,000 / 6,000	1,250
10% SDS	0,100 / 0,200	0,100 / 0,200	0,100
10% APS	0,030 / 0,060	0,030 / 0,060	0,030
TEMED	0,015 / 0,030	0,015 / 0,030	0,015

4.2.4.3 Příprava vzorků

- Předchystané naředěné vzorky se nechaly rozmrazit.
- 7,0 µl vzorku se promísilo v poměru 1:1 s nanášecím pufrem (Sample buffer).
- Vzorky se zvortexovaly a následně povařily v termobloku při 95°C 5 minut.
- Nechaly se ochladit na pokojovou teplotu a poté se stočily na centrifuze.

4.2.4.4 Aplikace vzorků a elektroforéza

- Hřeben se opatrně vytáhl z gelu a vytvořené jamky se vypláchly připraveným 1D SDS-PAGE elektroforetickým pufrem.
- Ze zeleného stojanu se vytáhla skla se ztuhlým gelem a přenesla se do držáku elektroforetické vany. Kratší skla směřovala dovnitř vany, delší tlustší skla ven. Vnitřními skly se tak vytvořila tzv. horní komora.
- Zda je aparatura dobře sestavena a nepoteče, se zjistilo naplněním horní komory 1D SDS-PAGE pufrem. Poté se doplnila až 0,5 cm pod okraj, aby byly jamky pod hladinou.
- Prostor elektroforetické vany se naplnil stejným pufrem po rysku.

- Následně se do 15-ti vzniklých jamek nanášely mikropipetou vzorky a standard o známé molekulové hmotnosti, hmotnostní marker (Precision Plus Protein Standards; Bio-Rad).
- 5 μg standardu se aplikovalo obvykle do první jamky, kde po elektroforéze rozjel viditelnou škálu prvků o konkrétní molekulové hmotnosti.
- Do zbylých jamek se aplikovaly naředěné vzorky po 10 μl .
- Hladina horní komory se doplnila pufrem po okraj a vzniklé bublinky se odstranily.
- Nakonec se elektroforetická vana uzavřela víkem s elektrodami, zapojila do zdroje a obložila chladítky z mrazícího boxu. Nastavily se podmínky elektroforézy:
 - Konstantní napětí: 200 V
 - Maximální proud: 15 mA/gel
 - Čas separace: 1,15 hod
- Po nastaveném čase a vyjetí čela (značené bromfenolovou modří v nanášecím pufru) se zdroj vypnul.
- Oba pufry se slily a skla se od sebe kývavým pohybem opatrně oddělila.
- Sklo, na kterém zůstal gel, se položilo na stůl a zaostřovací gel se odřízl. Okraje gelu separačního se odchlípily, aby se lépe přenesl do vaničky s připraveným transferovým pufrem.

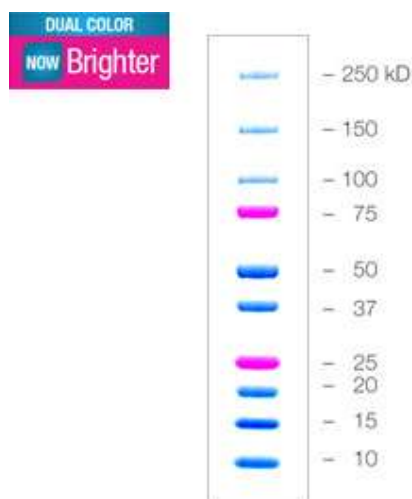
4.2.4.5 Blotování polosuchou cestou

Proteiny se z gelu na membránu přenášejí pomocí přístroje Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad).

- Byla použita PVDF (polyvinylidenfluoridová) membrána (Millipore, USA). Muselo se s ní zacházet velmi citlivě, pracovat nejlépe s pinzetou či plastovou lopatkou.
- Membrána se nastříhala podle velikosti gelu a pro transfer proteinů ji bylo nutné aktivovat. Postupně se smočila v misce s metanolem (15 sekund) a poté v destilované vodě (2 minuty).
- Mezitím se dle počtu gelů nastříhaly extra silné filtrační papíry, ty se namočily do transferového pufru a položily na anodu blotovacího přístroje.

- Na filtrační papíry se opatrně položily zaktivované membrány, s kterými se už dále nehýbalo. Na ně se za pomoci lopatky přenesly gely a ty byly překryty dalším filtračním papírem. Vznikl tzv. sandwich, který se nakonec lehce přešel válečkem pro vytlačení bublin.
- Přiklopila se katoda, zavřelo víko a nastavily se podmínky přenosu:
 - Pro 2 gely: 170 mA, 25 V, 30 minut
 - Pro 4 gely: 200 mA, 25 V, 75 minut
- Po uplynutí doby transferu se otevřelo víko, elektrody opláchly destilovanou vodou a přilepený gel na filtračním papíru se odstranil.
- Membrána se zachycenými proteiny se vložila do destilované vody. Díky hmotnostnímu markeru a jeho barevně rozjeté škále proteinů, se membrány nastříhaly dle potřebných kDa (viz níže Obrázek 9).
 - HO-1 (33 kDa) membrány stříženy v rozmezí lehce pod 25 kDa a lehce nad 50 kDa
 - iNOS (130 kDa) membrány stříženy v rozmezí lehce nad 75 kDa a lehce nad 150 kDa

