



2. lékařská fakulta
Univerzita Karlova
Praha



**ZMĚNY JEDNOTLIVÝCH ISOFOREM SYNTÁZY OXIDU
DUSNATÉHO U EXPERIMENTÁLNÍ HYPERTENZE A
METABOLICKÉHO SYNDROMU:
GENETICKÉ A MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ
ASPEKTY**

Disertační práce

Oddělení experimentální hypertenze
Fyziologický ústav AV ČR, Praha



Centrum výzkumu chorob srdce a cév



Doktorand: **Mgr. Silvie Hojná**

Hlavní školitel: **RNDr. Jaroslav Kuneš DrSc.**

Školitel specialista: **MUDr. Josef Zicha DrSc.**

2007

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Jaroslavu Kunešovi, DrSc. nejen za odborné vedení v průběhu celého postgraduálního studia na pracovišti Experimentální hypertenze, ale také za nenahraditelnou pomoc při práci s laboratorními zvířaty. Nemohu zapomenout ani na MUDr. Josefa Zichu, DrSc., jemuž vděčím za nápady při plánování a realizaci experimentů a také za podnětné připomínky při sepisování této disertační práce. V neposlední řadě patří můj dík celému osazenstvu laboratoře, především Ivě Nahodilové a Marii Schützové za pomoc při měření enzymatických aktivit a proteinových expresí.

Obsah

Seznam zkratk	6
1. Úvod	8
1.1. Hypertenze - základní charakteristika	8
1.2. Esenciální hypertenze a mechanismy jejího vzniku	8
1.2.1. Poruchy neurohumorální regulace	9
1.2.1.1. Sympatický nervový systém	9
1.2.1.2. Centrální a periferní renin-angiotenzinový systém	10
1.2.1.3. Další neurohumorální působky	11
1.2.2. Renální abnormality	12
1.2.3. Změny v iontovém transportu	13
1.2.4. Rizikové faktory zevního prostředí	13
1.3. Metabolický syndrom	14
1.3.1. Symptomy metabolického syndromu	14
1.4. Genetika esenciální hypertenze a metabolického syndromu	16
1.5. Oxid dusnatý – důležitá signální molekula	18
1.5.1. Syntáza oxidu dusnatého – klíčový isoenzym	18
1.5.1.1. Nomenklatura isoform NO syntáz	18
1.5.1.2. Struktura NOS	19
1.5.1.3. Význam jednotlivých kofaktorů pro činnost NOS	20
1.5.1.4. Reakce katalyzované NOS	20
1.5.2. Charakteristické znaky jednotlivých isoform NOS	21
1.5.2.1. Endoteliální NOS	21
1.5.2.2. Neuronální NOS	23
1.5.2.3. Inducibilní NOS	24
1.5.3. Centrální nervový systém a NO	25
1.5.3.1. Regulace krevního tlaku a sympatické aktivity v CNS	25

1.5.3.2. Mozkový renin-angiotenzinový systém ve vztahu k NO	26
1.5.3.3. Centrální NO	27
1.5.3.4. Účinky NO na periférii	28
1.6. Experimentální hypertenze	29
1.6.1. Zvířecí modely experimentální hypertenze	30
1.6.1.1. Spontánně hypertenzní potkan	31
1.6.1.2. Dahlův potkan	31
1.6.1.3. Hereditárně hypertriglyceridemický potkan	32
2. Cíl disertační práce	33
3. Metodika	34
3.1. Experimentální zvířata	34
3.2. Genetická analýza	35
3.2.1. Izolace DNA	35
3.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	36
3.2.3. Restriční štěpení úseku DNA	39
3.2.4. Analýza produktů PCR	40
3.3. Biochemická analýza	41
3.3.1. Stanovení koncentrace proteinů	42
3.3.2. Měření aktivity enzymu NOS	42
3.3.3. Stanovení proteinové exprese NOS	44
3.4. Statistická analýza	44
4. Výsledky	45
4.1. Experiment 1	45
4.1.1. Hledání polymorfismu mezi Dahlovými sůl-senzitivními a sůl-rezistentními jedinci v genu pro <i>iNOS</i>	46
4.1.2. Aktivita NOS a exprese isoform NOS u solné hypertenze	49

4.2. Experiment 2	52
4.2.1. NO syntáza při rozvoji spontánní hypertenze v mládí	52
4.2.2. NO syntáza u jedinců s rozvinutou spontánní HT	57
4.3. Experiment 3	60
4.3.1. NO u genetického modelu metabolického syndromu	60
5. Diskuse	64
5.1. Genetická analýza <i>iNos</i> genu Dahlových potkanů z pražské kolonie	64
5.2. Změny v systému NO u jednotlivých hypertenzních modelů	65
5.2.1. Porovnání změn odehrávajících se v systému NO u spontánní a solné hypertenze rozvinuté v mládí	68
5.2.2. Porovnání úlohy centrálního NO v rozvoji, respektive udržování hypertenze u mladých a dospělých SHR potkanů	72
5.2.3. Změny NO syntázy u modelu metabolického syndromu	75
6. Závěr	76
7. Literatura	78
8. Seznam vlastních publikací	99

Seznam zkratek

ACE inhibitor	inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu
Ang II	angiotensin II
AT ₁ receptor	receptor pro angiotenzin II typ 1
AV3V	anteroventrální oblast 3. mozkové komory
BH ₄	tetrahydrobiopterin
cGMP	cyklický guanozin monofosfát
CNS	centrální nervový systém
DR	Dahlův sůl-rezistentní potkan
DS	Dahlův sůl-senzitivní potkan
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
HTG	hereditárně hypertriglyceridemický potkan
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
NA	noradrenalin
NADPH	redukovaný nikotin amid adenin dinukleotid fosfát
NMDA receptor	N-metyl-D-aspartátový receptor
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NO ⁻	nitroxylový aniont
ONOO ⁻	peroxynitrit
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NTS	nucleus tractus solitarii

O ₂ ⁻	superoxid
OVLT	organum vasculosum laminae terminalis
PVN	paraventrikulární jádro
QTL	lokus pro sledovanou kvantitativní vlastnost
RAS	renin-angiotenzinový systém
RVLM	rostrální ventrolaterální medula
SHR	spontánně hypertenzní potkan
SFO	subfornikální orgán
SMTC	S-methyl-L-thiocitrulin
SNS	sympatický nervový systém
SSCP	single-stranded conformation polymorphism
TG	triglyceridy
TK	krevní tlak
WIS	potkan kmene Wistar
WKY	potkan kmene Wistar-Kyoto

1. Úvod

1.1. Hypertenze - základní charakteristika

Kardiovaskulární onemocnění (infarkt myokardu, ischemická choroba srdeční, mozková mrtvice, hypertenze a další) patří mezi nejzávažnější problémy současného světového zdravotnictví. Jejich následky jsou zodpovědné téměř za polovinu veškerých úmrtí (Mackay a Mensah, WHO, 2005). Výjimkou není ani Česká republika, která je Světovou zdravotnickou organizací řazena na jedno z předních míst v úmrtnosti na choroby srdce a cév (Guidelines Committee, 1999).

Jak v průmyslově vyspělých zemích, tak i v rozvojovém světě se arteriální hypertenze (HT) společně s některými metabolickými poruchami souhrnně označovanými jako metabolický syndrom stávají značně rozšířenými rizikovými faktory vzniku kardiovaskulárních chorob (Khor, 2001, Vorster, 2002). Může za to významně se prodlužující délka života, během níž se ve zvýšené míře mohou negativně projevit další faktory jako jsou obezita, fyzická inaktivita, nezdravá strava (Singh a kol., 2000, Yusuf a kol., 2001) a zhoršující se životní prostředí.

Podle Evropské společnosti pro hypertenzi a Evropské kardiologické společnosti je hypertenze definovaná jako opakované zjištění klidového krevního tlaku (TK) nad hodnoty 139/89 mm Hg (De Backer a kol., 2003). Tato arbitrární hranice systolického a diastolického tlaku byla určena na základě zjištění, že od těchto hodnot prudce narůstá počet orgánových komplikací přisuzovaných arteriální hypertenzi (Horký, 2001).

Přibližně v 90 % případů hypertenze je její etiologie nejasná a pak mluvíme o primární (esenciální) hypertenzi. Výskyt sekundární hypertenze je poměrně vzácný (< 10 %). Vzniká jako důsledek vrozeného nebo získaného jasně definovaného onemocnění, které je ve většině případů možné kauzálně léčit.

1.2. Esenciální hypertenze a mechanismy jejího vzniku

Lidská esenciální hypertenze je multifaktoriální onemocnění, které vzniká vzájemnou interakcí genetických faktorů a faktorů zevního prostředí ovlivňujících regulační mechanismy řídící krevní tlak. Je známá řada patofyziologických mechanismů

vedoucích k chronickému zvýšení krevního tlaku, ale odpověď, který z faktorů hraje při vzniku hypertenze klíčovou roli, je velmi obtížné.

1.2.1. Poruchy neurohumorální regulace

1.2.1.1. Sympatický nervový systém

Přibývají práce dokazující, že esenciální hypertenze by mohla vznikat na neurogenní bázi a být udržována zvýšením aktivity sympatického nervového systému (SNS) (Anderson a kol., 1989, Grassi a kol., 1998). Spektrum poruch vedoucích ke zvýšené aktivitě SNS je u hypertenzních jedinců velmi široké.

Významnou úlohou sympatického nervového systému je regulace fyziologické homeostázy za bazálních podmínek a také schopnost reagovat na akutní i chronické stresové faktory. Značné množství důkazů nepřímo ukazuje na zapojení předního mozku, mozkového kmene a páteřní míchy do řízení aktivity SNS (Osborn a kol., 1987, Dampney, 1994, Sun, 1995). Z předního mozku je hypotalamické paraventriculární jádro (PVN) považováno za důležité místo v centrálním nervovém systému podílející se na autonomní a neuroendokrinní regulaci (Swanson a Sawchenko, 1983). Jak anatomická, tak i funkční data podporují domněnku o úloze PVN při regulaci aktivity SNS. Neurony vytvářející PVN vysílají projekční dráhy do zadní hypofýzy a dále zajišťují propojení s dalšími oblastmi centrálního nervového systému, např. s rostrální ventrolaterální medulou v mozkovém kmeni (Swanson a Sawchenko, 1983, Badoer, 2001). PVN obsahuje komplexní profil excitačních a inhibičních neurotransmiterů a neuromediátorů. S ohledem na aktivitu SNS se mezi nejvýznamnější substance řadí excitační aminokyseliny (glutamát, N-metyl D-aspartátová kyselina) (Bains and Ferguson, 1997 a, b) a angiotenzin II (Ang II) (Li a Ferguson, 1996, Pfister a kol., 1997), jež svým působením zvyšují srdeční frekvenci, krevní tlak, plasmatickou koncentraci noradrenalinu i aktivitu SNS na periférii, zatímco oxid dusnatý (NO) (Bredt a kol., 1990, Vincent a Kimura, 1992, Zhang a kol., 1997) a kyselina γ -aminomáselná (GABA) (Schmidt a DiMicco, 1984, Martin a kol., 1991, Goren a kol., 1997) slouží v PVN jako inhibiční mediátory. Je pravděpodobné, že pokud dojde v PVN k aktivaci receptorů pro excitační aminokyseliny, k navázání antagonisty na GABA receptory nebo k inhibici enzymu syntázy oxidu dusnatého či k mikroinjekčnímu podání Ang II do oblasti PVN, vzroste aktivita eferentních sympatických nervů (Kenney a kol., 2003), což je situace vyskytující se ve většině případů esenciální hypertenze.

Na periférii (srdce a ledviny) dochází v důsledku zvýšené sympatické aktivity ke snížení prahu citlivosti na neurohumorální faktory (např. Ang II) a za jejich přítomnosti se ochotně uvolňuje noradrenalin (NA) ze synaptických zakončení (Perondi a kol., 1992). Bylo zjištěno, že koncentrace NA v ledvinách je u novorozenech spontánně hypertenzních potkanů (SHR) dvakrát vyšší (Gattone a kol., 1990) a u dospělých jedinců téhož kmene až trojnásobně zvýšená (Caplea a kol., 2002) oproti stejně starým normotenzním jedincům kmene Wistar-Kyoto (WKY). Současně se ale snižuje schopnost zpětného vychytávání NA do nervových zakončení (Rumantir a kol., 2000), pravděpodobně z důvodu dysfunkce NA transportéru (Esler a kol., 1981). Hladká svalovina cév pak reaguje na noradrenalinovou stimulaci zvýšenou reaktivitou. K rozvoji arteriální hypertenze u SHR potkanů již v raném postnatálním období dále přispívá hustší a značně rychle se vyvíjející sympatická inervace ledvin (Gattone a kol., 1990, Head, 1989).

1.2.1.2. Centrální a periferní renin-angiotenzinový systém

Za sníženou centrální inhibici sympatiku je pravděpodobně zodpovědná převaha tkáňového a plazmatického Ang II nad centrálně produkovaným oxidem dusnatým. Mozek je jedním z mála orgánů, ve kterém se tvoří veškeré prekurzory a enzymy nezbytné pro syntézu, konverzi a degradaci Ang II a současně zde probíhá exprese genu pro renin, a to jak na úrovni mRNA, tak i proteinů (Fisher-Ferraro a kol., 1971, Ganten a kol., 1978). Už v roce 1984 Brody a kolegové zjistili, že tkáň obklopující anteroventrální oblast třetí mozkové komory (AV3V) je složitým způsobem schopna modulovat přicházející informace z volumoreceptorů a baroreceptorů a tím přispívat ke snižování sympatického tonu. V této přední části hypotalamu se nachází depresorická oblast, která zesiluje účinnost baroreflexu stimulací specifických parasympatických jader v mozkovém kmeni. Na přítomných neuronech byla detekována vysoká denzita receptorů pro Ang II typu 1 (AT₁ receptor), na něž se může vázat tkáňový i plazmatický Ang II. Navázání Ang II na tyto AT₁ receptory umožňuje funkční propojení této části hypotalamu s přílehlou oblastí souhrnně označovanou jako paraventriculární orgány. Ty tvoří čtyři malé oblasti - neurohypofýza, area postrema, organum vasculosum laminae terminalis a subfornikální orgán, které se vyznačují zvýšenou prostupností hematoencefalické bariéry a značným výskytem vazebných míst pro Ang II (Ganong, 2000, Collister a Hendel, 2003). Jsou bohatě vaskularizovány a jejich vysoká permeabilita umožňuje vazoaktivním působkům z krve prostupovat přímo do mozku a vazbou na specifické receptory modulovat

sympatický tonus. Všechny tyto struktury se významnou měrou podílejí na regulaci objemu tělesných tekutin a elektrolytové rovnováhy v organismu.

Kardiovaskulární systém (srdce a cévy) patří do skupiny tzv. intermediárního renin-angiotenzinového systému (RAS). Produkce Ang II je tedy plně závislá na plazmatickém reninu tvořeném v juxtaglomerulárním aparátu ledvin. RAS zasahuje do regulace systémového krevního tlaku několika mechanismy. Jeho hlavní aktivní komponenta, silný vazokonstriktor Ang II, má přímý vliv na růst hladkosvalových buněk ústící v hypertrofii buněk myokardu a cévní stěny, čímž negativně ovlivňuje jejich viskoelasticitu (Ford a kol., 1999, Zannad a Radauceanu, 2005). Cestou presynaptických AT_1 receptorů zvyšuje uvolňování noradrenalinu ze sympatických nervových zakončení (Brasch a kol., 1993, Hedner, 2002), adrenalinu z chromafinních buněk dřeně nadledvin (Peach, 1977, Zimmerman, 1978) a v kultuře z buněk hladkého svalu a endoteliálních buněk indukuje expresi genu pro nejsilnější vazokonstriční působek endotelin-1 (Rossi a kol., 1999, Oriji, 1999). Ang II přímo ale i nepřímo (prostřednictvím aldosteronu) působí na procesy reabsorpce sodíku a vody a tím reguluje objem extracelulární tekutiny a elektrolytovou rovnováhu.

1.2.1.3. Další neurohumorální působky

U hypertoniků dochází velmi často k poruše rovnováhy mezi vazokonstričními a vazodilatačními faktory. Za hlavní vazokonstriktory jsou považovány mediátory sympatického nervového systému adrenalin a noradrenalin spolu s neaktivnějším metabolitem kaskády RAS angiotenzinem II, naproti tomu oxid dusnatý představuje nejdůležitějšího vazodilatátora. U hypertenze dochází k poruše funkce cévního endotelu, která vede k nerovnováze mezi vazoaktivními působky. Výsledkem je převaha vazokonstričních a protrombotických procesů, které vedou ke zvýšení TK. Postižení endotelu má tedy za následek snížení dostupnosti řady působků produkovaných endoteliálními buňkami (zejména NO), což může zhoršovat na endotelu závislou vazodilataci (Panza a kol., 1990) a iniciovat progresi aterosklerózy. Nízká dostupnost NO velice úzce souvisí s výskytem endoteliální dysfunkce. V některých případech bývá podmíněná geneticky, což potvrzují experimenty provedené na dospělých SHR potkanech (Zalba a kol., 2001). Její hlavní příčinou je snížená aktivita enzymu katalyzujícího vznik NO (NOS) a nebo urychlená degradace NO reaktivními formami kyslíku při oxidativním stresu (Gryglewski a kol., 1986). Reakce superoxidu ($O_2^{\cdot-}$) s NO vede k produkci silného oxidačního činidla, peroxynitritu ($ONOO^{\cdot-}$) (Beckman a kol., 1990), který se účastní

tkáňového poškození indukci oxidace proteinů, DNA a lipidů v cévní stěně (Ballinger a kol., 2000). Nedávné studie dále ukázaly, že vysoká koncentrace kyslíkových radikálů může stimulovat hypertrofii a hyperplazii buněk hladkého svalstva (Griendling a kol., 2000). V organismu existuje ještě řada dalších vazoaktivních systémů (vazodilatační: prostaglandin E₂ a I₂, dopamin, natriuretické peptidy, adrenomedulin atd., vazokonstrikční: endothelin-1, aldosteron, vazopresin, prostaglandin F₂, tromboxan A₂ atd.), jejichž úloha při vzniku a udržování různých forem hypertenze je stále předmětem výzkumu.