Obrázek 9: Hmotnostní marker znázorňující škálu proteinových bandů



Převzato: <<http://www.bio-rad.com/en-cn/sku/161-0374-precision-plus-protein-dual-color-standards>> [2015-03-31]

4.2.4.6 Imunodetekce

- Membrány se ihned po nastříhání ponořily do vytvořených parafilmových vaniček, kde byly blokovány roztokem TBS-T-5% mléka. Blokace trvala 1 hodinu a došlo k vyvázání nespecifických míst na membráně.
- Mezitím se naředily primární protilátky (cílené na myší tkáň) v roztoku TBS-T-5% mléka:
 - Rabbit polyclonal anti-HO-1 (Abcam, UK) v ředění 1:2000
 - Rabbit polyclonal anti-iNOS (Santa-Cruz Biotechnology, USA) v ředění 1:200+ pro potvrzení jednotné nanášky proteinů: Mouse monoclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich, USA) v ředění 1:10000
- Membrány se vložily do vaniček proteiny nahoru a s naředěnou primární protilátkou se nechaly inkubovat přes noc při 4°C za stálého kývání.
- Druhý den se vložily do nádob s TBS-T roztokem, 3x po sobě se promyly a nechaly 10 minut na třepačce při pokojové teplotě. Promývání a výměna roztoku probíhala 5x po 10 minutách.
- Mezi promýváním se naředily sekundární protilátky v roztoku TBS-T-5% mléka:
 - HO-1: HRP (Horseshoe peroxidase) conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam, UK) v ředění 1:1000
 - iNOS: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam, UK) v ředění 1:1000
 - GAPDH: HRP conjugated goat anti-mouse IgG (Abcam, UK) v ředění 1:20000
- Poté proběhla inkubace se sekundárními protilátkami, a to 1 hodinu při pokojové teplotě na kývačce.
- Membrány se vložily do nádob s TBS-T roztokem, 3x po sobě se promyly a nechaly 10 minut na třepačce při pokojové teplotě. Promývání a výměna roztoku probíhala 5x po 10 minutách.

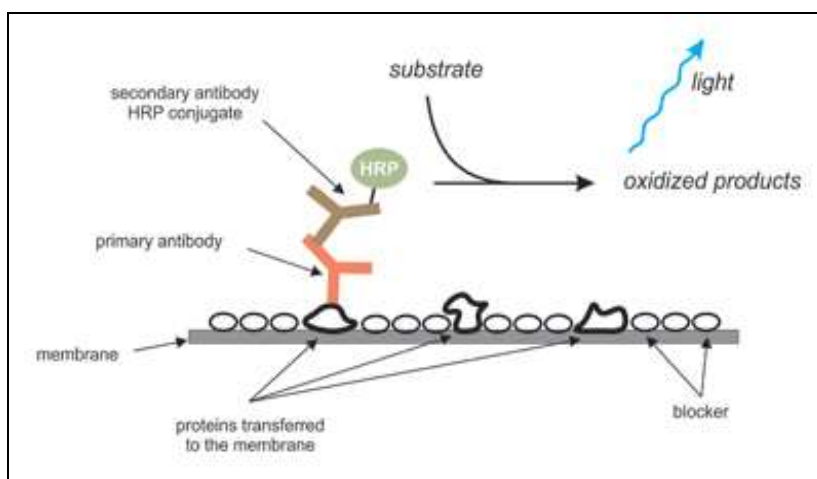
4.2.4.7 Chemiluminiscenční detekce

- Promyté a okapané membrány se položily proteiny vzhůru na nachystané plastické folie.
- Složky detekčního kitu (Thermo Fisher Scientific, USA) se smíchaly v poměru 1:1, a to v dostatečném množství pro zalití celé membrány.
- Detekční roztok se nanasl na membrány a v závislosti na volbě chemiluminiscenčního substrátu (Pico/Femto) se nechal inkubovat předepsaný čas, který musel být přesný, aby nedošlo k přepálení membrány.
 - HO-1: Femto (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate)
20 sekund
 - iNOS: Femto (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate)
5 sekund
 - GAPDH: Pico (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate)
1 minuta
- Přebytečné množství reagens se odsálo gázou, membrány se zabalily do průhledných folií a ihned vložily do kazety na film. Zafixovaly se lepící páskou a pro vytlačení bublin přetřely gázou.
- V temné komoře se nachystaly vaničky s vývojkou, ustalovačem a čistou vodou.
- Na membrány se přikládaly RTG filmy (Foma, ČR), které se po expozici ihned vyvolaly.

Sekundární protilátky, které jsou vázané na primární protilátky sledovaného proteinu, jsou značené křenuvou peroxidázou (HRP). Mezi tímto enzymem a chemiluminiscenční látkou proběhla chemická reakce (oxidace luminolu), která zapříčinila luminiscenci a detekovala místa sledovaných proteinů. Tloušťka vzniklých bandů, po srovnání se standardem, vede k identifikaci proteinu a odpovídá jeho množství. Jejich kvantifikace byla provedena pomocí programu pro analýzu obrazu NIS (Laboratory Imaging, ČR).

Obrázek 10: Princip Western blot detekce chemiluminiscenční reakcí

Primární protilátka se váže k proteinu, který je přenesen a imobilizován na nosiči membrány. Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) je namířena proti primární protilátce a detekuje její umístění. HRP substrát se aplikuje na blotu a generovaná luminiscence je produktem enzymatické reakce (oxidace luminolu), která se detekuje za pomoci RTG filmů.



Převzato: <http://advansta.com/Chemiluminescent_Western_Detection.html> [2015-04-02]

4.2.4.8 Statistická analýza

Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba v průměru) pro každou skupinu zvířat, tedy pro 7 (kontrolní skupina) a 5 (*Sol-Eng*⁺) myši dané skupiny. Statistická významnost rozdílů ve skupinách se hodnotila nepárovým tzv. T-testem v programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., Kalifornie), který stanovil hodnotu *p*-hladiny. Rozdíly mezi skupinami jsou tedy statisticky významné, pokud je *p* hodnota 0,05 nebo menší. V grafu jsou hodnoty *p* značené symbolem „*“, kde platí: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

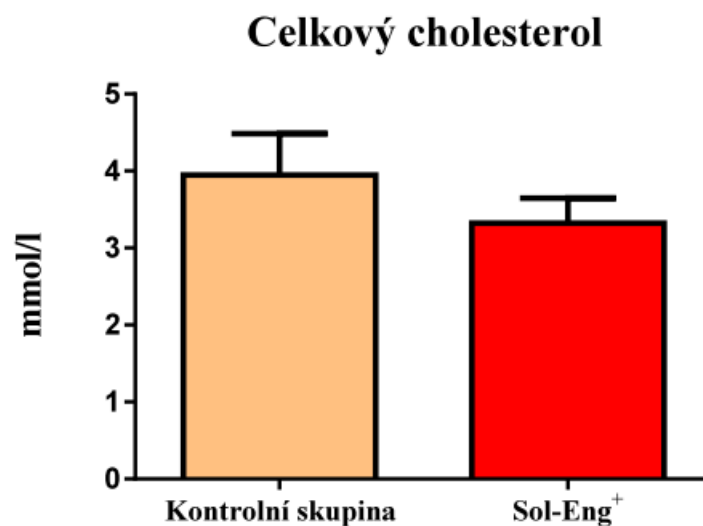
5. VÝSLEDKY

5.1 Biochemická analýza

Biochemickou analýzou byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu u všech zkoumaných myší. Skupina transgenních myší *Sol-Eng*⁺, tři měsíce krmená speciální dietou bohatou na tuky a cholesterol, však nevykazovala zásadní rozdíl v hladinách celkového cholesterolu v porovnání se skupinou kontrolních myší, bez zvýšených hladin lidského sENG krměných stejnou dietou. Jejich rozdíly hladin byly statisticky nevýznamné ($3,947 \pm 0,539$ mmol/l vs. $3,322 \pm 0,324$ mmol/l; $p=0,3308$). Výsledky v Grafu 1 jsou uvedené v mmol/l.

Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u zkoumaných myší (mmol/l)

Tříměsíční podávání speciální diety a zvýšené hladiny lidského sérového endoglinu u myší skupiny Sol-Eng⁺ statisticky významně neovlivnily hladiny celkového cholesterolu v porovnání se skupinou kontrolních myší.



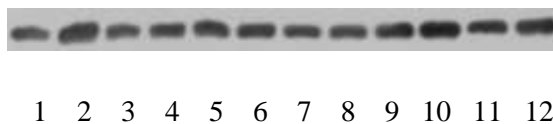
5.2 Western blot analýza

Výsledky Western blot analýzy znázorňují expresi sledovaných proteinů ve vzorcích hrudní aorty daných skupin myší.

Naše měření prokázalo statisticky významný nárůst exprese hemoxygenázy-1 (HO-1) u skupiny myší *Sol-Eng*⁺ se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu. V porovnání s kontrolní skupinou exprese tohoto enzymu dosahovala v průměru více než dvojnásobných hladin ($100,0 \pm 7,80$ % vs. $222,6 \pm 29,20$ %; $p=0,0025$ – viz Graf 2). Statisticky významný nárůst jsme zaznamenali i u enzymu iNOS, kde byla exprese také dvakrát tak vyšší jak u skupiny kontrolní ($100,0 \pm 9,85$ % vs. $221,5 \pm 31,50$ %; $p=0,0025$ – viz Graf 3). Foto RTG snímků s vyobrazenými bandy proteinů z chemiluminiscenční detekce jsou na Obrázku 12 (HO-1 detekce) a Obrázku 13 (iNOS detekce). Potvrzení jednotné nanášky proteinů (GAPDH detekce) níže na Obrázku 11.