1.2.2. Renální abnormality

Renální objemový a tlakový kontrolní systém je považován za nejdůležitější mechanismus dlouhodobě regulující hladinu krevního tlaku kvůli své jedinečné schopnosti vyrovnávat tlakové změny zvýšením a nebo naopak snížením vodní a elektrolytové exkrece (Guyton, 1990). Ledvina v organismu zajišťuje vodní a elektrolytovou rovnováhu prostřednictvím iontových transportních mechanismů (např. sodíko-protonová pumpa, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ kotransport, Na⁺, K⁺-pumpa), a proto se případná renální dysfunkce významnou měrou podílí na patogenezi HT (Hall, 2003). K udržování všech forem HT přispívá i defekt jednoho ze systémů dlouhodobé regulace krevního tlaku, tzv. tlakové natriurézy (Hall, 1997). Tento systém je aktivován vzestupem perfuzního tlaku v ledvině a zajišťuje jej několik specifických intrarenálních mechanismů, jež mají za úkol snížit tubulární reabsorpci sodíku a zvýšit jeho exkreci společně s vodou. Součástí těchto regulačních mechanismů jsou ledvinou produkované vazoaktivní látky jako např. NO, prostaglandin E₂, kininy a Ang II, které mohou přímo ovlivňovat tubulární transportéry pro sodné ionty (Granger a kol., 2002). Při zhoršené schopnosti ledvin vylučovat přijatý sodík a vodu dojde ke zvětšení objemu tělesných tekutin, což způsobí vzestup srdečního výdeje s následným zvýšením periferní cévní rezistence. Narůstající aktivita SNS u hypertoniků vede ke konstrikci ledvinných tepen a k poklesu průtoku ve vas afferens, čímž se aktivuje kaskáda renin-angiotenzin-aldosteron, která spolu se sympatikem přispívá k dalšímu zvětšení objemu tělesných tekutin a k nárůstu TK.

1.2.3. Změny v iontovém transportu

Už na počátku rozvoje hypertenze se setkáme se zvýšeným periferním cévním odporem, jenž souvisí se zvýšenou kontrakcí hladké svaloviny cévní stěny. Následuje remodelace cév vedoucí k zúžení průsvitu odporových arteriol (periferní odpor stoupá) a k zesílení tloušťky svalové médie, která odpovídá silněji na vazokonstrikční podněty. Tato reaktivita je ovlivňována také změnou počtu a vlastností receptorů pro jednotlivé vazoaktivní působky, poruchami buněčného metabolismu vápníku (Kawanabe a Nauli, 2005) a dalších iontů. Změny v expresi a prostupnosti iontových (K^+ , Ca^{2+} a Cl^-) kanálů zapříčiňují depolarizaci buněk hladkého svalstva, což bylo potvrzeno i na řadě experimentálních modelů hypertenze (Harper a kol., 1997, Martens a Gelband, 1996, 1998, Onaka a kol., 1998, Silva a kol., 1994). Zvýšený průnik Ca^{2+} iontů do buňky může být způsoben změnou některého z vápníkových kanálů. Cytosolická koncentrace vápníku může být dále zvýšena také nižší aktivitou Ca^{2+} pump na plazmatické membráně, na membráně sarkoplazmatického retikula nebo zvýšenou mobilizací Ca^{2+} z nitrobuněčných zásob. Zvýšená cytosolická koncentrace volného vápníku aktivuje kontrakci hladké svaloviny cév. Metabolismus vápníku dále ovlivňují změny v lipidovém složení buněčných membrán modulující jejich fluiditu (Zicha a kol., 1999).

1.2.4. Rizikové faktory zevního prostředí

Tyto faktory velice úzce souvisí s životním stylem daného jedince. Patří k nim zejména stravovací návyky týkající se solení, alkoholu a značného příjmu tuků, zvláště nasycených mastných kyselin, podporujících spolu s nízkou tělesnou aktivitou vznik obezity. Ke vzniku hypertenze mohou dále přispívat chronický stres, kouření a nedostatek některých prvků (draslík, vápník).

1.3. Metabolický syndrom

Tento syndrom označuje soubor poruch a rizikových faktorů, které jsou v populacích vyspělých států stále častější, a současně propojuje výrazný vzestup rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění spolu s inzulínovou rezistencí (Doelle, 2004). V roce 1988 shrnul Gerald Reaven různá experimentální a epidemiologická data, na jejichž základě popsal základní charakteristiku tohoto syndromu. Pro společný výskyt hyperinzulinemie, poruchy glukózové tolerance nebo diabetu mellitu, sníženého transportu glukózy, hypertriglyceridemie, snížené hladiny plazmatického cholesterolu obsaženého v lipoproteinech o vysoké hustotě (HDL) a esenciální arteriální hypertenze se dříve používalo označení Reavenův syndrom či syndrom X, které se shoduje s dnes častěji užívaným termínem metabolický syndrom (Reaven, 1997). Původní komplex symptomů byl v následujících letech rozšířen o viscerální obezitu, hyperurikémii, mikroalbuminurii a další abnormality (Timar a kol., 2000), které ve svém důsledku vedou ke kumulaci rizikových faktorů předčasného rozvoje aterosklerózy a jejich komplikací včetně ischemické choroby srdeční (Pelikánová, 2003, Ziegler, 2005, Ahluwalia, 2005). V roce 2001 navrhl Národní cholesterolový edukační program Adult Treatment Panel III (ATP III) sjednotit kritéria pro diagnostikování metabolického syndromu (tab. 1) (NCEP, 2001, JAMA).

Tab. 1 ATP III kritéria pro diagnózu metabolického syndromu.

Metabolický syndrom je přítomný, pokud se společně vyskytují alespoň tři z těchto kritérií.

- Abdominální obezita – obvod pasu – muži: ≥ 102 cm
ženy: ≥ 89 cm
nebo BMI ≥ 30 kg/m²
- Hladina glukózy nalačno $> 6,1 < 7,0$ mmol/l
- Krevní tlak $> 130/80$ mm Hg
- Hladina TG $\geq 1,7$ mmol/l
- Hladina HDL cholesterolu – muži: $< 1,04$ mmol/l
ženy: $< 1,3$ mmol/l

1.3.1. Symptomy metabolického syndromu

Mezi metabolickým syndromem, vysokým krevním tlakem a dalšími kardiovaskulárními chorobami je velmi úzký vzájemný vztah. Přesný mechanismus vzniku arteriální hypertenze však dosud neznáme. Na základě pozorování vazby mezi

jednotlivými metabolickými symptomy definovanými ATP III a metabolickým syndromem byla za základní odchylku označena inzulinová rezistence (Reaven, 2005). Řada prospektivních studií (Pyorala, 1979, Fontbonne, 1991) ukazuje hyperinzulinemii jako prediktora koronárního poškození. Předpokládá se, že na rozvoji hypertenze se za přítomnosti inzulinové rezistence podílí aktivace SNS spolu se stimulací RAS, retence sodíku a volumová expanze, pozměněný transmembránový kationtový přenos, hyperreaktivita cév a proliferace buněk hladkého svalu (Hunter a Garvey, 1998, Sowers a kol., 1994, Reaven a kol., 1996, Engeli a kol., 2000).

Inzulinová rezistence je popisována jako zhoršená biologická odpověď na endogenní nebo exogenní inzulin (Hunter a Garvey, 1998, Nolan a kol., 1997). Jde tedy o patologický stav, při němž selhávají cílové buňky v odpovědi na běžné koncentrace cirkulujícího inzulinu. V časném stádiu této poruchy působí zvýšená hladina inzulinu v plazmě kompenzačně, avšak současně může dojít k přehnanému účinku na tkáně, u kterých citlivost na inzulin zůstala normální a nebo se jen mírně snížila. Ve vysoké koncentraci reaguje inzulin jednak s vlastním inzulinovým receptorem a dále také s receptorem pro insulin-like growth factor I (IGF-I) (Sowers, 1997, Ren a kol., 1999). Touto cestou dochází ke stimulaci tvorby inositol-3-fosfát kinázového komplexu a následné aktivaci dalších proteinů uvnitř buněk citlivých na inzulin. Porušením této signální cesty pro inzulin a IGF-I dochází ke snížené syntéze oxidu dusnatého cévním endotelem (Zeng a Quon, 1996), k poruše transportních mechanismů pro Na^+ , K^+ a Ca^{2+} ionty (Li a kol., 1999, Cittadini a kol., 1998) a současně i glukózových transportérů (Hunter a Garvey, 1998, Sowers, 1997).

Diabetes mellitus (DM) je onemocnění, které je způsobené nedostatečnou tvorbou inzulinu a nebo jeho malou účinností. Postihuje přibližně 4 % obyvatelstva, ale předpokládá se, že po provedení screeningu celou populací by prevalence dále vzrostla. DM se dělí na dva hlavní typy, z nichž pouze diabetes 2. typu se řadí mezi symptomy metabolického syndromu. Diabetes 1. typu (insulin-dependent diabetes mellitus – IDDM) je nejčastěji způsoben nedostatkem inzulinu vyvolaným většinou už v mládí autoimunitní destrukcí β -buněk Langerhansových ostrůvků (Solimena, 1998). Má značný sklon k těžkým akutním komplikacím a je nezbytná terapie inzulinem. Diabetes 2. typu nezávislý na inzulinu (non-insulin-dependent diabetes mellitus - NIDDM) postihuje především starší osoby a jeho základem je nedostatečná sekrece inzulinu kombinovaná s inzulinorezistencí (Stumvoll and kol., 2002).

Obezita hraje v západní civilizaci významnou úlohu v patofyziologii metabolického syndromu a předčasného vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Philips a kol., 1993, Sowers, 1999). Lze ji definovat jako nadměrné ukládání tuku v organismu a pro její klasifikaci je používán index tělesné hmotnosti, tzv. body mass index (BMI), který vyjadřuje podíl hmotnosti v kilogramech a druhé mocniny výšky v metrech. Se vzrůstající hodnotou BMI nad 25 výrazně stoupá riziko vzniku inzulinové rezistence a dalších přidružených chorob (Sharma a Chetty, 2005). Mnohem závažnější následky nežli hromadění tuku v podkoží způsobuje akumulace viscerálního tuku v peritoneální dutině. Oproti periferním tukovým buňkám je viscerální tuk značně rezistentní k metabolickým účinkům inzulinu a naopak mnohem citlivější k lipolýze (Tchernof a kol., 1996, Banerji a kol., 1997). Hypertriglyceridemie je nezávislým kardiovaskulárním rizikovým faktorem (Hulley a kol., 1980). U metabolického syndromu je tato porucha často doprovázena sníženou hladinou HDL cholesterolu, přítomností malých densních lipoproteinových částic (LDL cholesterol), zvýšenou koncentrací apolipoproteinu B a postprandiálním nashromážděním zbytkových lipoproteinových částic bohatých na triglyceridy (Brunzell a Ayyobi, 2003, Jeppesen a kol., 1995, Tchernof a kol., 1996).

1.4. Genetika esenciální hypertenze a metabolického syndromu

Jak ukazují populační studie, krevní tlak je velice variabilní kvantitativní znak (Parati a kol., 1998). Existuje zde silná pozitivní korelace mezi výškou krevního tlaku, renálním poškozením a rizikovými faktory vzniku kardiovaskulárních chorob, mezi které se řadí i symptomy metabolického syndromu (Carretero a Oparil, 2000). Hypertenze a další kardiovaskulární choroby jsou výsledkem vzájemné interakce genetických faktorů a faktorů vnějšího prostředí, jenž se navzájem ovlivňují a mohou postupně přerůst v patologický stav (Kuneš a Zicha, 2006). V našem genomu je řada genů více či méně ovlivnitelných rizikovými faktory vnějšího prostředí a záleží pouze na jejich kombinaci, zda předurčí jedince k tomu být hypertonikem. O tom, že tato vzájemná interakce je skutečně velmi důležitá a že životní styl sehrává při vzniku hypertenze důležitou úlohu, svědčí populační studie u některých „méně“ rozvinutých národů (indiáni v jihoamerických pralesích, obyvatelé tichomořských ostrovů apod.). Jejich krevní tlak je obvykle nižší než u rozvinutých civilizací a ve většině případů u nich nedochází ani k vzestupu tlaku s přibývajícím věkem (Stamler a kol. 1991). V okamžiku, kdy jsou tyto jedinci přemístěni

do prostředí typického pro naše „vyspělé“ civilizace a vystavení všem moderním civilizačním faktorům, stává se většina z nich hypertonií. To nám přináší důkaz o tom, že ona genetická predispozice skutečně existuje a že pod vlivem nepříznivých faktorů vnějšího prostředí může vést k patologickému stavu. V současné době je zřejmé, že tyto zákonitosti neplatí pouze pro hypertenzi, ale také pro celou řadu tzv. civilizačních chorob, jako je například ateroskleróza, diabetes či symptomy metabolického syndromu.

Snahy objasnit genetickou podstatu hypertenze ukázaly, že jde o problém velmi složitý. Esenciální hypertenze je ve skutečnosti onemocnění z hlediska genetického polygenně determinované a neřídí se jednoduchými mendelovskými zákony dědičnosti (Carretero a Oparil, 2000). Na základě identifikace defektních genů u člověka a pomocí genetických manipulací u myši a potkanů bylo do skupiny kandidátních genů rozhodujících o regulaci krevního tlaku doposud zařazeno více než 50 genů. V experimentálním měřítku je nejčastějším přístupem využití segregujících populací F₂ hybridů, jejichž pomocí se hledají úseky jednotlivých chromozomů, které mohou obsahovat geny odpovědné za fenotypy podílející se na regulaci krevního tlaku. Tato metoda přispívá k nalezení jednotlivých kandidátních genů důležitých z hlediska patogeneze hypertenze a umožňuje tak v současné době značný rozvoj genové terapie v oblasti kardiovaskulárních nemocí (Philips a kol. 1997). Zvýšená exprese lidských genů pro atriální natriuretický faktor (Lin a kol. 1995), kalikrein (Chao a spol. 1997) nebo endoteliální NOS (Lin a kol. 1997) u mladých SHR potkanů efektivně snižuje rozvoj hypertenze, zatímco efekt u dospělých jedinců je podstatně menší (Lin a kol. 1995). Velmi perspektivní se zdá být využití „antisense“ technologie k blokování přepisu genetické informace u kandidátních genů. Jednorázové podání příslušného produktu novorozeným mláďatům SHR může mít za následek téměř normální vývoj krevního tlaku, jak ukázaly studie Raizady a spol. (Iyer a kol. 1996), kteří použili tuto metodu k dlouhodobému vyřazení funkce angiotenzinových AT₁ receptorů u SHR. Pokud byla tvorba mRNA pro AT₁ receptor blokována pomocí antisense od pátého dne života, výsledkem byl zcela normální krevní tlak u dospělých SHR jedinců. Pozdější studie naznačily, že tímto způsobem je možné zajistit ochranu před rozvojem hypertenze, která je přenositelná i na další generace. Tento přístup by mohl v budoucnu znamenat průlom v prevenci lidských kardiovaskulárních chorob včetně hypertenze za předpokladu, že se podaří získat podrobnější informace o vývojových aspektech lidské esenciální hypertenze, a tím přesněji definovat jednotlivé kritické vývojové periody, v nichž by mělo dojít k příslušnému zásahu v podobě cílené genové terapie.

1.5. Oxid dusnatý – důležitá signální molekula

Tvorba oxidu dusnatého z aminokyseliny L-argininu za katalýzy enzymem syntázou oxidu dusnatého je velmi důležitou autokrinní i parakrinní signální cestou zasahující do regulace řady buněčných funkcí a uplatňující se při mezibuněčné komunikaci (Culotta a Koshland, 1992, Moncada a kol., 1991). NO, známý i jako endoteliální relaxační faktor, je endogenně produkován různým typem buněk (Moncada a kol., 1991). Jak dokazuje značné množství prací, NO hraje důležitou úlohu v udržování kardiovaskulární homeostázy a s ní související hladiny krevního tlaku (Bredt and Snyder, 1994, Harrison, 1997, Sessa, 1994). Navíc brání aktivaci a adhezi krevních destiček a neutrofilů na cévní endotel a tím chrání cévu před vznikem aterosklerotických lezí. Z hlediska regulace krevního tlaku je důležité, že NO navozuje relaxaci hladké cévní svaloviny cestou aktivace guanylát cyklázy. Následné zvýšení cyklického guanozin monofosfátu (cGMP) vede k poklesu intracelulární koncentrace Ca^{2+} a tím k vazodilataci (Palmer a kol., 1988, Yamazaki a kol., 1991). Na základě těchto znalostí se můžeme domnívat, že porucha syntézy NO souvisí s patogenezi hypertenze.

1.5.1. Syntáza oxidu dusnatého – klíčový isoenzym

1.5.1.1. Rozdělení isoform NO syntáz

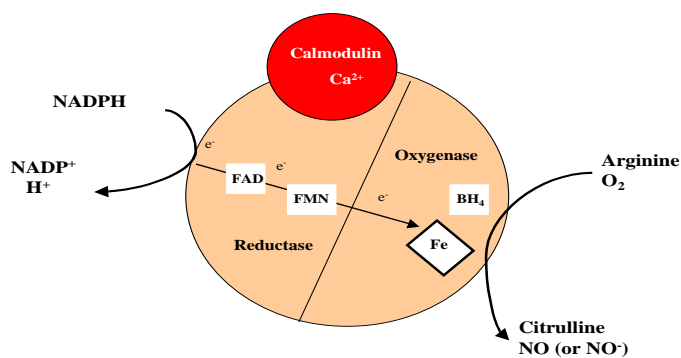
Do dnešní doby byly identifikovány nejméně tři zcela odlišné isoformy enzymu NO syntázy. Jde o produkty odlišných genů lišící se buněčnou lokalizací, regulací, katalytickými vlastnostmi i citlivostí k nescifickým inhibitorům a také strukturou a funkcí. Podle nejběžnější nomenklatury se rozlišuje **neuronální NOS** (nNOS také známá jako Typ 1, NOS-1) mající velikost 160 kDa, poprvé objevená a přednostně se vyskytující v nervové tkáni, dále **inducibilní NOS** (iNOS, neboli Typ 2, NOS-2) o velikosti 130 kDa, jejíž tvorba je za určitých podmínek indukovatelná v řadě buněk a tkání a nakonec **endoteliální NOS** (eNOS, neboli Typ 3, NOS-3), isoforma poprvé identifikovaná v endoteliálních buňkách mající stejnou velikost jako protein iNOS. Jak neuronální tak endoteliální NOS se exprimují konstitutivně a jejich aktivita ve většině případů závisí na přítomnosti vápníku, zatímco exprese inducibilní NOS vzrůstá po indukci cytokiny a nebo jinými prozánětlivými mediátory a její aktivita není ovlivněna intracelulární koncentrací vápníku. Jak se ale nyní ukazuje, původní dělení NO syntáz na tři isoformy není až tak úplně přesné. Současná literatura potvrzuje identifikaci dalších variant tohoto enzymu

odvozených od nNOS isoformy (nNOS β , nNOS γ , nNOS μ a nNOS-2), jejichž vznik je podmíněn proběhlým alternativním sestřihem mRNA příslušného genu (Eliasson a kol., 1997, Silvagno a kol., 1996, Ogura a kol., 1993). Navíc se čím dál častěji potvrzuje, že tyto tři isoformy nemůžeme striktně dělit na vápníku závislé a nezávislé, jelikož i eNOS může být aktivována na vápníku nezávislým způsobem (Presta a kol., 1997).