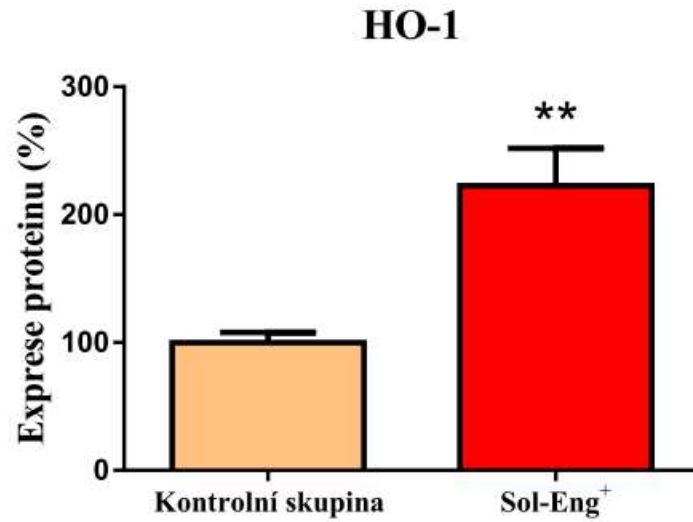
Obrázek 11: Foto RTG snímku – detekce GAPDH (30-40 kDa)

Kontrolní skupina – vzorky č. 1 – 7 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky 8 – 12. Potvrzení jednotné nanášky proteinů



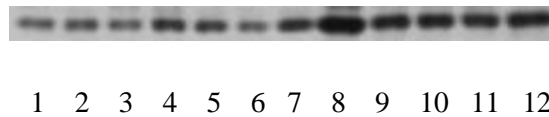
Graf 2: Western blot analýza exprese HO-1 (%)

Sloupec 1 znázorňuje expresi HO-1 u skupiny myši kontrolních a sloupec 2 expresi HO-1 u skupiny myši se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu. Ve srovnání se skupinou kontrolní došlo u skupiny Sol-Eng⁺ k signifikantnímu zvýšení exprese HO-1 v cévě (** $p \leq 0,01$).



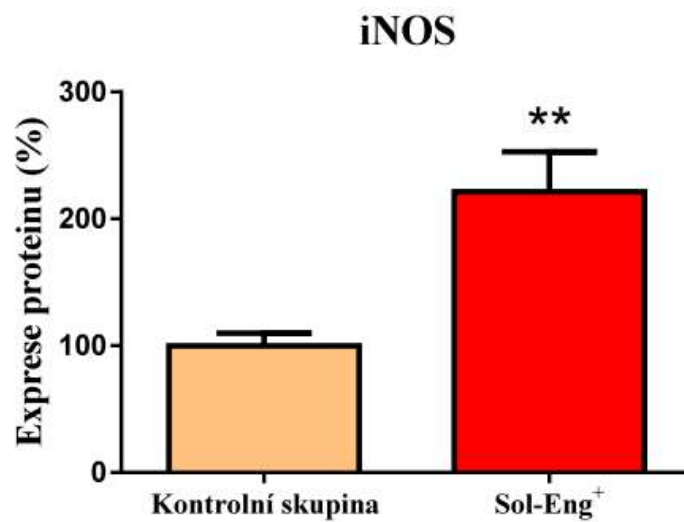
Obrázek 12: Foto RTG snímku - detekce HO-1 (33 kDa)

Kontrolní skupina – vzorky č. 1 – 7 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky 8 – 12.



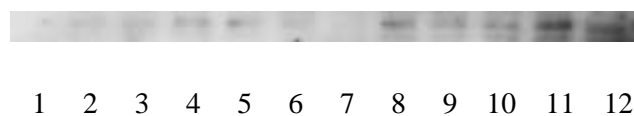
Graf 3: Western blot analýza exprese iNOS (%)

Sloupec 1 znázorňuje expresi iNOS u skupiny myši kontrolních a sloupec 2 expresi iNOS u skupiny myši se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu. Ve srovnání se skupinou kontrolní došlo u skupiny Sol-Eng⁺ k signifikantnímu zvýšení exprese iNOS v cévě (** $p \leq 0,01$).



Obrázek 13: Foto RTG snímku - detekce iNOS (100-130 kDa)

Kontrolní skupina – vzorky č. 1 – 7 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky 8 – 12.



6. DISKUZE

Endotelová dysfunkce může sloužit jako nezávislý marker onemocnění cév a kardiovaskulárních poruch. Lze ji charakterizovat jako generalizovaný defekt všech mechanismů homeostázy, kterou endotelové buňky zajišťují (Verma et al., 2003).

Úzký vztah k rozvoji endotelové dysfunkce má i oxidační stres. Převaha reaktivních forem kyslíku má škodlivé účinky na buněčné a tkáňové funkce. Superoxidový anion reaguje v endotelové buňce s oxidem dusnatým, rozvíjí se nitrační stres a vznikají reaktivní formy dusíku. Vzniklý nestabilní peroxynitrit reaguje s tyrozinem polypeptidů za vzniku cytotoxického nitrotyrozinu, degraduje sacharidy, štěpí DNA a navozuje peroxidaci lipidů. Prostřednictvím oxidace kofaktoru pro eNOS a její funkční změny se podílí na patogenezi endotelu ztrátou NO a jeho vazodilatačních a dalších protektivních účinků (Esper et al., 2006). Kromě snížené exprese eNOS oxidační stres ovlivňuje řadu dalších signálních molekul. Aktivuje endotelin-1, indukuje expresi adhezních molekul a aktivuje nukleární faktor NF κ B, který mimo jiné indukuje transformující růstový faktor TGF- β a expresi indukibilní NO-syntázy (iNOS) (Beckman et al., 2002; Chew and Watts, 2004).