1.5.1.2. Struktura NOS

Enzym NO syntáza se ve své aktivní formě vyskytuje jako dimerní molekula složená ze dvou identických monomerů, které mohou být funkčně a také strukturálně rozdělené na dvě hlavní domény (obr. 1). C-terminální redukční doména obsahuje vazebná místa pro kofaktory nikotin amid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD) a flavin mononukleotid (FMN), jež jsou strukturálně blízké cytochrom P-450 reduktáze, a přes kalmodulin je propojena s N-terminální oxidační doménou vážící hem, tetrahydrobiopterin (BH₄) a také substrát L-arginin. Redukční a oxidační doména jsou katalyticky aktivní jednotky, které svým propojením zajišťují podmínky potřebné pro syntézu NO. Elektrony uvolněné oxidací NADPH prochází redukční doménou přes flavinové kofaktory jedné podjednotky napříč do oxidační domény druhé podjednotky, kde reagují s molekulou hemu. Experimenty s mutanty dokazují, že elektrony jsou transportovány z jedné dílčí jednotky dimeru do druhé mnohem ochotněji nežli v rámci jedné podjednotky (Cho a kol., 1995, Siddhanta a kol., 1998). Toto se zdá být důvodem, proč enzym NO syntáza je funkční pouze ve své dimerní formě.

Obr. 1 Schéma reakcí katalyzovaných NO syntázou za přítomnosti potřebných kofaktorů. (Alderton a kol., *Biochem. J.* 2001)



1.5.1.3. Význam jednotlivých kofaktorů pro činnost NOS

Flavinové kofaktory na základě svých redukčních potenciálů umožňují dvouelektronovému donoru (NADPH) poskytnout elektrony jednoelektronovému akceptoru (hem doména). Tímto lze funkce redukční domény přirovnat k cytochrom P-450 reduktáze, která předává elektrony enzymu cytochrom P-450. Elektronový tok mezi FAD a FMN je urychlován vazbou vápníku na kalmmodulin. Hem je absolutně nezbytným kofaktorem pro formování aktivního dimeru všech tří isoform NOS. Bez jeho přítomnosti nedochází k dimerizaci a takovéto monomery nejsou schopné vázat BH_4 , L-arginin jako substrát a tedy ani produkovat NO. Pro formování dimeru iNOS je přítomnost tetrahydrobiopterinu esenciální, zatímco konstitutivní formy NOS vytváří dimery i při jeho absenci. Bez ohledu na isoformu je ale BH_4 zodpovědný za stabilizaci již jednou zformovaného dimeru.

1.5.1.4. Reakce katalyzované NOS

Enzym NO syntáza katalyzuje reakci, do které jako substrát vstupují aminokyselina L-arginin, NADPH a molekulární kyslík a vznikají NADP^+ a aminokyselina citrulin. To, co vzniká jako první hlavní produkt této reakce, zda volný radikál NO a nebo jiná reaktivní dusíkatá sloučenina (nitroxylový aniont NO^- , ONOO^-), zůstává stále předmětem dohadů. Předpokládá se, že za přítomnosti BH_4 a argininu jako substrátu se tvoří přednostně oxid dusnatý, zatímco při suboptimální dostupnosti substrátu a kofaktoru mohou být *in vivo* syntetizovány jak NO, tak NO^- a jejich vzájemný poměr závisí na podmínkách (Rusche a kol., 1998). Jelikož tvorba NO, případně NO^- probíhá ve dvou krocích, je N^0 -hydroxy-L-arginin všeobecně akceptován jako meziproduct této reakce (Stuehr a kol., 1991).

NOS za některých okolností dokáže katalyzovat rozpřaženou NADPH oxidaci a tak formovat O_2^- (Sullivan a Pollock, 2006). Superoxid, stejně tak jako jeho metabolické produkty, spouští velké množství signálních procesů způsobujících patologické změny (Ferroni a kol., 2006). Tento radikál účinkuje škodlivě na endoteliální funkce, proliferaci hladké cévní svaloviny a adhezi leukocytů. Jak se ukazuje, právě nNOS má při velmi nízké koncentraci nebo úplné absenci argininu či BH_4 značnou tendenci účastnit se této reakce (Mayer a kol., 1991, Heinzl a kol., 1992). Ke tvorbě superoxidu dále přispívá přítomnost některého inhibitoru NOS, např. N^0 -monometyl-L-argininu (L-NMMA) (List a kol., 1997, Stroes a kol., 1998). Rozdílná produkce O_2^- jednotlivými isoformami NOS je vysvětlována na základě studia redukčního potenciálu hemu. Hemové železo u nNOS má významně vyšší redukční potenciál, nežli je tomu u iNOS, kde nejprve musí dojít k navázání substrátu a BH_4 , aby bylo dosaženo stejné hodnoty. Přesto je jisté, že produkovat superoxid mohou

všechny tři isoformy, i když za odlišných podmínek. Například zvýšená produkce $O_2^{\cdot-}$ endoteliální NO syntázou byla popsána v souvislosti s endoteliální dysfunkcí charakteristickou pro SHR potkany (Forstermann, 2006).

Při současné syntéze NO a superoxidového aniontu mohou velmi rychle tyto dvě sloučeniny spolu reagovat a vytvářet tak potenciální oxidant peroxynitrit (Beckman a Koppenol, 1996). Množství vyprodukovaného peroxynitritu za fyziologických podmínek záleží na přítomné koncentraci scavengerů kyslíkových radikálů superoxid dismutázy (SOD) a glutathion peroxidázy (GSH) (Mayer a kol., 1998). Za přítomnosti SOD a GSH reaguje NO/ $O_2^{\cdot-}$ přednostně s thiolovou skupinou za vzniku thionitritu, který pravděpodobně slouží jako zásobní nebo transportní forma oxidu dusnatého (Davidson a kol., 1996). Tvorba peroxynitritu souvisí se značným počtem patologických stavů doprovázených oxidativním stresem jako je například ateroskleróza (Stocker a Keaney, 2004) nebo hypertenze (Touyz, 2004).

1.5.2. Charakteristické znaky jednotlivých isoform NOS

1.5.2.1. Endoteliální NOS

Hlavním zdrojem oxidu dusnatého, faktoru významného pro normální funkci kardiovaskulárního systému, je eNOS. Ta je exprimovaná buňkami cévní výstelky (Boulden a kol., 2006) a kardiomyocyty (Feron a Balligand, 2006, Massion a kol., 2004). Specifické vlastnosti eNOS zajišťují funkční specifitu včetně citlivosti k vápníku a post-translační modifikace zase subcelulární lokalizaci. V důsledku influxu extracelulárního vápníku a nebo po jeho uvolnění z nitrobuněčných zásob se enzym plně aktivuje. Aktivace eNOS však může proběhnout i nezávisle na vápníku, např. působením hormonů jako jsou katecholaminy a vazopresin, zánětlivých mediátorů bradykininu a histaminu a nebo přes receptorem zprostředkovanou aktivaci G proteinů (Liu a kol., 2003). Tímto způsobem proběhne aktivace eNOS i při mechanickém zásahu včetně „shear stresu“ (Wessells a kol., 2006), kdy dojde k fosforylaci enzymu aktivovanou proteinkinázou Akt (Dimmeler a kol., 1999, Fulton a kol., 1999). Nyní se však řada autorů přiklání k možnosti, že by tím správným enzymem mohla být AMP-aktivovaná proteinkináza (Zhang a kol., 2006, Murakami a kol., 2006, Chen a kol., 1999).

Významnou odlišností od ostatních isoform je subcelulární lokalizace eNOS. Na rozdíl od nNOS a iNOS, jež se vyskytují v cytosolu, je endoteliální forma umístěna převážně v plazmalemě kaveol. Nezbytnou podmínkou je proto post-translační modifikace

na N-terminálním konci, kde je enzym acylován kyselinou myristovou a palmitovou. Myristoylace se ukázala být potřebnou pro lokalizaci eNOS v membráně a palmitoylace ke stabilizaci spojení s kaveolární membránou (Prabhakar a kol., 2000). Jak ale ukazují výsledky získané stimulací eNOS bradykininem (Michel a kol., 1993), převážná většina fosforylované formy byla lokalizovaná v cytosolické frakci. Na základě těchto zjištění vytvořili Sullivan a Pollock (2003) následující hypotézu. Ve zdravých endoteliálních buňkách se eNOS cyklicky přesouvá mezi membránou a cytolem. Translokací enzymu do cytosolu dojde k jeho zvýšené fosforylaci a následkem toho k mohutnější aktivaci. Jinak je tomu u hypertenzních jedinců, kde pouze část cytosolické eNOS cyklicky přechází z membrány a zpět a aktivně se podílí na syntéze NO. Míra snížení fosforylované formy a tedy i produkce NO je závislá na stupni poškození artérií. Navíc existuje striktně lokalizovaný „pool“ této isoformy pouze v cytosolu, který je zodpovědný za rozpraženou reakci a produkci O_2^- (Cosentino a kol., 1998, Pritchard a kol., 2001). Zvýšená cytosolická exprese eNOS tak nemusí korelovat s vyšší dostupností NO, ale naopak může přispívat k oxidačnímu poškození tkáně.

Stálé lipidové složení kaveolární membrány je důležité pro správnou funkci enzymu. Je možné, že metabolické poruchy (např. hypercholesterolémie), při kterých se mění lipidové složení membrán, mohou aktivitu NOS modifikovat negativně (Shaul, 2003). Jistým inhibítorem aktivity jsou integrální membránové proteiny kaveol (kaveolin-1 a kaveolin-3) endotelových buněk a myocytů (Shaul a kol., 1996, Michel a kol., 1997), které zřejmě interferují s vazbou kalmodulinu na podjednotku a elektronovým transportem doménami (Ghosh a kol., 1998). Shodná sekvence zajišťující interakci s kaveolinem je přítomná nejen u eNOS, ale také u ostatních dvou isoform NOS (Couet a kol., 1997).

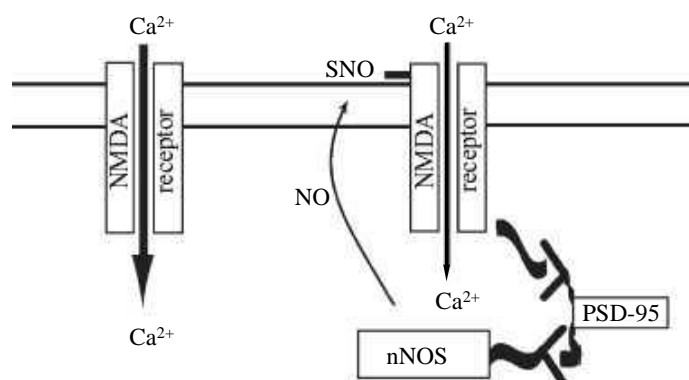
1.5.2.2. Neuronální NOS

Neadrenergní, necholinergní relaxace se vyskytuje ve všech buňkách hladkého svalu jako důsledek exprese neuronální NOS rozšířené v periferních neuronech (Keilhoff a kol., 2003). Kromě periferní nervové tkáně a centrálního nervového systému (CNS) (Patel a kol., 1996) je tato isoforma exprimována také v srdečním a kosterním svalstvu a také v buňkách hladkého svalu tvořících některá cévní řečiště, např. arteria carotis (Boulanger a kol., 1998). nNOS je díky úseku čítajícím 300 aminokyselin připojenému k N-terminálnímu konci největší ze všech tří isoform. Tato pouze pro nNOS specifická oblast obsahuje doménu zodpovědnou za asociaci enzymu s jinými proteiny vlastnímí stejný motiv. Jde například o dystrofin a $\alpha 1$ syntrofin lokalizované v sarkolemě buněk

kosterního svalu (Brennan a kol., 1995) a nebo v nervových buňkách se vyskytující PSD-95 (postsynaptický denzní protein 95), který se váže C-koncem přes svou doménu na glutamátový NMDA (N-metyl-D-aspartátový) receptor a zajišťuje tak funkční spojení nNOS s tímto typem receptoru (Christopherson a kol., 1999, Valtschanoff a Weinberg, 2001). Na základě těchto zjištění se začala zkoumat možnost i jiného působení NO než dosud známá cesta přes cGMP.

Jelikož je aktivita nNOS velmi účinně regulována intracelulární koncentrací vápníku, je spojení této isoformy s NMDA receptorem řídicím vstup Ca^{2+} do buňky jedním z důležitých regulačních mechanismů přítomných v neuronech. Vápníkový influx aktivuje nNOS (Garthwaite a kol., 1988) a vyprodukovaný oxid dusnatý negativní zpětnou vazbou inhibuje vstup Ca^{2+} NMDA receptorem do buňky (Kim a kol., 1999) (obr. 2).

Obr. 2 Negativní zpětnovazebná smyčka, kterou nNOS reguluje průnik Ca^{2+} NMDA receptory. (Sears a kol., *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2004).



Aktivitu nNOS, stejně tak jako je tomu u endoteliální isoformy, může dále modifikovat interakce s „heat shock proteinem 90“, který stimuluje katalytickou aktivitu enzymu pravděpodobně zvýšením vazby komplexu Ca^{2+} /kalmulin na enzym (Bender a kol., 1999, Song a kol., 2001). Ohledně vlivu fosforylace bylo provedeno mnoho pokusů jak *in vitro* tak také *in vivo* (Bredt a kol., 1992, Dinerman a kol., 1994), ale zatím stále zůstává nejasné, zda takováto modifikace enzymu některou z proteinkináz mění jeho aktivitu jako je tomu u eNOS (Fulton a kol., 1999). Pokud jde o enzymatickou funkci neuronální NOS, objevuje se zde značná odlišnost od ostatních isoform v pohotovosti katalyzovat rozpřaženou oxidaci NADPH. Ačkoli ochota vytvářet molekuly

superoxidu může napomoci vysvětlit škodlivou úlohu nNOS při mozkové ischemii (Huang a kol., 1994), význam exprese nNOS v buňkách mimo CNS není dosud zcela objasněn.

1.5.2.3. Inducibilní NOS

In vivo efekt iNOS je dán jejími unikátními vlastnostmi, jako jsou relativní nezávislost na vápníku a indukovatelná úroveň exprese. Za normálních fyziologických podmínek neexistuje velká pravděpodobnost, že by iNOS měla významný vliv na kardiovaskulární nebo nervový systém. Většinou se jedná o velmi nízkou nebo úplně chybějící expresi (MacMicking a kol., 1995, Christopherson a Bredt, 1997). Exprese iNOS může být indukovaná zánětlivými mediátory (cytokiny a bakteriální toxiny) v řadě typů buněk včetně endoteliálních buněk, srdečních myocytů (Balligand a kol., 1994), v buňkách hladkého svalstva, v makrofázích (Buttery a kol., 1996) a také v některých buňkách CNS. Následná nadměrná tvorba NO může mít v mnoha případech škodlivý dopad. Zvýšená exprese enzymu makrofágy a buňkami hladkého svalstva v aterosklerotických lezích je brána jako důkaz proaterogenního působení této isoformy. Navíc, pokud probíhá v cévě zánětlivý proces, je exprese iNOS zodpovědná za zhoršenou produkci NO endoteliální isoformou (Kessler a kol., 1997). Bylo také dokázáno, že podobně jako je tomu u aterosklerózy, je exprese iNOS mRNA, proteinu a jeho enzymatická aktivita přítomna po krátkodobé nebo permanentní ischemii mozku (Iadecola a kol., 1995, Grandati a kol., 1997). Maximální exprese se při pokusech *in vivo* objeví za 12-48 hodin po ischemii a iNOS imunoreaktivita je lokalizovaná v polymorfonukleárních neutrofilech (Iadecola a kol., 1995), astrocytech (Endoh a kol., 1994, Wallace a Bisland, 1994) a v buňkách cév poraněného mozku. Také neurony mohou za těchto podmínek exprimovat iNOS, jak ukazují výsledky experimentů prováděných na *in vitro* modelech mozkové ischemie (Moro a kol., 1998).

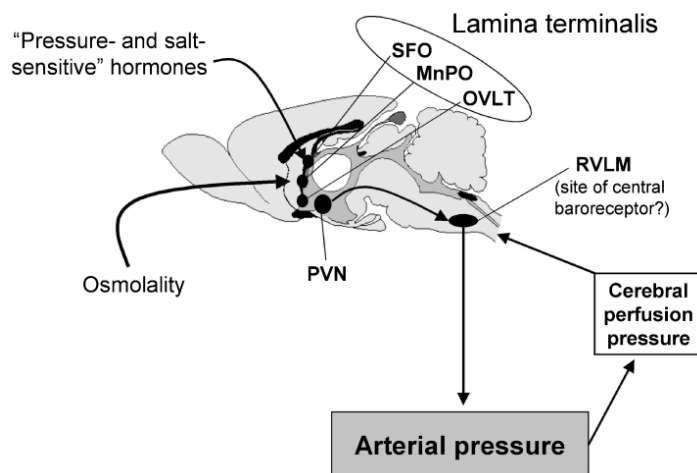
Inducibilní NO syntáza je regulována převážně na transkripční úrovni a aktivace nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) je nezbytným požadavkem pro expresi tohoto genu (Xie a kol., 1994). V centrálním nervovém systému byl nedávno objeven protein kalirin, který vazbou protein-protein interaguje s iNOS a snižuje tak její aktivitu inhibicí formování dimerů (Ratovitsky a kol., 1999, Zhang a kol., 2003).