iNOS je molekula uvolňována na základě prozánětlivých stimulů. Zastává funkci vrozené imunitní odpovědi a NO produkuje jako obranný mechanismus. NO katalyzovaný iNOS se obvykle vyskytuje v oxidačním prostředí a je cytotoxický. Pokud by došlo k jeho nadprodukcí na nesprávném místě, může poškodit kromě patogenů i zdravé buňky (Nathan and Hibbs, 1991; Forstermann and Sessa, 2012). iNOS je dáována do souvislosti s aterogenezí a onemocněním cév. Její exprese byla zjištěna v buňkách hladkého svalstva cév a potvrdil se i vzájemný výskyt s oxidovanými lipidy v ateromovém plátu. Může se jednat o expresi iNOS stimulovanou zvýšenými hladinami oxidových anionů v plátech, které vedou ke zvýšení oxidačního stresu a poškození tkáně (Wever et al., 1998; Colman et al., 2006). iNOS může hrát roli i v patogenezi hypertenzních stavů, včetně preeklampsie a esenciální hypertenze. Slouží jako významný zdroj NO v endotelových buňkách a cévách placenty. Podílí se tak na regulaci toku krve. Bylo pozorováno, že inhibice NO u březích potkanů způsobuje příznaky podobné těm, které jsou u těhotenství indukované hypertenze, včetně proteinurie a trombocytopenie. Aktivace a uvolnění iNOS v buňkách hladkého svalstva cév a kardiomyocytů je spojováno i s oběhovým šokem, který je přičítán nadměrné

tvorbě NO, následné systémové hypotenzi a snížené perfuzi tkání (Wong and Billiar, 1994; Forstermann and Sessa, 2012).

Dalším potencionálním markerem patogeneze endotelové dysfunkce, který jsme v experimentální práci sledovali, je HO-1. Expres této molekuly je reakcí na oxidační stres, hypoxii nebo je indukována prozánětlivým stavem cévy a různým poraněním (Abraham and Kappas, 2008; Ryter et al., 2006). Řadou studií je prokázáno, že zajišťuje ochranu před oxidačním stresem, ischemicko-reperfuzním poškozením, cévní hypertrofií, přispívá k potlačení zánětlivé reakce a podporuje hojení ran a neovaskularizaci (Pae et al., 2008; Ryter and Choi, 2009). HO-1 inhibuje reaktivní formy kyslíku, iNOS a další kroky v rozvoji aterosklerózy. Její exprese je zvýšena při aktivaci endotelu, proliferaci buněk hladkého svalstva a při uvolnění zánětlivých cytokinů (Abraham and Kappas, 2008). Kromě aterosklerózy je HO-1 spojována s řadou jiných poruch a onemocnění – hypertenze, ischemie myokardu, diabetes mellitus (Giuliano et al., 1995), astma, při transplantaci orgánů a dalších (Wagener et al., 2001).

Sérový endoglin (sENG) je v současné době považován za potencionální marker endotelové dysfunkce u řady onemocnění, jako je například preeklampsie (Venkatesha et al., 2006), ateroskleróza (Blann et al., 1996; Strasky et al., 2011), hypercholesterolemie (Blaha et al., 2008) nebo diabetes mellitus a hypertenze (Blazquez-Medela et al., 2010). Zjistilo se, že patrně prostřednictvím inhibičního účinku na TGF- β 1 působí sENG jako antiangiogenní faktor a vede k poškození TGF- β signalizace v cévách. Nadměrná exprese sENG interferuje s vaskulární funkcí, vyvolává hypertenzi a přispívá k syndromu preeklampsie (Venkatesha et al., 2006; Valbuena-Diez et al., 2012). Zvýšené uvolňování sENG bylo popsáno v souvislosti s hypoxií a endotelová dysfunkce u preeklampsie byla přičítána oxidačnímu stresu placenty. Zvýšené hodnoty hladin sENG byly zjištěny také u hypercholesterolemických pacientů, kde korelovaly s hladinou cholesterolu. sENG byl u těchto pacientů dáván do souvislosti s aterosklerotickou aktivitou a rozvojem dysfunkce endotelu (Blann et al., 1996; Blaha et al., 2008). Významně zvýšené hladiny sENG se projeví i po cholesterolové dietě u apoE/LDLR deficientních myší (Strasky et al., 2011) a zřetelně klesaly po podání statinů (Rathouska et al., 2011).

Z uvedených studií tedy vyplývá, že by sENG mohl být markerem endotelové dysfunkce a jeho vysoké hladiny by mohly indukovat endotelovou dysfunkci v aortě myší.

S ohledem na možnou roli sENG ve vývoji systémové endotelové dysfunkce byla začátkem roku 2015 publikována studie na transgenních myších vykazujících vysoké hladiny lidského sérového endoglinu (*Sol-Eng*⁺). Cílem této nedávné studie bylo posoudit, zda se endotelová dysfunkce projeví v aortě myší *Sol-Eng*⁺ v porovnání s kontrolní skupinou – jejich transgenními sourozenci s nízkými hladinami sENG. Tyto myši byly krmeny standardní (tzv. chow) dietou. Studie však poukázala na nevýznamný nebo žádný rozdíl exprese markerů endotelové dysfunkce v aortě myší, včetně jejího funkčního poškození, čímž naznačila, že vysoká koncentrace lidského sérového endoglinu v plazmě zřejmě sama o sobě nemůže vyvolat funkční změny endotelu aorty těchto transgenních myší (Nemeckova et al., 2015).