1.5.3. Centrální nervový systém a NO

1.5.3.1. Regulace krevního tlaku a sympatické aktivity v CNS

V mozku se vyskytují dvě hlavní struktury (hypotalamus a mozkový kmen), které se významně podílejí na regulaci homeostázy tělních tekutin a udržování krevního tlaku. **Hypotalamus** slouží jako mozkové centrum autonomních funkcí. Účastní se kardiovaskulární regulace, moduluje baroreflex a sympatický nervový tonus. Hypotalamická jádra spolu s oblastí AV3V jsou součástí mezimozku (diencefalón). Podle Brodyho a kol. (1978) je tato oblast jednou z nejdůležitějších v CNS účastnících se regulace TK, poněvadž se vyznačuje vysokou hustotou vazebných míst pro Ang II a navíc zvýšeně propustnou hematoencefalickou bariérou, jejíž pozměněné vlastnosti umožňují cirkulujícím peptidům přestupovat z krve do mozku a tam modulovat probíhající procesy. Další významnou oblastí pro regulaci kardiovaskulárních funkcí je **mozkový kmen**, respektive jeho dvě centra – rostrální ventrolaterální medula (RVLM) a nucleus tractus solitarii (NTS). V RVLM se nachází ústřední centrum aktivity sympatického nervového systému, zatímco NTS zastává důležitou integrující roli mezi sympatikem, parasympatikem, RAS a metabo- a chemoreceptory. Diencefalické osmosenzitivní struktury (obr. 3) jako median preoptic nucleus (MnPO), organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) a subfornikální orgán (SFO) jsou propojeny eferentními drahami s hypotalamickým paraventriculárním jádrem, které vysílá excitační projekci do sympatických neuronů lokalizovaných v oblasti RVLM mozkového kmene. Zdá se, že tato dráha by se mohla účastnit patologicky zvýšeného sympatického tonu spontánně hypertenzních potkanů (Allen, 2002, Ito a kol., 2002). Některé studie (Ferguson, 1988, Ferguson a Bains, 1997) poukazují na to, že odstředivé dráhy vycházející z lamina terminalis a pokračující do PVN a poté do RVLM mohou zprostředkovávat sympatickou excitační odpověď jak na zvýšenou osmolalitu mozkomíšního moku, tak na Ang II. Navíc RVLM a NTS získávají informace z viscerálních senzorů, včetně kardiovaskulárních informací z periferie (Torvik, 1956) a předávají je autonomním centřům lokalizovaným v předním mozku. Jelikož NO působící v RVLM a NTS přispívá ke snižování arteriálního TK a sympatické aktivity (Tseng a kol., 1996, Zanzinger a kol., 1995, Kagiya a kol., 1998), trvalé oslabení aktivity enzymu NOS a následně snížená syntéza NO v těchto oblastech mohou vést k vzestupu tlaku v důsledku stimulace SNS aktivity.

Obr. 3 Schéma modulačce krevního tlaku v centrálním nervovém systému. (Osborn JW, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2005)



1.5.3.2. Mozkový renin-angiotenzinový systém ve vztahu k NO

Již v 70. letech minulého století Ganten a Speck (1978) prokázali existenci RAS v mozku, jenž funguje zcela nezávisle na plazmatickém RAS a tvoří ho veškeré prekursorů a enzymy nezbytné pro syntézu, konverzi a degradaci angiotenzinu II. Mozkový RAS ve spolupráci s dalšími neurotransmitery a neuromodulátory přispívá ke kontrole TK a k udržování extracelulárního objemu tekutin (Wright a Harding, 1992). Existuje také značné množství důkazů o tom, že Ang II zvyšuje aktivitu SNS působením na sympatická ganglia a sympatická nervová zakončení v CNS (Zimmerman a kol., 1984, Reid, 1992, DiBona, 2000, Brooks a Osborn, 1995, Leenen and Yuan, 2001). Intracerebroventrikulární podání Ang II způsobuje na dávce závislé zvýšení TK, které se pravděpodobně odehrává na úrovni aktivace AT₁ receptorů lokalizovaných v hypothalamu (McKinley a kol., 1995, Song a kol., 1992) a v mozkovém kmeni (DiBona, 2000). Ang II centrálního původu může aktivovat periferní SNS nejen stimulací pregangliových neuronů v RVLM, ale i regulací arteriálního baroreflexu (DiBona a kol., 2000). Hyperaktivita RAS v CNS hraje významnou úlohu v patogenezi vysokého TK u řady hypertenzivních modelů, včetně SHR (Wright a Harding, 1992, Veerasingham a Raizada, 2003) a Dahlových potkanů (Leenen a kol., 2002). Výsledky z posledních let naznačily možnost, že centrálně produkováný NO by mohl snižovat sympatický tonus, jehož hnací silou je centrálně syntetizovaný Ang II (Krukoff, 1998, Leenen, 2002, Ramchandra a kol., 2005). K léčbě některých forem hypertenze slouží blokátory RAS, jako jsou ACE inhibitory (např. enalapril), které

redukuje syntézu endogenního Ang II a nebo látky ze skupiny sartanů bránící stimulačnímu efektu Ang II na AT₁ receptory (Ohlstein a kol., 1992). Podle Quadri a Dominiaka (2003) se při rozvoji hypertenze zvýší koncentrace endogenního Ang II, jenž stimuluje centrální aktivitu SNS a současně dosud neznámým mechanismem i syntézu NO k vykompenzování zvýšené aktivity sympatiku. Dlouhodobá antihypertenzivní léčba, která alespoň částečně tlumí aktivitu SNS, by mohla snižovat lokální syntézu a uvolňování NO v hypotalamu.

1.5.3.3. Centrální NO

V mozku potkana byly detekovány všechny tři hlavní isoformy NO syntázy, avšak určit, která z nich je ke kompenzaci hypertenze nejdůležitější, dosud zcela nelze. Podle de Wardenera (2001) je hlavním typem NOS v mozku neuronální isoforma, pouze asi 5 % připadá na endoteliální isoformu a indukibilní NOS se za fyziologických podmínek nevyskytuje vůbec. Jinak je tomu, probíhá-li v CNS trauma či infekce. Pak ve velkém množství reaktivních astrocytů a infiltrovaných neutrofilů výrazně vzroste exprese iNOS. Výsledky *in situ* hybridizace ukazují na mnohem vyšší přítomnost NOS v mozku nežli v jiných tkáních (Christopherson a Bredt, 1997). Hustota neuronů a nervových vláken obsahujících NOS je v oblasti hypotalamu druhá nejvyšší po mozečku. Nejzřetelněji značené oblasti leží v předním hypotalamu v supraoptickém (SON) a PVN jádře, v OVLT a SFO (Rodrigo a kol., 1994). Kromě oxidu dusnatého produkují neurony ze SON a PVN současně značné množství dalších neurohormonů a neurotransmiterů, jako jsou oxytocin, vazopresin, katecholaminy, enkefaliny aj. (Sawchenko a kol., 1985). Proto je dosti pravděpodobné, že by NO mohl ovlivňovat jejich syntézu i sekreci. Farmakologické a fyziologické studie poskytují důkazy o tom, že NO na úrovni hypotalamu moduluje endokrinní a autonomní regulaci kardiovaskulární činnosti. NO v PVN uplatňuje svůj inhibiční efekt na renální sympatický výdej (Gerová a kol., 1995, Zhang a Patel, 1998) a také snižuje uvolňování vazopresinu do krevní cirkulace (Yasin a kol., 1993, Goyer a kol., 1994).

1.5.3.4. Účinky NO na periferii

Oxid dusnatý hraje v srdci významnou úlohu v kontrole koronárního průtoku a cévního tonu, převážně při zprostředkování agonistou indukované vazodilatační odpovědi například na bradykinin nebo acetylcholin (Furchgott a Zawadzki, 1980, Moncada a kol., 1991). eNOS exprimovaná v srdečních myocytech ovlivňuje myokardiální funkce jako je

kontrola srdeční frekvence, bazální kontrakce a ochrana proti ischemicko-reperfuznímu poškození (Balligand a kol., 1993, Han a kol., 1994, Jones a kol., 1999).

Obecně akceptovaný názor na distribuci NOS a jejich isoform v cévách je takový, že cévní endotel exprimuje eNOS, buňky hladkého svalu cév ani jednu z isoform, zatímco nNOS je exprimována perivaskulárními nervy pouze některých cév. NO odvozený z eNOS difunduje do vrstvy tvořené z buněk hladkého svalu, kde stimuluje guanylát cyklázu a spouští NO-cGMP dráhu vrcholící relaxací hladké cévní svaloviny, inhibicí její proliferace a účinkem na krevní destičky (Albrecht a kol., 2003, Sessa, 1994, Harrison, 1997).

V ledvinách se NO zapojuje do řízení řady vitálních procesů, včetně regulace renálního průtoku, tubulo-glomerulární zpětné vazby (Welch a kol., 1999), sekrece reninu a modulace objemu extracelulárních tekutin (Mattson a Bellehumeur, 1996, Kone, 1997). eNOS se primárně nachází v endoteliální výstelce cév, kde napomáhá udržet relativně nízkou cévní resistenci charakteristickou právě pro ledviny (Majid a Navar, 2001) a také působí proti účinkům endogenních vazokonstriktorů, jako je například Ang II (Frohlich, 1997, Vidal a kol., 1988, Braam, 1999). Vytvořený NO může i přímo v proximálním tubulu modulovat reabsorpci sodných iontů prostřednictvím stimulace Na^+/H^+ výměníku (Wilcox a kol., 1992, Amorena a Castro, 1997). *In situ* hybridizace provedená za bazálních podmínek odhalila přítomnost inducibilní NO syntázy pouze v proximálním ledvinném tubulu (Ahn a kol., 1994). nNOS byla detekována v macula densa (Beierwaltes, 1997), v perivaskulárních nervových zakončeních a v menší míře i ve sběracích kanálcích uložených v ledvinné kůře (Wang a kol., 1998) a v endoteliálních buňkách eferentních arteriol (Ichihara a kol., 1998, Liu a Barajas, 1993). Tato isoforma hraje klíčovou úlohu v sekreci draselných iontů, v hormonální regulaci zpětné resorpce sodíku a při kontrole cévního tonu eferentních arteriol. Zaznívají i názory (Braam, 1999, Beierwaltes, 1997), že oxid dusnatý syntetizovaný nNOS je důležitým regulátorem sekrece reninu juxtaglomerulárními buňkami. Všechny tyto účinky oxidu dusnatého v ledvině poukazují na význam tohoto systému kontrolujícího ledvinné funkce. Útlum tvorby NO některým z inhibitorů způsobí rozvoj systémové hypertenze (Ribeiro, 1992, Pereira, 1998). Abnormality v renálních funkcích, které zahrnují nižší plazmatický průtok, sníženou glomerulární filtraci a redukovaný intersticiální hydrostatický tlak (Kato a kol., 1995), jsou typické pro široce používaný genetický model hypertenze, tj. pro potkany kmene SHR. Proto se řada prací (Kumar a kol., 2005, Barbuto a kol., 2004, Persson a kol., 2000, Vaziri a kol., 1998) věnuje zkoumání příčiny jejich vzniku, kterou by mohla mimo jiné být i porucha syntézy NO.

1.6. Experimentální hypertenze

Hlavním cílem experimentálního výzkumu je snaha objasnit příčiny a možné mechanismy vzniku hypertenze a přispět tak k omezení značně vysokého výskytu této závažné civilizační choroby. Získané poznatky by pak mohly změnit dosavadní preventivní postupy využívané u tohoto onemocnění a umožnit individuální přístup zajišťující efektivnější léčbu. K tomuto výzkumu slouží řada zvířecích modelů s indukovanou či genetickou formou hypertenze (Kuneš a Zicha 2002). Zvláště genetické modely, jako např. potkani se spontánní formou hypertenze částečně napodobují situaci vyskytující se u lidí s esenciální hypertenzí. Přístup ke studiu hypertenze za využití všech těchto modelů musí být komplexní, tj. od studia změn kardiovaskulárních fenotypů až po využití metod molekulární genetiky a biologie při hledání jednotlivých genů.

Pokud mají být výsledky experimentálního výzkumu v co největší míře aplikovány v medicínské praxi, je nutné najít co nejvíce podobností mezi experimentálním a klinickým výzkumem jak z hlediska účinku vnějších faktorů, tak i z hlediska genetické podstaty. Lidská esenciální hypertenze i genetická hypertenze u potkanů jsou příklady chronického, pomalu se vyvíjejícího onemocnění, které je výsledkem vzájemné interakce genetické predispozice s faktory vnějšího prostředí (především v časných fázích ontogeneze). Zdá se, že hodnoty krevního tlaku v dospělosti jsou „určovány“ v tzv. kritických vývojových periodách, v nichž se odehrává nastavení hlavních regulačních systémů (Zicha a Kuneš 1999). Vzhledem k tomu, že změny v časných fázích ontogeneze mohou vést k závažným změnám kardiovaskulárních fenotypů v pozdějším věku, neměl by být význam těchto relativně krátkých kritických period podceňován ani z hlediska budoucí prevence lidské esenciální hypertenze. I když není zcela možné poznatky získané v experimentu na zvířatech beze zbytku přenášet do klinické praxe, je zřejmé, že základní ontogenetické principy uplatňující se v patogenezi hypertenze u lidí a potkanů jsou velmi podobné. Podrobné informace o věkově závislých změnách mohou přispět k lepší prevenci vzniku hypertenze a dalších kardiovaskulárních chorob. Bohužel však stále neexistuje dostatek informací o vývojových periodách u člověka, v nichž by vývoj kardiovaskulárního systému mohl být efektivně ovlivněn. Navíc ekonomické a hlavně etické důvody jsou příčinou, proč pozdní důsledky zásahů do vývoje organismu v časných údobích vývoje jsou stále studovány pouze na experimentálních modelech.

Při studiu genetické podstaty zvýšeného krevního tlaku u člověka se naráží, jak jsem již zmínila, na mnoho etických i praktických problémů. U lidské populace nelze

využít klasické genetické metody jako u experimentálních modelů. Navíc rozvoj onemocnění je u člověka pomalý v souvislosti s jeho dlouhověkostí. Opakovaná a dlouhodobá invazivní měření jsou nesnadná a získávání některých biologických vzorků je často i nemožné. Vzhledem k podobnosti mezi jednotlivými formami klinické a experimentální hypertenze, lze k jejich studiu využít experimentální modely. Pro svou dostupnost a relativní jednoduchost měření hemodynamických parametrů je nejpoužívanějším modelovým zvířetem laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*).

1.6.1. Zvířecí modely experimentální hypertenze

Hlavní výhodou práce s experimentálními modely je jejich dosažitelnost, možnost standardizace pokusných podmínek a genetických vlastností zvířat. Dalším neopomenutelným plus je rychlost a reprodukovatelnost rozvoje HT a přidružených komplikací.

Podle vzniku experimentální hypertenze se modely rozdělují do dvou základních skupin. První skupinu tvoří zvířata původně normotenzivní, u nichž byla hypertenze indukována farmakologickým nebo invazivně operačním zásahem, který vede k definované změně krevního tlaku. Do druhé skupiny patří zvířata, u kterých hypertenze vzniká v důsledku genetické poruchy. K vzestupu krevního tlaku dojde během života buď spontánně a nebo po stimulaci, např. zvýšeným přívodem soli.

Všechny základní experimentální modely byly vyvinuty pro studium jednotlivých patofyziologických a patogenetických mechanismů hypertenze. Ke studiu genetické podstaty hypertenze se nejčastěji používá přesně definovaný model tzv. inbrední kmen, který je produktem křížení sourozenců po nejméně 20 následujících generacích. Tento kmen je v zásadě homozygotní ve všech lokusech.

Za základ většiny inbredních potkaních kmenů je považován outbrední kmen **Wistar** (WIS). Kolonie byla odvozena od albinotických potkanů pravděpodobně evropského původu. Jejich potomci slouží jako kontrolní zvířata i v současných experimentech.

V roce 1971 byl v Národním zdravotním institutu z outbrední linie WIS chovaných na lékařské univerzitě v Kyotu vyšlechtěn nový inbrední kmen potkana nesoucí označení **Wistar-Kyoto** (WKY). Tento inbrední kmen je často používán jako kontrola ke kmeni spontánně hypertenzního potkana v genetických studiích (Rapp, 1987).

1.6.1.1. Spontánně hypertenzní potkan

Kmen SHR patří mezi nejčastěji používaný modelový organismus pro studium hypertenze a inzulínové rezistence, neboť se u něho v průběhu vývoje vytvářejí jak inzulínorezistence, tak mechanismy podílející se na vzniku hypertenze podobně jako u lidské esenciální HT (Swislocki a Tsuzuki, 1993).

Vznikl roku 1963 v japonském Kyotu (Okamoto a Aoki, 1963) ze stejné populace outbredních potkanů Wistar (jako inbrední kmen WKY) křížením samců s mírnou hypertenzí a samic majících vysoký krevní tlak. Do následujících sourozeneckých křížení byli vybíráni potomci s vysokým krevním tlakem (Okamoto, 1969). Vznikli tak inbrední jedinci, u nichž se hypertenze rozvíjí bez výjimky ve věku 7-15 týdnů a kolem 20-25 týdne přesahuje krevní tlak u některých kolonií hodnotu 200 mm Hg. Tento kmen se vyznačuje vysokou incidencí kardiovaskulárních komplikací (Yamori, 1984). Se stoupajícím TK se stále více uplatňuje zvýšená periferní rezistence, která má pravděpodobný původ v poruše neurogenních mechanismů zajišťujících centrální regulaci TK.

1.6.1.2. Dahlův potkan

Často studovaným modelem solné hypertenze je inbrední kmen Dahlových sůl-senzitivních a sůl-rezistentních potkanů. Solná hypertenze se vyvine až po určité době zvýšeného příjmu NaCl na základě genetických predispozic, které spočívají ve zvýšené aktivitě SNS a omezeném vylučování Na^+ ledvinami.

Dahlovi sůl-senzitivní a sůl-rezistentní potkani pocházejí z kmene Sprague-Dawley, ze kterého byli vybíráni na základě odpovědi jejich krevního tlaku na vysoký obsah soli v dietě. (Dahl a kol., 1962a,b). Z původně outbredních kmenů byly opakovaným křížením bratr x sestra získány vysoce inbrední kmeny. K inbredizaci došlo téměř současně na dvou místech, v Toledu a v Brookhavenu. Pro zvířata inbredizovaná v Toledu profesorem Rappem se ujalo označení SS/Jr a SR/Jr a pro inbrední linii z Brookhavenu DS a DR. Počátkem devadesátých let byla v Americe založena kolonie Dahlových potkanů firmou Harlan, ve které ale došlo ke genetické kontaminaci. Po opakované inbredizaci jsou nyní distribuována zvířata s poněkud pozměněným genotypem (St Lezin a kol., 1994, Lewis a kol., 1994, Walder a kol., 1996). Výsledkem této chovatelské chyby je skutečnost, že v současné době existuje několik kolonií Dahlových potkanů, které se mohou geneticky lišit (Hojná a kol., 2005). St Lezinová a kol. (1992) zjistili mezi DS a DR 80 % genetickou shodu na rozdíl od s SHR a WKY, kde shoda představuje pouze 50 %.

Zvýšený příjem soli potravou (8 % NaCl) zapříčiní u sůl-senzitivních Dahlových potkanů během 3-4 týdnů prudký rozvoj hypertenze doprovázený výraznými cévními a renálními lézemi, zatímco tlak DR jedinců se významně nemění. Na nízkosolné dietě (0.4 % NaCl) však DS jedinci přežívají velmi dobře, jelikož k nárůstu TK dochází pozvolně po několik měsíců (Rapp a Dene, 1985). Transplantace ledvin provedené mezi DS a DR jedinci potvrdily předchozí domněnku, že za sůl senzitivitu částečně zodpovídají zhoršené ledvinné funkce. Jednou z příčin by mohla být nedostatečná glomerulární filtrace ovlivněná nižším počtem glomerulů u DS jedinců (Rapp, 1984).

1.6.1.3. Hereditárně hypertriglyceridemický potkan

Hereditárně hypertriglyceridemický potkan (HTG) slouží jako genetický model pro studium hypertriglyceridémie a dalších symptomů metabolického syndromu.

Tento kmen vznikl společně s normotriglyceridemickým z outbredního kmene Wistar. Prvním krokem byla selekce tří párů zvířat s normální a tří párů s vyšší hladinou plazmatických triglyceridů po zátěži vysokosacharidovou dietou. Jejich potomci byli dále po 10 generací kříženi bratranec x sestřenice. Posledním třetím krokem bylo příbuzenecké křížení bratr x sestra po dobu 25 generací. Triglyceridy byly třikrát vyšší u hypertriglyceridemických zvířat oproti normotriglyceridemickým. Normotriglyceridemická linie, která bohužel díky nízké plodnosti zanikla, představovala optimální kontrolu pro linii hypertriglyceridemickou (Vrána a kol., 1993). Jako kontroly jsou proto podle charakteru studií používány jiné normotriglyceridemické kmeny, např. outbrední kmen Wistar, inbrední Wistar-Kyoto či Lewis.

Později byly u HTG kmene zjištěny ještě další metabolické abnormality a také vysoký krevní tlak (Štolba a kol., 1992). Plazmatické hladiny noradrenalinu jsou u HTG potkanů zvýšeny o 50 % a adrenalinu dokonce o 100 % v porovnání s kontrolami. Také vylučování jednotlivých metabolitů katecholaminů močí je signifikantně vyšší u HTG (Štolba a kol., 1993). U tohoto modelu byla popsána řada membránových abnormalit od změn membránové fluidity až po abnormální regulaci hladin cytozolického vápníků (Devynck a kol., 1998). V současné době jsou F₂ hybridy odvozené od HTG a Lewis progenitorů používány pro hledání genetických determinant hypertenze a metabolických abnormalit (Ueno a kol., 2003 a 2004).

2. Cíl disertační práce

Cílem mé disertační práce je přispět k objasnění patofyziologické úlohy systému oxidu dusnatého v rozvoji geneticky podmíněné hypertenze a metabolického syndromu. Periferně i centrálně syntetizovaný NO se významnou měrou podílí na regulaci krevního tlaku, a proto případné mutace v genu kódujícím syntézu NO, změny v enzymatické aktivitě či proteinové expresi NO syntázy mohou zasahovat do mechanismů ovlivňující krevní tlak. V experimentech jsou využívány zvířecí modely umožňující studium genetické hypertenze (SHR a Dahlovi potkani) a dalších symptomů metabolického syndromu (HTG potkan).

Dílčí cíle:

- 1) Hledání polymorfismu v genu pro inducibilní isoformu NOS u Dahlových potkanů
- 2) Stanovení proteinové exprese jednotlivých isoform NOS v periferních tkáních (srdce, ledviny) a v mozkových strukturách (diencefalon, mozkový kmen)
- 3) Sledování úlohy isoform NOS v poruchách rovnováhy vazoaktivních systémů podílejících se na regulaci TK a vlivu farmakologických faktorů na vybrané parametry NO systému

Získané výsledky budou diskutovány z hlediska vlivu centrálního a periferního systému NO na sympatickou vazokonstrikci u spontánní a solné hypertenze.

3. Metodika

3.1. Experimentální zvířata

V pokusech zařazených do této disertační práce byla použita řada potkanních kmenů a to jak inbredních (Dahl, SHR, WKY, HTG), tak také outbredních (WIS). Tyto kmeny pocházely z kolonií potkanů chovaných ve Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze. Všechna zvířata byla chovaná za standardních laboratorních podmínek (teplota 23 ± 1 °C, 12-ti hodinový světelný režim). Pokud nebude u experimentu uvedeno jinak, byla zvířata krmena dietou ST1 a pila vodu *ad libitum*.

Systolický, diastolický a střední arteriální tlak byl zvířatům měřen v lehké éterové anestezii přímou punkcí levé karotidy. K tomuto měření byl využíván transducer typu Satham P23Db a zapisovač 7754A firmy Hewlett-Packard.

Zvířata byla usmrcována dekapitací. Po separaci levé komory srdeční a ledvin byl z lebky vyjmut mozek, ze kterého byly následně vyizolovány dvě části. Jednou z nich byla oblast diencefalonu zahrnující anteroventrální oblast 3. mozkové komory a skupinu hypothalamických jader (např. lamina terminalis, periventrikulární jádro, suprachiasmatické jádro, subfornikální orgán, atd.). Druhou pro nás zajímavou centrální oblastí byl mozkový kmen, respektive jeho část obsahující rostrální ventrolaterální části medulla oblongata. Vyseparované části jednotlivých orgánů byly zváženy, následně homogenizovány a poté dále analyticky zpracovávány. Dlouhodobě jsou homogenáty skladovány v hlubokomrazicím kontejneru při teplotě -80 °C. V experimentu 1 byla navíc odebírána jaterní tkáň k izolaci DNA, která po zamražení v tekutém dusíku byla opět skladována v hlubokomrazicím boxu.

Během studií bylo se zvířaty zacházeno v souladu s předpisy etické komise a § 17 zákona ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění zákona č. 77/2004 Sb.

3.2. Genetická analýza

3.2.1. Izolace DNA

Existuje několik metod izolace DNA. V této práci byly použity dva způsoby, přičemž jako zdroj DNA byla u obou způsobů použita část jaterní tkáně. Pokud odebraná tkáň není ihned zpracovávána, je nutné ji co nejrychleji zmrazit, čímž se zastaví činnost nukleáz (mohly by nukleovou kyselinu nežádoucím způsobem rozštěpit).

Prvním způsobem je klasická izolace fenol/chloroformovou metodou.

Protokol:

1. Do zkumavky je k odebrané tkáni (100 mg) přidáno 700 μ l pufru pro extrakci DNA (50 mM Tris-HCl, pH 8.8; 25 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS).
2. Ke každému vzorku je přidáno 35 μ l (10 mg/ml) proteinázy K. Vše je krátce promícháno. Následuje inkubace přes noc při 55 °C.
3. Druhý den je do každého vzorku napipetováno 750 μ l fenolu, následuje promíchání mírným překlápěním.
4. Vše pokračuje 4 minutovou centrifugací při 10 000g a laboratorní teplotě.
5. Poté je přenesena vodní fáze (horní - bez fenolu) do nové zkumavky pipetou se seříznutou špičkou a je přidáno 750 μ l fenolu s chloroformem a izoamylalkoholem v poměru 25:24:1, následuje opět promíchání mírným překlápěním.
6. Vzorky je potřeba opět stočit 4 minuty při 10 000g a teplotě místnosti.
7. Vodní fáze je opět přenesena do nové zkumavky pipetou se seříznutou špičkou a je přidáno 650 μ l chloroform - izoamylalkoholu v poměru 24:1.
8. Následuje centrifugace 2 minuty při 10 000g při teplotě místnosti.
9. Do plastické zkumavky je odebrána vodní fáze a převrstvena 1.5 ml ethanolu o laboratorní teplotě.
10. Vysráženou DNA lze natočit na skleněnou tyčinku a vysušit vakuem.
11. Poté se DNA rozpustí v cca 50 μ l TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 a 1 mM EDTA, pH 8.0, do 100 ml H₂O).
12. Takto izolovanou nukleovou kyselinu je možné uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě při teplotě -20 °C.

Druhý způsob izolace DNA využívá vlastností roztoku označovaném jako Fasano.

Protokol:

1. K 30 mg biologického materiálu se přidá 4 ml Fasano roztoku (20 mM EDTA, pH 8.2; 40 mM Tris, pH 8.0; 0.2 M NaCl; 0.5 % SDS) a 50 μ l proteinázy K.
2. Vzorky je nutné promíchat a inkubovat po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.
3. Následuje přidání 1.5 ml nasyceného roztoku NaCl a opět promíchání a inkubace 30 minut při 4 °C.
4. Následnou centrifugací (5000 otáček, 20 minut při 4 °C) dojde k oddělení supernatantu, ke kterému je do nové zkumavky přidáno 4 ml isopropanolu, čímž dojde k vysrážení DNA. DNA lze i v tomto případě natočit na skleněnou tyčinku.
5. Vhodné je ještě před sušením promytí nejprve 70 % a následně ještě 96 % etanolem.
6. Poté je možné izolovanou DNA resuspendovat v 0.5 ml TE pufu.

V těchto metodách je použita řada roztoků, z nichž každý má svůj význam: Na₂EDTA - dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové = chelaton III, zabraňuje činnosti nukleáz tím, že odstraní Ca²⁺ a Mg²⁺ ionty, nezbytné pro funkci těchto enzymů. SDS - lauryl sulfát sodný, je negativně nabitý polykationt, který kromě detergentních účinků (uvolňování obsahu buněk), působí jako denaturační činidlo a způsobuje disociaci nukleových kyselin od proteinů. Proteináza K má za úkol rozštěpení bílkovin na krátké peptidy. Směs fenolu a chloroformu oddělí DNA od rozštěpených bílkovin.

3.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Principem této metody je cyklické opakování 3 základních kroků, čímž dosáhneme rychlého zmnožení (amplifikace) určitého úseku DNA (genu), který je označen specifickými oligonukleotidy zvanými primery. Jedná se většinou o pár oligomerů tvořící 16 až 30 nukleotidových bazí, z nichž jeden se nazývá sense a probíhá od 5' konce a druhým typem je antisense, který se navazuje na 3' konec genomové DNA. Každý krok cyklu vyžaduje specifické teplotní a chemické podmínky. Celková amplifikace se skládá z těchto na sebe navazujících kroků:

Tepelná denaturace - rozvinutí dvoušroubovice DNA na dvě jednovláknové.

(optimální teplota 94 - 96 °C po dobu 1 - 2 minut)

Anelace - při snížení teploty dochází ke specifickému navazování primerů ke komplementárním cílovým sekvencím amplifikované DNA. Specifičnost připojení primerů závisí na jejich délce, poměru párů bází T/A a G/C a na teplotě (40 – 60°C).

Elongace (syntetická fáze) – za přítomnosti termostabilní DNA-polymerázy (65 - 80°C) se podle předlohy komplementárně připojují nukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku, a vyplňují tak úsek vymezený navázanými primery.

V experimentu 1 byly použity primery (tab. 2) pro gen kódující inducibilní isoformu NOS, které byly syntetizovány firmou VCB-GENOMICS.

Tab. 2 Seznam primerů použitých pro PCR genu pro *iNOS*

název genu	název primeru	délka úseku	sekvence
inducibilní NOS	D10Mco39 - forward	269 bp	5'-cag ctc tca ctg att gac ttg g-3'
	- reverse		5'-gtc agg ttc cca tgt gct ta-3'
	D10Mco40 - forward	301 bp	5'-gga cgt tgt tgt gat ttc ctg g-3'
	- reverse		5'-agc aga ggc aga gat tga ttg c-3'
	NOS 2 - forward	1200 bp	5'-agc aga atg tga cca tca tgg ac-3'
	- reverse		5'-ttt gac cca gta gct gcc act c-3'

Pro dosažení efektivní DNA amplifikace je zapotřebí, aby se tyto tři kroky cyklicky opakovaly 25-40x. Nově syntetizované fragmenty slouží jako předlohy (templáty), každý cyklus zdvojnásobí množství DNA nasyntetizované v předchozím cyklu. Po skončení cyklů se ještě provedou další dva kroky: konečná elongace po dobu 5 minut, která umožní dokončit syntézu všech vláken DNA, a nakonec se vše ochladí na 4 °C. Amplifikace probíhá automaticky v termocykleru, který umožňuje programované změny teplot ve stanoveném čase (tab. 3, 4).

Tab. 3 Optimální podmínky PCR amplifikace pro jednotlivé primery při použití Taq DNA polymerázy

fáze PCR	název genu	název primeru	teplota (°C)	čas
1. počáteční denaturace			95	2 min
2. denaturace			95	40 s
3. anelace				
	inducibilní NOS	D10Mco39	58	30 s
		D10Mco40	61	30 s
4. elongace			72	50 s
5. na bod 2.			opakovat 40x	
6. konečná elongace			72	5 min
7. chlazení			4	

Protokol pro amplifikaci úseků kratších než 1000 bp:

- Příprava master mixu, množství pro jeden vzorek o celkovém objemu 50 μ l.

10x koncentrovaný pufr pro Taq DNA polymerázu	5.0 μ l
10 mM PCR dNTP mix	0.5 μ l
forward primer o koncentraci 25 μ M	0.5 μ l
reverse primer o koncentraci 25 μ M	0.5 μ l
1.5 mM MgCl ₂	3.0 μ l
Taq DNA polymeráza (100U)	1.0 μ l
PCR H ₂ O	34.5 μ l
- Master mix promíchat (Vortex) a do jednotlivých vzorků DNA (5 μ l) přidat 45 μ l tohoto master mixu.
- Reakční směs krátce promíchat a přenést do termocykleru (od firmy Eppendorf).
- Provést vlastní PCR na termocykleru s programem odpovídajícím stanovovanému úseku DNA.

Tab. 4 Optimální podmínky PCR amplifikace pro jednotlivé primery při použití Expand High Fidelity PCR System

fáze PCR	název genu	název primeru	teplota (°C)	čas
1. počáteční denaturace			94	2 min
2. denaturace			94	15 s
3. anelace				
	inducibilní NOS	NOS 2	51.5	30 s
4. elongace			72	1 min
5. na bod 2. opakovat 10x				
6. denaturace			94	15 s
7. anaeling			51.5	30 s
8. elongace			72	1 min
9. na bod 6 opakovat 20x				
6. finální elongace			72	7 min
7. chlazení			4	

Protokol pro amplifikaci úseků delších než 1000 bp:

- Příprava master mixu, množství pro jeden vzorek o celkovém objemu 50 μ l.

10x koncentrovaný Expand High Fidelity pufr	5.0 μ l
10 mM PCR dNTP mix	1.0 μ l
forward primer o koncentraci 25 μ M	0.5 μ l
reverse primer o koncentraci 25 μ M	0.5 μ l
1.5 mM MgCl ₂	3.0 μ l
Expand High Fidelity enzyme mix	0.75 μ l
PCR H ₂ O	34.25 μ l
- Master mix promíchat (Vortex) a do jednotlivých vzorků DNA (5 μ l) přidat 45 μ l tohoto master mixu.
- Reakční směs krátce promíchat a přenést do termocyklieru (od firmy Eppendorf).
- Provést vlastní PCR na termocyklieru s programem odpovídajícím stanovovanému úseku DNA.

3.2.3. Restrikční štěpení úseku DNA

Tato metoda se hojně využívá k dokazování přítomné bodové mutace v řetězci DNA. Restrikční enzym specificky rozpozná štěpné místo (v případě, že je přítomné a není

zatížené mutací) a rozštěpí amplifikovaný produkt na dva kratší fragmenty. V našem případě jsme ke štěpení získaného PCR produktu použili restriční endonukleázu *PleI* (Fermentas), která měla potvrdit či vyvrátit domněnku o přítomnosti polymorfismu mezi Dahlovými sůl-senzitivními a sůl-rezistentními jedinci. Restrikce probíhala při teplotě 37 °C přes noc. Vhodné podmínky pro štěpení zajistí prostředí vzniklé smícháním 2 μ l 10x koncentrovaného pufru, 1 μ l restriční endonukleázy a 7 μ l PCR vody, do kterého se přidá 10 μ l PCR produktu. K analýze PCR produktů a štěpných fragmentů se využívá gelová elektroforéza.

3.2.4. Analýza produktů PCR

Analýza produktů PCR se provádí pomocí elektroforézy. Jedná se o fyzikálně chemickou metodu dělení látek v elektrickém poli při průchodu molekulovým sítem vytvořeným polymerním gelem. Tato metoda je založena na skutečnosti, že součástí struktury DNA jsou zbytky kyseliny fosforečné, které udělují celé molekule záporný náboj, a proto se ve stejnosměrném elektrickém poli pohybují od katody (-) k anodě (+). Elektroforetická mobilita primárně závisí na velikosti molekuly a na její prostorové konformaci.

Existují dvě základní konstrukce, horizontální a vertikální, a několik druhů gelů, škrobový, agarózový, polyakrylamidový, atd. Pro detekci polymorfismu, jehož podstatou je změna počtu nukleotidů v řetězci DNA, je nejčastěji používán gel agarózový. Agaróza je lineární polymer D-galaktózy s 3, 6-anhydro-L-laktózou vzájemně spojené střídavě vazbami β -1-4 a -1-3. Během elektroforézy nejsou nukleové kyseliny v gelu vidět, proto se k nim při nanášení do jamek gelu před zahájením elektroforézy přidává vkladací (loudovací) pufr obsahující barvicí látky a látky o vysoké hustotě. Pohyblivost těchto barviv (bromfenolová modř a zelená xylencyanolová barva) v elektrickém poli zhruba signalizuje velikost DNA fragmentů, zatímco látky s vysokou hustotou (Ficol, PVP, glycerin) usnadňují nanášení vzorku do jamky gelu. Roztok, ve kterém probíhá vlastní dělení v elektroforéze, se označuje jako dělicí (elektroforetický) pufr. V naší laboratoři se běžně používá tris-acetátový elektroforetický pufr (TAE) připravený naředěním 50x zásobního roztoku (242 g Tris báze; 57.1 ml ledová kyselina octová; 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0).

Existuje několik možností zviditelnění nukleových kyselin. Nejjednodušší a nejrychlejší je použití ethidium bromidu, což je anorganická sloučenina s planární

strukturou, která se vmezeřuje mezi báze nukleové kyseliny. Po ozáření krátkovlnným ultrafialovým zářením (260 nm) emituje oranžově červené fluorescenční světlo o vlnové délce 590 nm, které je možné zachytit fotografickým zařízením.