Na podkladě výše zmíněné studie jsme v naší studii u transgenních myší *Sol-Eng*⁺ sledovali expresi molekul oxidačního a nitračního stresu (HO-1 a iNOS), jako potenciálních markerů endotelové dysfunkce a jejich změny při vysokých hladinách lidského sENG. Oproti předchozí studii však byla použita cholesterolová dieta, kdy po dobu 3 měsíců dostávala skupina *Sol-Eng*⁺ i kontrolní skupina myší speciální stravu bohatou na tuky a cholesterol. Podle výsledků biochemické analýzy tato strava v kombinaci se zvýšenými hladinami lidského sENG významně neovlivnila hladiny celkového cholesterolu v porovnání u skupiny myší kontrolních. Western blot analýzou jsme se však posunuli o krok dál a zjistili jsme poměrně významné rozdíly v expresi markerů oxidačního a nitračního stresu. Exprese iNOS i HO-1 dosahovala u *Sol-Eng*⁺ v průměru více než dvojnásobných hladin oproti skupině kontrolní. Což znamená, že pravděpodobně nikoliv sENG samotný, ale až v kombinaci s cholesterolovou dietou ovlivňuje endotel ve smyslu indukce oxidačního/nitračního stresu. Potvrzení, zda se zvýšený sérový endoglin společně s cholesterolovou dietou skutečně podílí na funkčním poškození cévy, však bude vyžadovat komplexnější metodické zhodnocení.

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit a kvantifikovat expresi iNOS a HO-1 v aortě transgenních myší se zvýšenou hladinou lidského sérového endoglinu (*Sol-Eng*⁺), kterým byla podávána speciální strava s vysokým obsahem tuku a cholesterolu, v porovnání se skupinou kontrolní (s nízkými hladinami sENG) na těžce dietě.

Zjistilo se, že tříměsíční cholesterolová dieta u myší *Sol-Eng*⁺ nijak významně neovlivnila hladiny celkového cholesterolu v porovnání se skupinou kontrolních myší. Lze tedy říci, že faktorem, kterým se obě skupiny myší od sebe lišily, byly pouze hladiny lidského sENG.

Měření prokázalo statisticky významný nárůst exprese HO-1 a iNOS u sledované skupiny oproti skupině kontrolní, což naznačuje, že pod vlivem cholesterolové diety může zvýšený sérový endoglin indukovat expresi markerů oxidačního/nitračního stresu a tím potenciálně stimulovat endotelovou dysfunkci. Zda se sérový endoglin skutečně podílí na indukci funkčního poškození cév, však ukáží další studie.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abraham, N. G. and Kappas, A., 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev.* 60 (1): 79-127.

Aktan, F., 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sci.* 75 (6): 639-653.

Barbara, N. P., Wrana, J. L. and Letarte, M., 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem.* 274 (2): 584-594.

Barton, S. G., Rampton, D. S., Winrow, V. R., Domizio, P., et al., 2003. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones.* 8 (4): 329-334.

Beckman, J. A., Creager, M. A. and Libby, P., 2002. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology and management. *Jama.* 287 (19): 2570-2581.

Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M. and Quintanilla, M., 2009. An emerging role of TGF- β co-receptors in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1792 (10): 954-973.

Blaha, M., Cermanova, M., Blaha, V., Jarolim, P., et al., 2008. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 197 (1): 264-270.

Blankenberg, S., Barboux, S. and Tiret, L., 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 170 (2): 191-203.

Blann, A. D., Wang, J. M., Wilson, P. B. and Kumar, S., 1996. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 120 (1): 221-226.

Blazquez-Medela, A. M., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M. A., Recio-Rodriguez, J. I., et al., 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med.* 8 (1): 86.

Bobik, A., 2006. Transforming growth factor- β s and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (8): 1712-1720.

- Bot, P. T., Hoefler, I. E., Sluijter, J. P., Van Vliet, P., et al., 2009. Increased expression of the transforming growth factor- β signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke*. 40 (2): 439-447.
- Bultas, J., Hořejší, J., Cífková, R., Češka, R., et al., 1999. *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční*. 1. vyd. Praha: Galén. 127 s. ISBN 80-7262-026-6. Kapitola 1: Endoteliální dysfunkce. 11-41.
- Celermajer, D. S., 1997. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 30 (2): 325-333.
- Cipollone, F., Faiza, M., Mincione, G., Iezzi, A., et al., 2004. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke*. 35 (10): 2253-2257.
- Colman, R. W., Marder, V. J., Clowes, A. W., George, J. N., et al., 2006. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 5. vyd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1822 s. ISBN-13: 978-0-7817-4996-1. Kapitola 42: The vascular biology of nitric oxide and nitric oxide synthases. 653-666.
- Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M. and Bernabeu, C., 2000. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 153 (2): 323-335.
- Corson, M. A., James, N. L., Latta, S. E., Nerem, R. M., et al., 1996. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 79 (5): 984-991.
- Češka, R., 1999. *Cholesterol a ateroskleróza; Léčba hyperlipidémií*. 2. vyd. Praha: Maxdorf s.r.o. 226 s. ISBN 80-85800-95-0. Kapitola: Ateroskleróza. 9-43.
- Deanfield, J. E., Halcox, L. P. and Rabelink, T. J., 2007. Endothelial function and dysfunction. *Circulation*. 115 (10): 1285-95.
- Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez, R., Langa, C., Rodriguez-Barbero, A., et al., 2002. Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochem Biophys Acta*. 1587 (1): 36-44.