Protokol:

1. 2 % agarózový gel připravíme přidáním 1.4 g agarózy do 70 ml elektroforetického pufru (1x TAE).
2. Roztok povaříme v mikrovlnné troubě, necháme zchladit na 60 °C a přidáme 15 µl ethidium bromidu a zamícháme.
3. Roztok nalijeme do formy na gel, upevníme hřebínek a necháme gel ztuhnout.
4. Příprava vzorku pro elektroforézu: k 50 µl reakční směsi po PCR přidáme 10 µl loudovacího pufru a vzorek promícháme (pipetováním špičkou).
5. Formu s gelem, ze které vyjmeme hřeben, vložíme do elektroforézy s elektroforetickým pufrem tak, aby jamky po hřebenu byly tímto pufrem zaplněny.
6. Špičkou nanese 20 µl z každého vzorku do jamek, do vybrané jamky nanese také DNA marker.
7. Elektroforézu připojíme ke zdroji. Doba dělení závisí na velikosti fragmentu a hustotě gelu. V našich podmínkách běžně probíhá 1 hodinu při 100 V.
8. Výsledek vyhodnotíme v UV světle.

3.3. Biochemická analýza

Abychom mohli materiál odebraný při experimentu dále analyzovat, bylo zapotřebí připravit z částí orgánů a tkání 20 % homogenáty. Jelikož se homogenáty využívají jak ke stanovení enzymové aktivity tak proteinové exprese, zvolili jsme jako homogenizační roztok 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4) doplněný o směs inhibitorů proteáz a fosfatáz (Sigma), jež zabraňují degradaci v extraktu přítomných proteinů. Produkty homogenizace jsme následně stočili v centrifuze vychlazené na 4 °C nejprve při 5500x g 15 minut, aby došlo k odstranění buněčných jader a nehomogenizovaných částí a poté znovu odebraný supernatant při 14 000x g opět 15 minut. V takto získaném supernatantu byla okamžitě změřena aktivita enzymu NOS, koncentrace proteinů a zbylý supernatant byl po alikvotních částech rozpipetován a uchován při teplotě – 80 °C.

3.3.1. Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovování koncentrace proteinů v tkáňových homogenátech lze použít několik metod např. dle Bradforda, BCA analýzu či Lowryho metodu, která je standardně využívána v naší laboratoři. Jde o vysoce senzitivní kolorimetrickou metodu, jejíž podstatou je Biuretova reakce, ve které reagují měďnaté ionty v alkalickém prostředí s peptidovou vazbou za vzniku fialově zbarvené komplexní sloučeniny. Po přidání Folinova reagensia dojde k reakci směsi anorganických solí s tyrosinovými a tryptofanovými zbytky přítomných proteinů, která dává intenzivně modrou barvu s absorbcí při 700 nm. Kombinace těchto dvou reakčních kroků zvyšuje senzitivitu této metody. Podle kalibrační křivky připravené použitím známého množství hovězího sérového albuminu jako standardu lze ze sytosti modrého zbarvení testovaného vzorku spektrofotometricky určit obsah jeho proteinů.

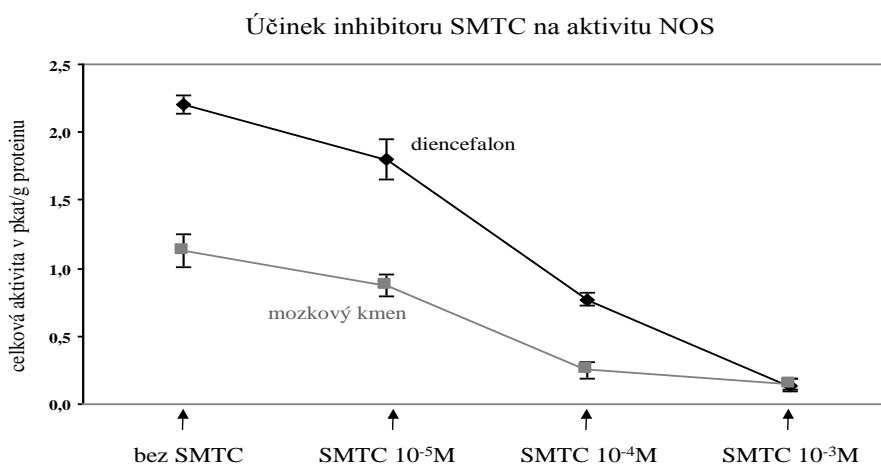
3.3.2. Měření aktivity enzymu NOS

Podstatou stanovení celkové aktivity NO syntázy v čerstvě připraveném tkáňovém homogenátu je měření radioaktivně značené aminokyseliny L-[³H] citrulinu, která vzniká přeměnou L-[³H] argininu za přítomnosti enzymu syntázy oxidu dusnatého. 50 µl supernatantu spolu s 50 µl reakční směsí (0.1 M Tris-HCl, pH 7.4; 2 mM CaCl₂; 1 mM β-NADPH; 500 µM BH₄; 10 µM FAD; 10 µM FMN; 30 nM kalmodulin; 2 µM L-arginin a 2 µl L-[³H] argininu o specifické aktivitě 1,52 TBq/mmol se inkubuje 30 minut při 37 °C. Za těchto podmínek dochází k enzymatické přeměně L-[³H] argininu na L-[³H] citrulin za vzniku NO. Poté je reakce zastavena přidáním 1 ml ledově studeného stop činidla o pH 5.5 (0.02 M HEPES; 2mM EDTA; 2 mM EGTA a 1 mM L-citrulin) a z každého vzorku je odebrán 1 ml reakčního produktu a nanesen na separační kolonku obsahující ionexovou pryskyřici Dowex 50 WX-8. Eluát je zachycen do připravené lékovky, do níž se po promytí kolonky 1 ml destilované vody přidají 2 ml scintilačního roztoku. Aktivita enzymu, respektive množství nasyntetizovaného L-[³H] citrulinu je měřeno na scintilačním spektrometru Tri Carb (Packard, UK). Enzymatická aktivita je v této práci uvedena v jednotce pikokatal přepočtené na gram proteinu (pkat/g proteinu). Hodnoty celkových aktivit enzymu NOS se mezi experimenty liší v důsledku použití izotopu o

různém stáří (rozdílné množství spontánně vytvořeného L-citrulinu). Pokud jsou srovnávány výsledky aktivit z různých experimentů, aktivity jsou přepočteny a vyjádřeny v procentech hodnot kontrolních zvířat.

Abychom mohli určit podíl neuronální isoformy na aktivitě NO syntázy v obou centrálních oblastech (diencefalon, mozkový kmen) v experimentu 2, použili jsme selektivní inhibitor pro nNOS S-methyl-L-thiocitrulin (SMTC). Potřebovali jsme otestovat, jak bude tento selektivní inhibitor blokovat aktivitu NOS v mozku. Pokus, ve kterém jsme zjišťovali závislost aktivity NOS na koncentraci SMTC, jsme provedli na třech potkanech outbredního kmene Wistar. Z každého homogenátu z diencefalonu a mozkového kmene jsme odebrali čtyřikrát po 50 μ l, z nichž k první části byla přidána reakční směs bez přítomnosti inhibitoru a k dalším třem dílům reakční směs s přídavkem jedné ze tří různých koncentrací inhibitoru (10^{-5} M, 10^{-4} M a 10^{-3} M). Celková aktivita a její následné snížení způsobené přítomností inhibitoru SMTC v obou centrálních oblastech jsou zaznamenány na obrázku 4. Jak je patrné, inhibice NOS aktivity se zvyšovala proporcionálně koncentraci SMTC. Nejvyšší koncentrace SMTC (10^{-3} M) již působila značně nespecificky a inhibovala i aktivitu ostatních isoform, jelikož se aktivita snížila v případě diencefalonu o 94 % a v mozkovém kmeni o 86 %. Na základě těchto výsledků jsme v experimentu 2 použili koncentraci inhibitoru SMTC 10^{-4} M, ve které působí ještě značně selektivně a blokuje především aktivitu neuronální isoformy.

Obr. 4 Závislost celkové aktivity NOS na koncentraci inhibitoru SMTC u potkanů kmene Wistar



SMTC – S-methyl-L-thiocitrulin

3.3.3. Stanovení proteinové exprese NOS

Proteinová exprese všech tří isoformů syntázy oxidu dusnatého byla stanovena metodou Western blot. Proteiny (70 µg) byly po tepelné denaturaci (97 °C, 5 minut) elektroforeticky separovány (200 V, 60 minut) na standardním 10 % SDS-polyakrylamidovém gelu v přítomnosti Tris-glycinového elektroforetického pufru (25 mM Tris; 250 mM glycin a 0.25 % SDS) a následně přeneseny v roztoku o složení 48 mM Tris; 39 mM glycin; 0.372 % SDS a 20 % methanol na nitrocelulóзовou membránu s pórovitostí 0.45 µm. Transfer proteinů probíhal přes noc za konstantního proudu 60 mA. V obou krocích byl použit Bio Rad systém. Nespecifická vazebná místa proteinů na membráně pak byla 6 hodin blokována 5 % roztokem nízkotučného mléka v TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 144 mM NaCl a 0.1 % Tween 20) při laboratorní teplotě. Přes noc probíhala v chladové místnosti (6 °C) inkubace membrán s polyklonálními králičími protilátkami proti nNOS (ředění 1:400, Transduction Laboratories), proti eNOS resp. proti iNOS (obě v koncentraci 1:1000, Santa Cruz) naředěnými v TBS-T s přídavkem sušeného mléka. Po vymytí nenavázaných protilátek (3x 10 minut v TBS-T) byly membrány 60 minut inkubovány při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou (IgG proti králičím protilátkám, Pierce) konjugovanou s „horseradish“ peroxidázou (ředění 1:20000 v TBS-T s mlékem). Po důkladném odmytí nenavázané protilátky v TBS-T byly imunokomplexy vizualizovány pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu (Pierce) na přístroji Fujifilm Las-1000. Optická denzita příslušných proužků byla kvantifikována denzitometrickým skenováním v programu Aida. Výsledné hodnoty proteinových expresí byly vyjádřeny v procentech hodnot kontrolních zvířat získaných v rámci jednoho měření.

3.4. Statistická analýza

Data jsou vyjádřena jako průměr ± S.E.M. Statistické rozdíly mezi dvěma kmeny byly vyhodnocovány pomocí Studentova t-testu. $P < 0.05$ hladina byla považována za statisticky signifikantní.

4. Výsledky

4.1. Experiment 1

Tento pokus byl prováděn na mladých (8 týdnů) samicích sůl-senzitivního (DS) a sůl-rezistentního (DR) kmene Dahlových potkanů, z nichž menší část z obou kmenů byla využita pro genetickou analýzu. Zvířata byla krmena peletovanou laboratorní dietou DOS-2b ST s nízkým obsahem soli (0.3 % NaCl). V pokusech týkajících se NOS byla polovina zvířat chována na nízkosolném (0.3 % NaCl) a ostatní na vysokosolném (8 % NaCl po 4 týdny) režimu. Počty zvířat ve skupině, základní hmotnostní parametry a naměřené hodnoty krevního tlaku shrnuje tabulka 5.

Tab. 5 Tělesná hmotnost (BW), relativní hmotnost srdce (HW/BW) a ledvin (KW/BW) a krevní tlak u Dahlových sůl-rezistentních (DR) a sůl-senzitivních (DS) potkanů na nízkosolné a vysokosolné dietě.

% NaCl	DR		DS	
	0.3 (n = 11)	8.0 (n = 7)	0.3 (n = 11)	8.0 (n = 7)
BW (g) →	157 ± 1	162 ± 4	174 ± 2 + **	176 ± 4 +
HW/BW (mg/100 g BW)	296 ± 3 ++	327 ± 4	304 ± 5 ++	424 ± 17 ++ ##
KW/BW (mg/100 g BW)	717 ± 18 ++	1011 ± 21	686 ± 18 ++	1169 ± 47 + ##
SBP (mm Hg)	130 ± 2	139 ± 4	144 ± 3 **	194 ± 5 ++ ##
MAP (mm Hg)	109 ± 2	116 ± 6	123 ± 3 **	156 ± 4 ++ ##
DBP (mm Hg)	85 ± 2	94 ± 6	104 ± 3 **	126 ± 5 ++ ##

Hodnoty jsou průměry ± S.E.M. 0.3 % NaCl – nízkosolná dieta, 8.0 % NaCl – vysokosolná dieta, n – počet zvířat ve skupině, SBP – systolický krevní tlak, MAP – střední arteriální tlak, DBP – diastolický krevní tlak

+ p < 0.05, ++ p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči DR na 8 % NaCl

** p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči DR na 0.3 % NaCl

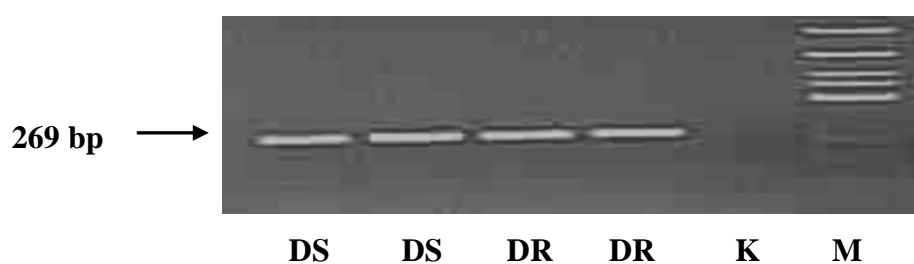
p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči DS na 0.3 % NaCl

Zatímco u Dahlových sůl-rezistentních jedinců zvýšený příjem soli potravou neovlivnil hladinu krevního tlaku, Dahlovi sůl-senzitivní potkani měli již na nízkosolné dietě signifikantně vyšší bazální hodnoty krevního tlaku nežli DR (0.3 % NaCl) jedinci a 8 % NaCl v potravě tento vzestup ještě zvýšil. Vysokosolná dieta u obou kmenů vedla ke značnému nárůstu relativní hmotnosti jak srdce, tak ledvinného parenchymu. V případě DS (8 % NaCl) zvířat můžeme mluvit o mohutné srdeční hypertrofii, která provázela rozvoj solné hypertenze.

4.1.1. Hledání polymorfismu mezi Dahlovými sůl-senzitivními a sůl-rezistentními jedinci v genu pro *iNos*

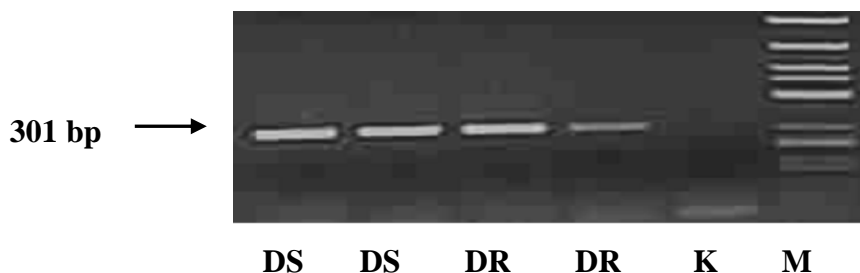
Za tímto účelem jsme použili tři páry primerů, z nichž každý vymezoval jiný úsek genu pro inducibilní isoformu NO syntázy, a s vyizolovanou genomovou DNA z DR a DS jedinců (n = 4) jsme provedli PCR. Jako první jsme otestovali primer označený *D10Mco39*. Namnožený produkt o délce 269 bp byl shodný u obou genotypů (obr. 5) a tento výsledek potvrdila i citlivější metoda SSCP.

Obr. 5 PCR analýza genomové DNA při použití specifického páru primerů pro *iNOS* *D10Mco39*. Na 2 % agarosovém gelu lze detekovat PCR produkty shodné velikosti u obou testovaných skupin. M – hmotnostní marker, K – negativní kontrola



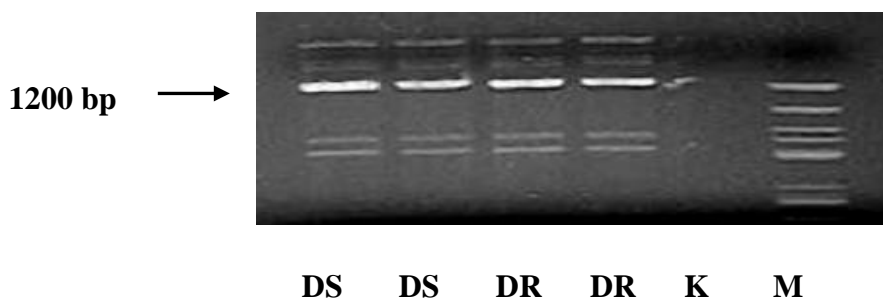
Polymorfismus mezi sůl-senzitivními a sůl-rezistentními Dahlovými potkany nebyl nalezen ani v úseku genu vymezeném satelitním markerem *D10Mco40* (obr. 6).

Obr. 6 PCR produkty satelitního markeru *D10Mco40* analyzované na 2 % agarosovém gelu. *M* – hmotnostní marker, *K* – negativní kontrola



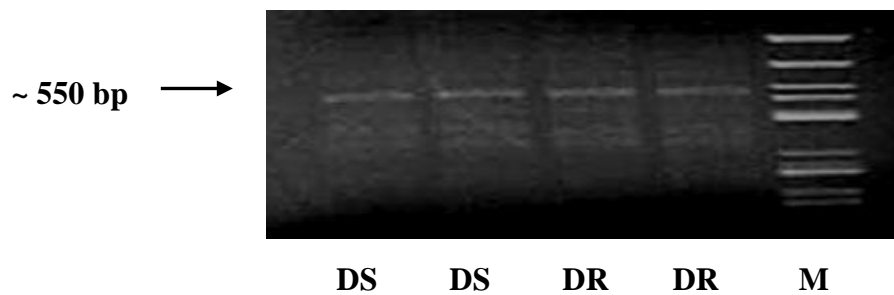
Abychom zjistili, zda pražská kolonie Dahlových potkanů založená ve Fyziologickém ústavu AV ČR v roce 1987, kdy Dr. J. P. Rapp poskytl ústavu několik chovných párů (Toledo, USA), je geneticky totožná s kolonií pocházející z Harlanu (USA), použili jsme postup shodný jako v práci Chena a Sanderse (1998). Při použití páru specifických primerů nazvaných *NOS 2* jsme získali kromě řady jiných fragmentů i úsek o délce ~ 1200 bp, který byl shodný pro oba genotypy (obr. 7).

Obr. 7 PCR produkty genu pro *iNos* vyzualizované na 2 % agarosovém gelu. *M* – hmotnostní marker, *K* – negativní kontrola



Následné restrikční štěpení PCR produktů endonukleázou *PleI* však nepotvrdilo přítomnost žádného polymorfismu ani v tomto úseku genu pro *iNos* mezi sůl-senzitivními a sůl-rezistentními Dahlovými potkany (obr. 8).