- Esper, R.J., Nordaby, R.A., Vilarino, J.O., Paragano, A., et al., 2006. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 5 (4): 4-22.
- Feinberg, M. W. and Jain, M. K., 2005. Role of transforming growth factor-beta1/Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis. *Panminerva Med.* 47 (3): 169-186.
- Forstermann, U. and Munzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 113 (13): 1708–1714.
- Forstermann, U. and Sessa, W. C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33 (7): 829-837.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288 (5789): 373-376.
- Giuliano, D., Ceriello, A. and Pavlisso, G., 1995. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism.* 44 (3): 363-368.
- Gorelik, L. and Flavell, R. A., 2000. Abrogation of TGF-beta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 12 (2): 171-181.
- Govers, R. and Rabelink, T.J., 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280 (2): 193-206.
- Grainger, D. J., 2004. Transforming growth factor β and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24 (3): 399-404.
- Grochot-Przeczek, A., Lach, R., Mis, J., Skrzypek, K., et al., 2009. Heme oxygenase-1 accelerates cutaneous wound healing in mice. *PLos One.* 4 (6): e5803.
- Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendia, A., Perez-Alvarez M. J., et al., 1999. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 78 (9): 614-623.
- Halcox, J. P., Narayanan, S., Cramer-Joyce, L., Mincemoyer, R., et al., 2001. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280 (6): 2470–2477.

- Hawinkels, L. J., Kuiper, P., Wiercinska, E., Verspaget, H. W., et al., 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP) – mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 70 (10): 4141-4150.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., et al., 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 267 (27): 19027-19030.
- Chew, G. T. and Watts, G. F., 2004. Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the recoupling hypothesis. *QJM.* 97 (8): 537-548.
- Jenkins, G., 2008. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 40 (6-7): 1068-1078.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J. V., Prieto, M., Carron, R., et al., 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 18 (3): 609-611.
- Johnson, R. A., Kozma, F. and Colombari, E., 1999. Carbon monoxide: from toxin to endogenous modulator of cardiovascular functions. *Braz J Med Biol Res.* 32 (1): 1-14.
- Kapur, N. K., Morine, K. J. and Letarte, M., 2013. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag.* 9 (1): 195-206.
- Karásek, D., Vaverková, H., Halenka, M., Hutyra, M., et al., 2004. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi.* 6 (9): 450-453. ISSN 1212-7299.
- Karetová, D., 2002. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína pro praxi.* 4 (3): 119-122. ISSN 1212-7299.
- Konrádová, V., Uhlík, J. and Vajner, L., 2000. *Funkční histologie.* 2. vyd. Jinočany: Nakladatelství H&H Vyšehradská, s.r.o. 291 s. ISBN 80-86022-80-3. Kapitola: Kardiovaskulární systém. 115-122.
- Lavery, H. G., Wakefield, L. M., Occleston, N. L., O'kane, S., et al., 2009. TGF- β 3 and cancer: a review. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20 (4): 305-317.

- Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., et al., 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23 (20): 4018-4028.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and Ten Dijke, P., 2005. TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* 65 (3): 599-608.
- Ledvina, M., Stoklasová, A. and Cerman, J., 2004. *Biochemie pro studující medicíny*. 1. vyd. Praha: Karolinum. 548 s. ISBN 80-246-0851-0. Kapitola 7: Oxidoredukční pochody. 63-84.
- Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., et al., 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 355 (10): 992-1005.
- Libby, P., 2006. Atherosclerosis: disease biology affecting the coronary vasculature. *Am J Cardiol.* 98 (12A): 3-9.
- Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J. and Bernabeu, C., 2007. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol.* 365 (3): 694-705.
- Lopez-Novoa, J. M. and Bernabeu, C., 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299 (4): 959-974.
- Lullmann-Rauch, R., 2012. *Histologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 576 s. ISBN 978-80-247-3729-4. Kapitola 11: Krevní a lymfatické cévy, srdce. 211-224.
- Lundvig, D. M., Immenschuh, S. and Wagener, F. A., 2012. Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly?. *Front Pharmacol.* 3 (81): 64-71.
- Mahmood, T. and Yang, P-C., 2012. Western blot: Technique, theory and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 4 (9): 429-434.
- Maines, M. D., 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2 (10): 2557-2568.

- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., et al., 2001. Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 89 (10): 930-934.
- Marek, J., Kašák, V. and Skříčková, J., 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí.* 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 808 s. ISBN-13: 978-80-247-2639-7. Kapitola 5: Farmakoterapie plicních nemocí. 121-191.
- Masopust, J., Průša, R., Goetz, P., Pelouch, V., et al., 2003. *Patobiochemie buňky.* 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta. 344 s. ISBN 80-239-1011-6. Kapitola 6: Typy buněk. 87-92.
- Massague, J. and Gomis, R. R., 2006. The logic of TGF β signaling. *FEBS Lett.* 580 (12): 2811-2820.
- Morse, D. and Choi, A. M., 2002. Heme oxygenase-1: the “emerging molecule” has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27 (1): 8-16.
- Mungrue, I. N., Husain, M. and Stewart, D. J., 2002. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev.* 7 (4): 407-422.
- Nachtigal, P., Zemankova Vecerova, L., Rathouska, J. and Strasky, Z., 2012. The role of endogline in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 224 (1): 4-11.
- Nathan, C. F. and Hibbs, J. B., 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 3 (1): 65-70.
- Nemeckova, I., Serwaczak, A., Oujo, B., Jezkova, K., et al., 2015. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One.* 10 (3): e0119665.
- O'brien, K. D., Olin, K. L., Alpers, C. E., Chiu, W., et al., 1998. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation.* 98 (6): 519-527.
- Pae, H. O., Kim, E. CH. and Chung, H. T., 2008. Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites. *J Clin Biochem Nutr.* 42 (3): 197-203.

- Paigen, B., Mitchell, D., Reue, K., Morrow, A., et al., 1987. Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 84 (11): 3763-3767.
- Perucci, L. O., Gomes, K. B., Freitas, L. G., Godoj, L. C., et al., 2014. Soluble endoglin, transforming growth factor-Beta 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia. *PLoS One.* 9 (5): 97632.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., et al., 2013. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci.* 9 (10): 1057-1069.
- Rathouska, J., Vecerova, L., Strasky, Z., Slanarova, M., et al., 2011. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 64 (1): 53-59.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340 (2): 115-126.
- Rubanyi, G. M. and Vanhoutte, P. M., 1986. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 250 (5): 822-827.
- Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M., 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* 86 (2): 583-650.
- Ryter, S. W., Morse, D. and Choi, A. M., 2007. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am. J Respir Cell Mol Biol.* 36 (2): 175-182.
- Ryter, S. W. and Choi, A. M., 2009. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 41 (3): 251-260.
- Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., et al., 2007. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF- β signaling. *J Cell Physiol.* 210 (2): 456-468.
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., et al., 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 359 (6397): 693-699.

- Southan, G. J. and Szabo, C., 1996. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol.* 51 (4): 383-94.
- Sary, H. C., Blankenhorn, D. H., Chandler, A. B., Glasgow, S., et al., 1992. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 12 (1): 120-134.
- Strasky, Z., Vecerova, L., Rathouska, J., Slanarova, M., et al., 2011. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J.* 75 (7): 1747-1755.
- Toborek, M. and Kaiser, S., 1999. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol.* 94 (5): 295-314.
- Toma, I. and McCaffrey, T. A., 2012. Transforming growth factor-beta and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res.* 347 (1): 155-175.
- Trojan, S., Langmeier, M., Hrachovina, V. and Kittnar, O., 2003. *Lékařská fyziologie.* 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 772 s. ISBN 80-247-0512-5. Kapitola 6: Fyziologie oběhu krve a lymfy. 184-186.
- Vachharajani, T. J., Work, J., Issekutz, A. C. and Granger, D. N., 2000. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278 (5): 1613-1617.
- Valbuena-Diez, A. C., Blanco, F. J., Oujó, B., Gonzalez-Nunez, M., et al., 2012. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation.* 126 (22): 2612-2624.
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E. and Feletou, M., 2009. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol.* 196 (2): 193-222.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C. and Hanai, J., et al., 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 12 (6): 642-649.
- Verma, S., Buchanan, M. R. and Anderson, T. J., 2003. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation.* 108 (17): 2054-2059.

- Vítek, L., 2009. *Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 123 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Kapitola 1: Metabolismus bilirubinu. 3-11.
- Vlček, J., Fialová, D., Kulič, F., Macek, K., et al., 2010. *Klinická farmacie I*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 368 s. ISBN 978-80-247-3169-8. Kapitola 5.3: Ateroskleróza. 108-110.
- Vojáček, J., Malý, M. and Fiedler, J., 2004. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 276 s. ISBN-10 80-247-0501-X. Kapitola 2: Úloha endotelu. 21-30.
- Vrablík, M., Janotová, M., Motyková, E., Prusíková, M., et al., 2011. Endoteliální dysfunkce - první stádium aterosklerózy. *Medicína pro praxi*. 8 (3): 119-122. ISSN 1214-8687.
- Wagener, F. A., Eggert, A., Boerman, O. C., Oyen, W. J., et al., 2001. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 98 (6): 1802-1811.
- Wagener, F. A., Volk, H. D., Willis, D., Abraham, N. G., et al., 2003. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*. 55 (3): 551-571.
- Wang, X. L., Liu, S-X. and Wilcken, D. E. L., 1997. Circulating transforming growth factor β 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res*. 34 (2): 404-410.
- Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., et al., 2000. Transforming growth factor- β 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem*. 275 (47): 36653-36658.
- Wever, R. M., Luscher, T. K., Consentino, F. and Rabelink, T. J., 1998. Atherosclerosis and two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 97 (1): 108-112.
- Williams, K. J. and Tabas, I., 1995. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15 (5): 551-561.
- Wong, J. M. and Billiar, T. R., 1994. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol*. 34 (1): 155-170.

Yet, S. F., Tian, R., Layne, M. D., Wang, Z. Y., et al., 2001. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res.* 89 (2): 168-173.

Zampetaki, A., Minamino, T., Mitsialis, S. A. and Kourembanas, S., 2003. Effect of heme oxygenase-1 overexpression in two models of lung inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228 (5): 442-446.