Obr. 8 *Fragmenty vzniklé restrikčním štěpením endonukleázou PleI v předchozím kroku získaných PCR produktů. Přítomnost polymorfismu v genu pro iNos mezi DR a DS kmenem nebyla potvrzena. M – hmotnostní marker*

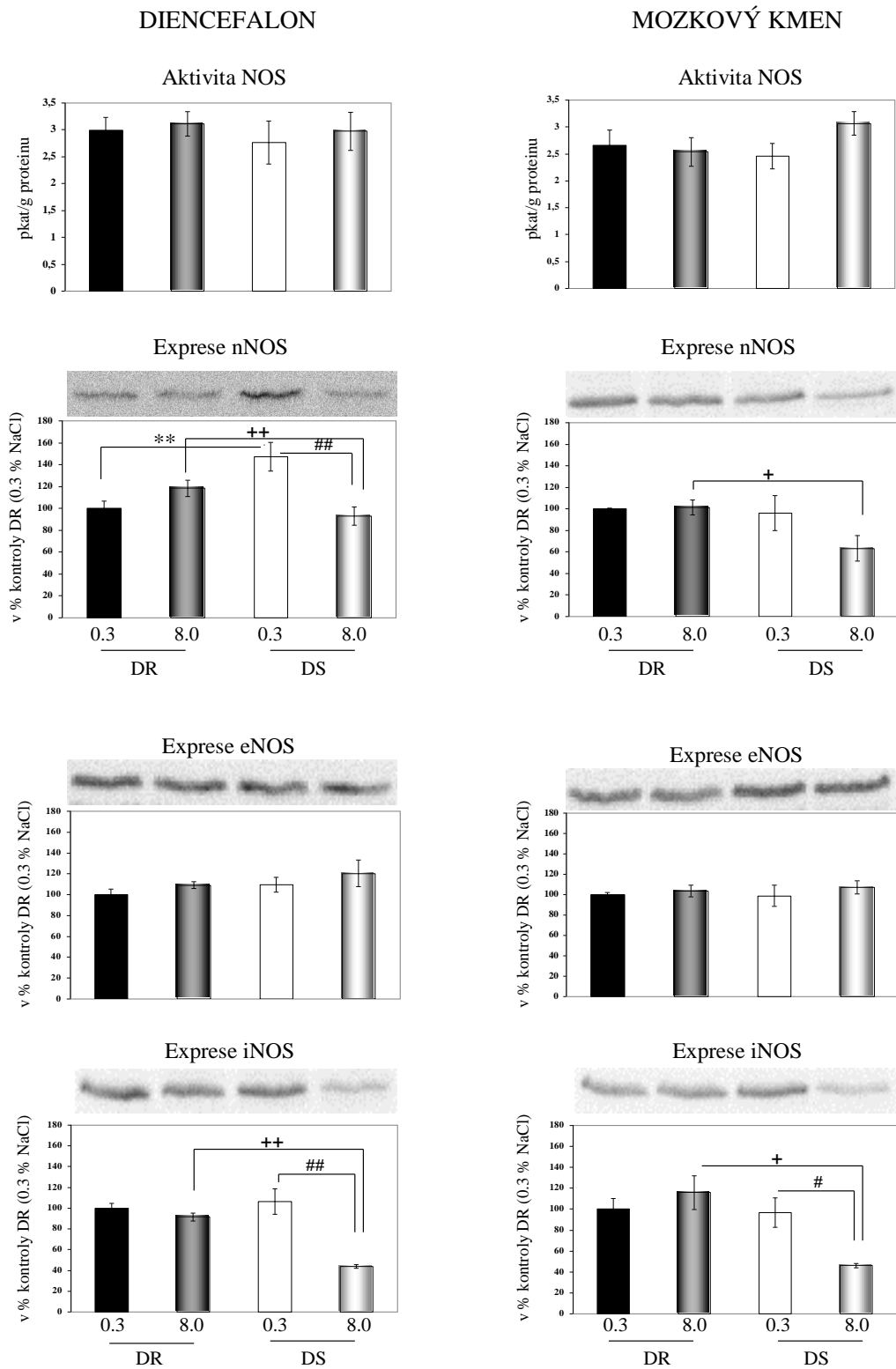


4.1.2. Aktivita NOS a exprese isoform NOS u solné hypertenze

Proteinová exprese všech tří isoform NOS v obou mozkových oblastech vykazovala podobný trend (obr. 9). Jak v případě neuronální isoformy, tak i u inducibilní isoformy solí obohacená dieta způsobila u DS kmene významný pokles proteinové exprese v porovnání s DR (8 % NaCl) jedinci. Rozdíly naměřených hodnot exprese nNOS a iNOS mezi DS (0.3 % NaCl) a DS (8 % NaCl) byly taktéž signifikantní s výjimkou výsledku získaného při stanovování nNOS v mozkovém kmeni, kde byl tento rozdíl sice výrazný, avšak nesignifikantní. Exprese endoteliální isoformy NOS zůstala i pod vlivem soli v obou částech CNS beze změny. Minimální rozdíly mezi experimentálními skupinami byly také zjištěny v naměřených hodnotách celkové aktivity enzymu NO syntázy v mozku.

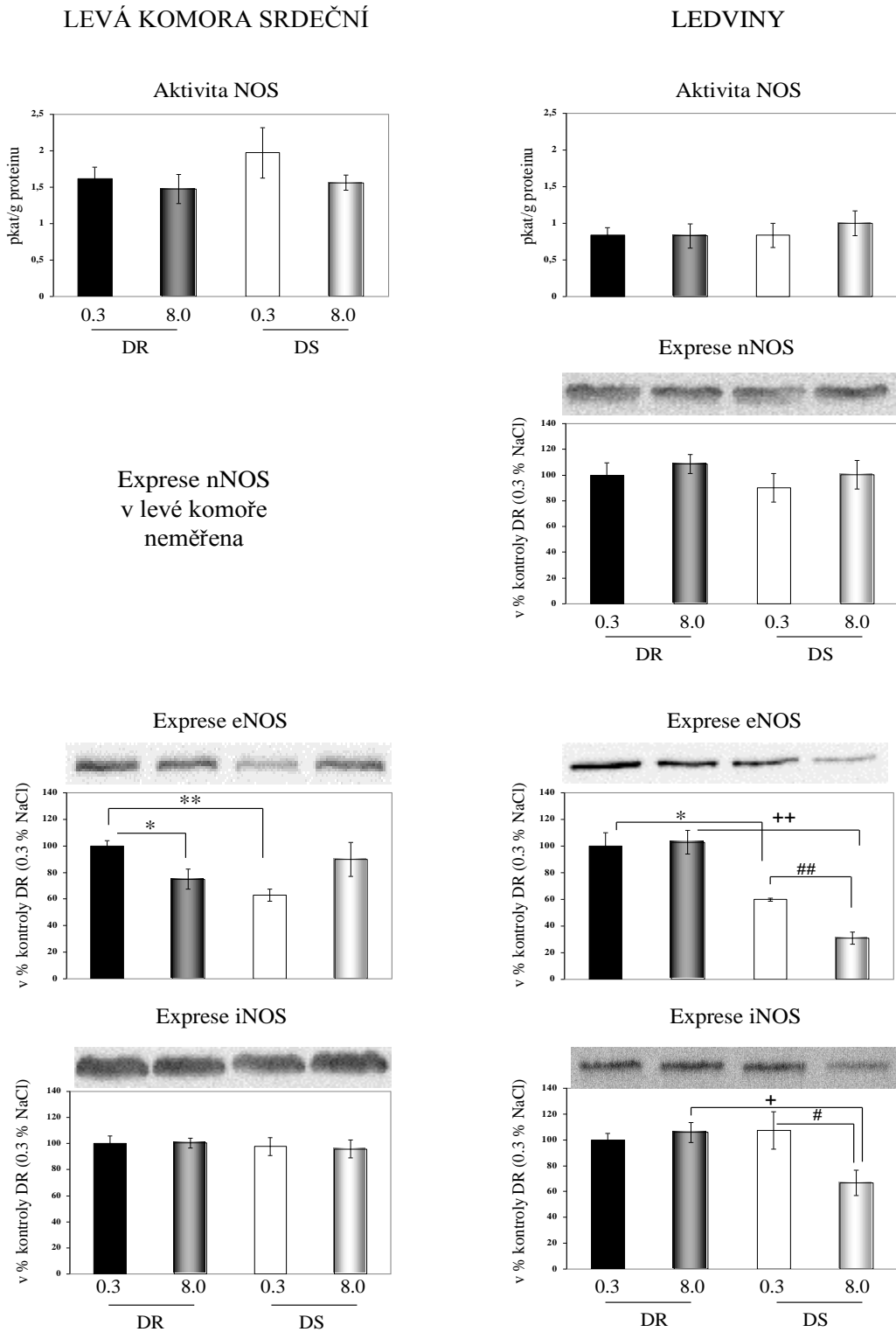
Z periferních orgánů jsme analyzovali levou srdeční komoru a ledvinu (obr. 10). Zatímco exprese iNOS v srdeční tkáni byla nezměněna, exprese eNOS byla v levé srdeční komoře za podmínek nízkého příjmu soli vyšší u DR nežli u DS potkanů. Tento rozdíl vymizel na vysokosolné dietě, která snížila expresi u DR, zatímco u DS jedinců nastalo nesignifikantní zvýšení. Exprese neuronální isoformy v ledvině nezávisela na genotypu ani na příjmu soli. Naproti tomu exprese zbylých dvou isoform (eNOS, iNOS) byly u modelu solné hypertenze (DS 8 % NaCl) signifikantně sniženy v porovnání s jedinci téhož kmene na nízkosolném režimu a také vůči DR (8 % NaCl). Exprese endoteliální isoformy byla snížena u sůl senzitivních jedinců již na nízkosolné dietě a vysoký příjem soli toto snížení ještě více zvýraznil. Změny proteinové exprese však nedoprovázely změny v enzymatické aktivitě.

Obř. 9 Celková aktivita NOS a proteinové exprese všech třĩ isoform NOS u Dahlových sůl-senzitivních (DS) a sůl-rezistentních (DR) potkanů v oblasti diencefalonu a mozkového kmene. Počty zvířat ve skupinách jsou uvedeny v tab. 5.



** $p < 0.01$ vs. DR (0.3 % NaCl), + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs. DR (8 % NaCl), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. DS (0.3 % NaCl)

Obr. 10 Celková aktivita NOS a proteinové exprese všech tří isoform NOS u Dahlových sůl-senzitivních (DS) a sůl-rezistentních potkanů (DR) v levé komoře a ledvině. Počty zvířat ve skupinách jsou uvedeny v tab. 5.



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. DR (0.3 % NaCl), + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs. DR (8 % NaCl), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. DS (0.3 % NaCl)

4.2. Experiment 2

4.2.1. NO syntáza při rozvoji spontánní hypertenze v mládí

Experimentální skupinu tvořili 12-ti týdenní samci kmene SHR spolu s normotenzními kontrolami kmene WKY. Polovina jedinců z každého kmene dostávala od 4. týdne věku ACE inhibitor kaptopril (100 mg/kg/den) v pitné vodě. Počty zvířat ve skupině, základní hmotnostní parametry a naměřené hodnoty krevního tlaku shrnuje tabulka 6. Tak jak jsme předpokládali, nejvyšší systolický krevní tlak jsme naměřili u skupiny SHR, zatímco chronická léčba kaptoprilem u těchto zvířat způsobila pokles krevního tlaku na kontrolní hodnoty. Tento ACE inhibitor dále velice významně snížil hmotnost těla a relativní hmotnost srdce (omezil rozvoj srdeční hypertrofie) u potkanů kmene SHR. Antihypertenzivní léčba u kontrolního kmene výrazně redukovala (s výjimkou relativní hmotnosti ledvin a systolického tlaku) všechny námi sledované parametry – střední arteriální a diastolický tlak, hmotnost těla i relativní hmotnost srdce v porovnání s neléčenými jedinci.

Tab. 6 Tělesná hmotnost (BW), relativní hmotnost srdce (HW/BW) a ledvin (KW/BW) a krevní tlak u mladých Wistar-Kyoto potkanů (WKY), spontánně hypertenzních potkanů (SHR), WKY léčených kaptoprilem (WKY+K) a SHR léčených kaptoprilem (SHR+K).

	WKY (n = 9)	WKY+K (n = 8)	SHR (n = 9)	SHR+K (n = 9)
BW (g)	271 ± 5	232 ± 11**	255 ± 7 *	221 ± 8 ** ##
HW/BW (mg/100 g BW)	253 ± 2	230 ± 6 **	337 ± 6 **	274 ± 4 ** ++ ##
KW/BW (mg/100 g BW)	746 ± 8	782 ± 9 *	733 ± 8	730 ± 16 +
SBP (mm Hg)	138 ± 5	131 ± 7	187 ± 6 **	128 ± 9 ##
MAP (mm Hg)	102 ± 4	78 ± 4 **	143 ± 5 **	91 ± 7 ##
DBP (mm Hg)	81 ± 4	61 ± 5 **	109 ± 5 **	68 ± 6 ##

Hodnoty jsou průměry ± S.E.M. n – počet zvířat ve skupině, SBP – systolický krevní tlak, MAP – střední arteriální tlak, DBP – diastolický krevní tlak

* p < 0.05, ** p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči WKY

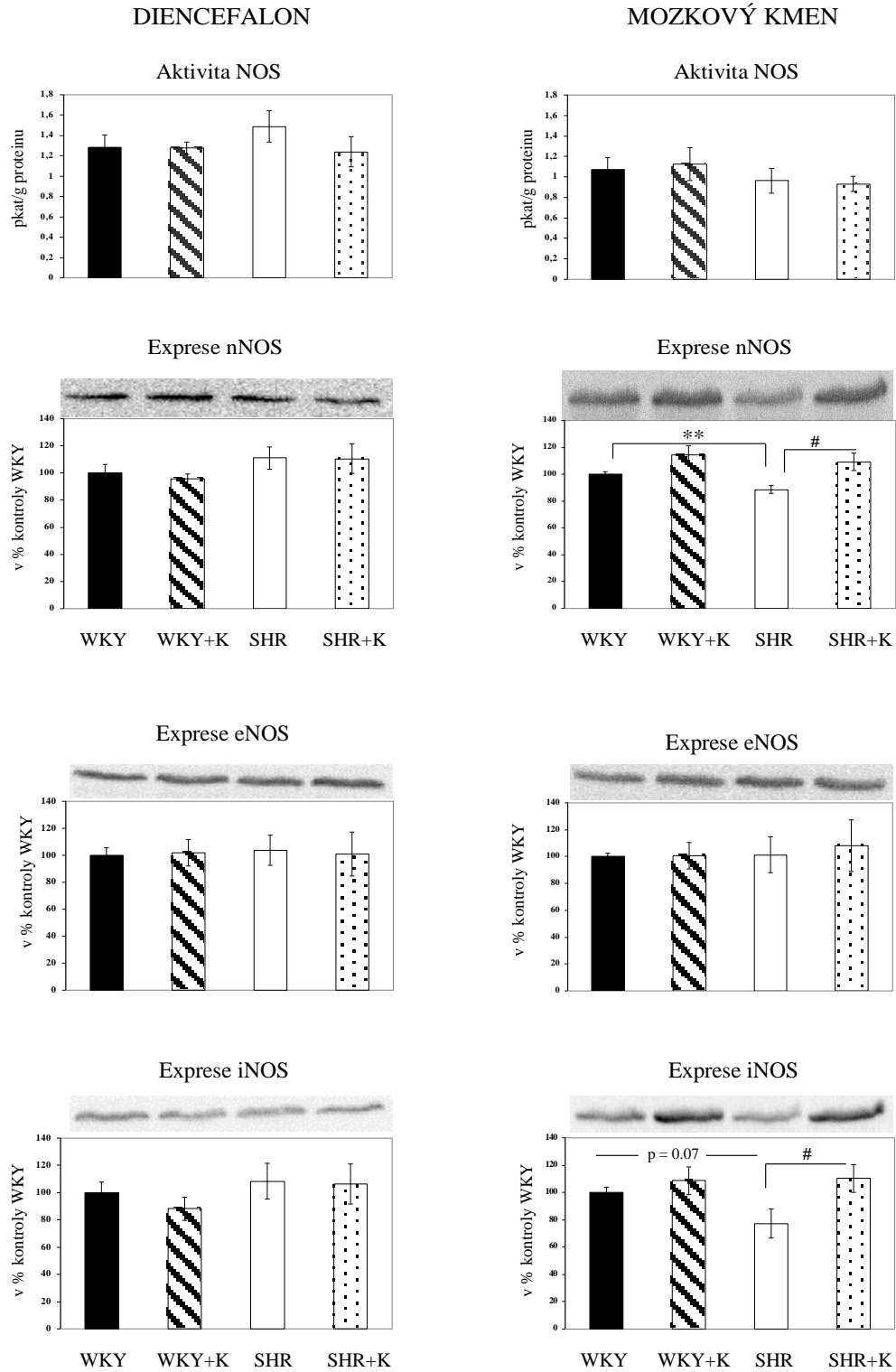
p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči SHR

+ p < 0.05, ++ p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči WKY+K

V centrálním nervovém systému jsme blíže analyzovali tvorbu NO ve dvou oblastech – v diencefalonu a mozgovém kmeni. Jak v případě enzymatické aktivity tak také v proteinových expresích nebyly v diencefalonu zaznamenány žádné významné rozdíly mezi testovanými skupinami ani u jedné z isoform (obr. 11). Jinak tomu bylo v mozgovém kmeni, kde byla u SHR potkanů naměřena signifikantně snížená exprese nNOS v porovnání s kontrolou WKY, zatímco dlouhodobé podávání kaptoprilu expresi nNOS jak u normotenzních tak i u hypertenzních jedinců stimulovalo. V případě SHR+K došlo k významnému zvýšení této exprese v porovnání s neléčenými jedinci. Expese endoteliální isoformy byla shodná ve všech čtyřech skupinách, kdežto značné rozdíly jsme získali po změření exprese indukibilní isoformy. Ta se vyznačovala signifikantním vzestupem exprese u potkanů kmene SHR na antihypertenzivní léčbě v porovnání s neléčenou skupinou, u které byla naopak výrazná tendence ($p = 0.07$) k poklesu exprese oproti kontrolní skupině WKY.

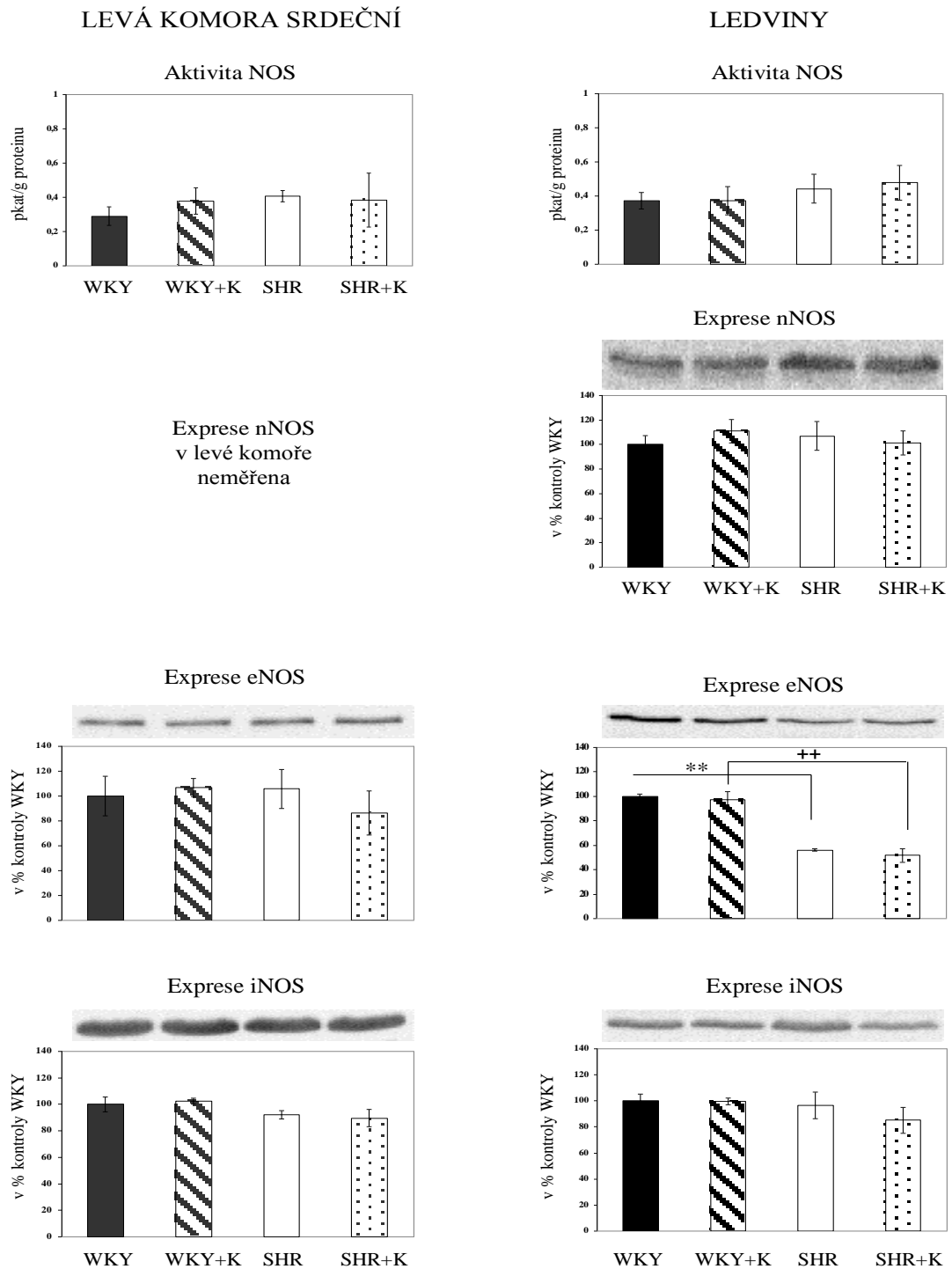
Ani námi analyzované periferní orgány (levá srdeční komora, ledviny) nevykazovaly žádné rozdíly v enzymatické aktivitě NOS mezi experimentálními skupinami (obr. 12). V srdeční tkáni se nelišila exprese endoteliální a indukibilní isoformy NOS mezi normotenzní a hypertenzní skupinou a ani podávání kaptoprilu expresi neovlivnilo. Expese neuronální isoformy nebyla stanovovaná. Naproti tomu v ledvinném parenchymu jsme zjistili signifikantně významný pokles exprese eNOS u spontánně hypertenzních jedinců bez ohledu na to, zda byli či nebyli po 6 týdnů léčeni ACE inhibitorem kaptoprilem. V případě exprese nNOS jsme v ledvinách nepotvrdili předchozí domněnku o odlišné expresi tohoto enzymu mezi kontrolními a hypertenzními potkany. Shodné hodnoty exprese ve všech čtyřech skupinách jsme získali i po inkubaci s protilátkou proti iNOS.

Obr. 11 Celková aktivita NOS a proteinové exprese všech tří isoform NOS v diencefalonu a mozkovém kmeni u mladých potkanů kmene Wistar-Kyoto (WKY), spontánně hypertenzních potkanů (SHR), potkanů WKY léčených kaptoprilem (WKY+K) a SHR potkanů léčených kaptoprilem (SHR+K). Počty zvířat ve skupinách jsou uvedeny v tab. 6.



** $p < 0.01$ vs. WKY, # $p < 0.05$ vs. SHR

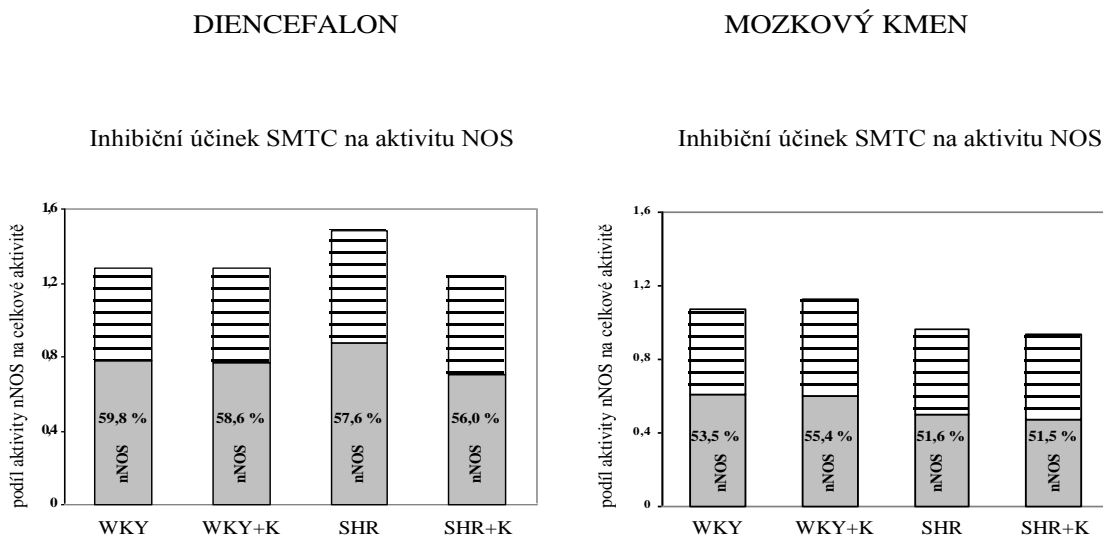
Obr. 12 Celková aktivita NOS a proteinové exprese všech tří isoform NOS v levé komoře a ledvině u mladých potkanů kmene Wistar-Kyoto (WKY), spontánně hypertenzních potkanů (SHR), u potkanů WKY léčených kaptoprilem (WKY+K) a u SHR potkanů léčených kaptoprilem (SHR+K). Počty zvířat ve skupinách jsou uvedeny v tab. 6.



** $p < 0.01$ vs. WKY, ++ $p < 0.05$ vs. WKY+K

V tomto experimentu jsme současně měřili nejen celkovou aktivitu NOS v centrálních strukturách, ale také aktivitu po přidání specifického inhibitoru neuronální isoformy SMTC, abychom získali představu, jaký podíl z celkové aktivity připadá na tuto isoformu NOS (obr. 13). Jak v diencefalonu, tak také v mozkovém kmeni, jsme nenalezli žádné rozdíly v celkových aktivitách mezi hypertenzní (SHR) a normotenzní (WKY) skupinou a ani chronická léčba kaptoprilem žádným způsobem enzymatickou aktivitu neovlivnila. Zjistili jsme ale, že aktivita NO syntázy je v diencefalonu všeobecně vyšší oproti aktivitě v mozkovém kmeni a že po zainhibování činnosti neuronální isoformy pomocí SMTC v koncentraci 10^{-4} M dojde v průměru k 58 % poklesu aktivity v diencefalonu a k 53 % poklesu aktivity v mozkovém kmeni. Tento pokles aktivity odpovídá podílu nNOS; zatímco zbylých v průměru 42 % v diencefalonu, respektive 47 % v mozkovém kmeni představuje součet aktivit endoteliální a inducibilní isoformy. Koncentraci inhibitoru SMTC 10^{-4} M s maximální selektivitou k neuronální isoformě jsme zvolili na základě předchozího testování (viz. str. 44).

Obr. 13 Podíl aktivity neuronální isoformy NOS na celkové aktivitě u potkanů kmene Wistar-Kyoto (WKY), spontánně hypertenzních potkanů (SHR), u WKY léčených kaptoprilem (WKY+K) a u SHR léčených kaptoprilem (SHR+K). Počty zvířat ve skupinách jsou uvedeny v tab. 6.



SMTC (S-methyl-L-thiocitrulin) – inhibitor nNOS v koncentraci 10^{-4} M

■ - podíl aktivity neuronální isoformy na celkové aktivitě

4.2.2. NO syntáza u jedinců s rozvinutou spontánní hypertenzí

Skupinu dospělých zvířat tvořili opět samci kmene SHR a WKY, z nichž pouze část spontánně hypertenzních potkanů byla od 24. týdne věku léčena ACE inhibitorem kaptoprilem (100 mg/kg/den) rozpuštěným v pitné vodě. Analýza proběhla ve 30. týdnu věku a naměřené hodnoty TK, základní hmotnostní parametry a počty zvířat ve skupině jsou uvedeny v tabulce 7. U dospělých potkanů kmene SHR byl naměřený signifikantně vyšší bazální krevní tlak v porovnání jak s kontrolními jedinci kmene WKY, tak i s SHR potkany léčenými kaptoprilem. Vysoký TK v této skupině byl doprovázen vyšší relativní hmotností srdce i ledvinné tkáně. Chronická antihypertenzivní léčba částečně redukovala krevní tlak a hmotnost srdce, avšak ne až na kontrolní úroveň WKY.

Tab. 7 Tělesná hmotnost (BW), relativní hmotnost srdce (HW/BW) a ledvin (KW/BW) a krevní tlak u dospělých Wistar-Kyoto potkanů (WKY), spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a SHR léčených kaptoprilem (SHR+K).

	WKY (n = 8)	SHR (n = 8)	SHR+K (n = 6)
BW (g)	439 ± 7	356 ± 4 **	354 ± 2 **
HW/BW (mg/100 g BW)	232 ± 3	373 ± 3 **	302 ± 3 ** ##
KW/BW (mg/100 g BW)	649 ± 12	720 ± 13 **	747 ± 11 **
SBP (mm Hg)	131 ± 2	246 ± 3 **	182 ± 7 ** ##
MAP (mm Hg)	110 ± 2	208 ± 4 **	151 ± 4 ** ##
DBP (mm Hg)	92 ± 2	175 ± 6 **	127 ± 4 ** ##

Hodnoty jsou průměry ± S.E.M. n – počet zvířat ve skupině, SBP – systolický krevní tlak, MAP – střední arteriální tlak, DBP – diastolický krevní tlak

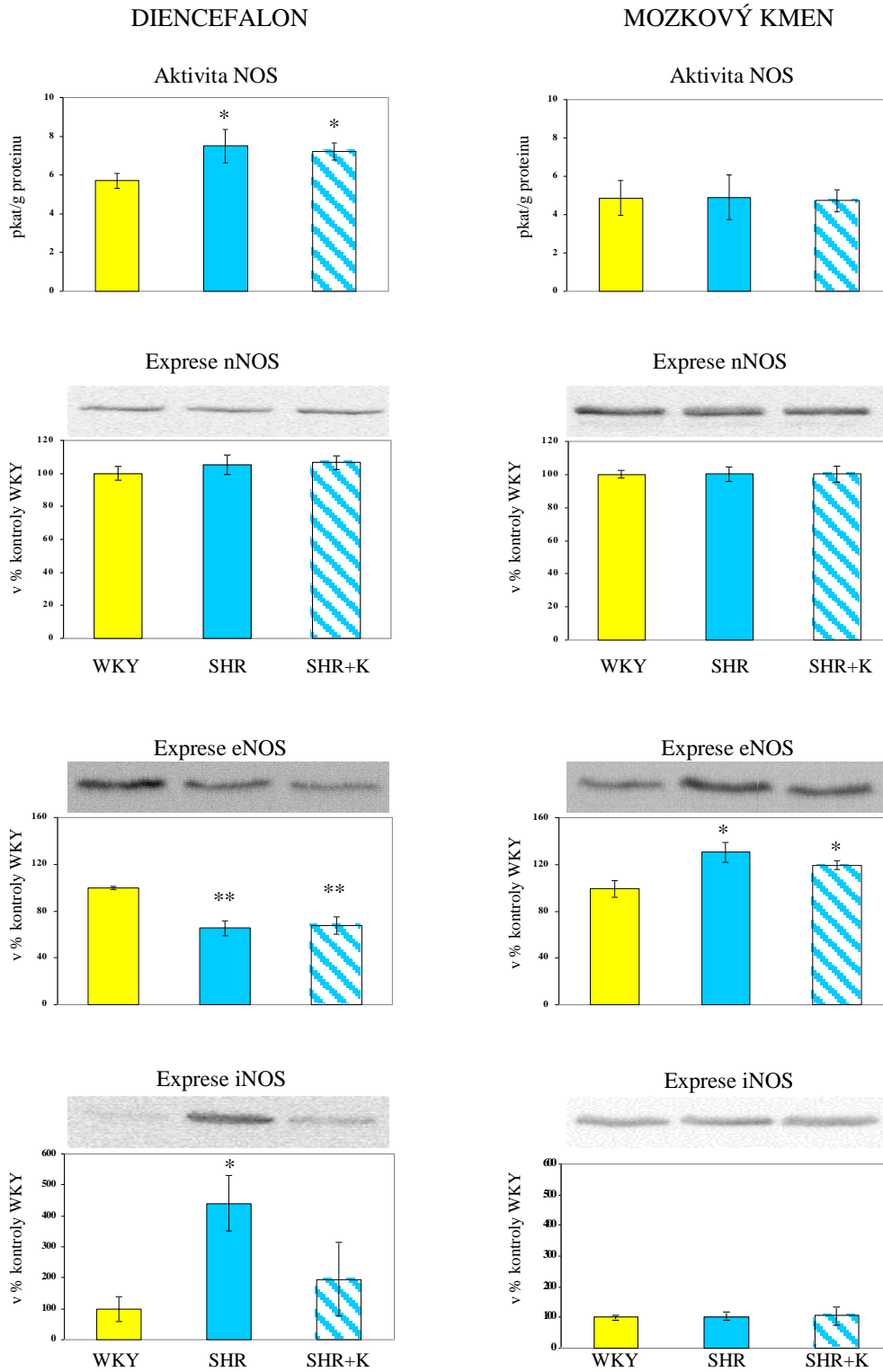
* p < 0.05, ** p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči WKY

p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči SHR

Proteinová exprese neuronální NOS se v obou studovaných oblastech mozku u potkanů kmene SHR a WKY shodovala (obr. 14). Naopak exprese endoteliální isoformy byla u SHR potkanů v diencefalonu signifikantně snižena a v mozkovém kmeni signifikantně zvýšená oproti kontrolním jedincům. Zatímco aktivita NOS byla v mozkovém kmeni nezměněna, v diencefalonu izolovaném z SHR potkanů byla enzymatická aktivita významně vyšší oproti WKY. Příčinou tohoto zvýšení by mohla být značná stimulace exprese iNOS u hypertenzního kmene v porovnání s WKY.

Chronická léčba kaptopilem u dospělých SHR potkanů neovlivnila signifikantně ani aktivitu NOS ani proteinovou expresi žádné z isoform stanovených v CNS. Pouze v případě exprese iNOS v diencefalonu a eNOS v mozkovém kmeni byla tendence ke snížení v důsledku antihypertenzivní léčby u SHR v porovnání s neléčenými jedinci téhož kmene.

Obř. 14 Celková aktivita NOS a proteinové exprese vřech tři isoform NOS v diencefalonu a mozkovém kmeni u dospělých potkanů kmene Wistar-Kyoto (WKY), spontánne hypertenzních potkanů (SHR) a u SHR potkanů léčených kaptoprilem (SHR+K). Počty zvrat ve skupinách jsou uvedeny v tab. 7.



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WKY

4.3. Experiment 3

4.3.1. NO u genetického modelu metabolického syndromu

Velice vhodným modelem pro studium nejen hypertriglyceridémie ale také dalších symptomů metabolického syndromu (hypertenze, diabetes aj.) je Pražský hereditárně hypertriglyceridemický potkan (HTG). V experimentu jsme použili 16-ti týdenní samce tohoto kmene a k nim jako kontrolu zvířata z outbredního kmene Wistar (WIS). Naměřené hodnoty TK, základní hmotnostní parametry a počty zvířat ve skupině shrnuje tabulka 8. Dospělí HTG jedinci se oproti Wistar potkanům vyznačují nejen vysokou hladinou sérových triglyceridů (Kadlecová a kol., 2004), ale také spontánně vyvinutou hypertenzí. Tomu odpovídal i systolický krevní tlak, který byl u HTG potkanů signifikantně vyšší v porovnání s kontrolou, zatímco relativní váha ledvin byla významně snížena. Tělesná hmotnost a ani relativní hmotnost srdce se mezi kmeny nelišily.

Tab. 8 Tělesná hmotnost (BW), relativní hmotnost srdce (HW/BW) a ledvin (KW/BW) a krevní tlak u dospělých potkanů kmene Wistar (WIS) a u Pražských hereditárně hypertriglyceridemických (HTG) potkanů.

	WIS (n = 8)	HTG (n = 8)
BW (g)	321 ± 22	294 ± 14
HW/BW (mg/100 g BW)	248 ± 9	233 ± 2
KW/BW (mg/100 g BW)	704 ± 26	537 ± 14 **
SBP (mm Hg)	128 ± 5	162 ± 8 **
MAP (mm Hg)	110 ± 4	135 ± 6 *
DBP (mm Hg)	94 ± 3	115 ± 5 **

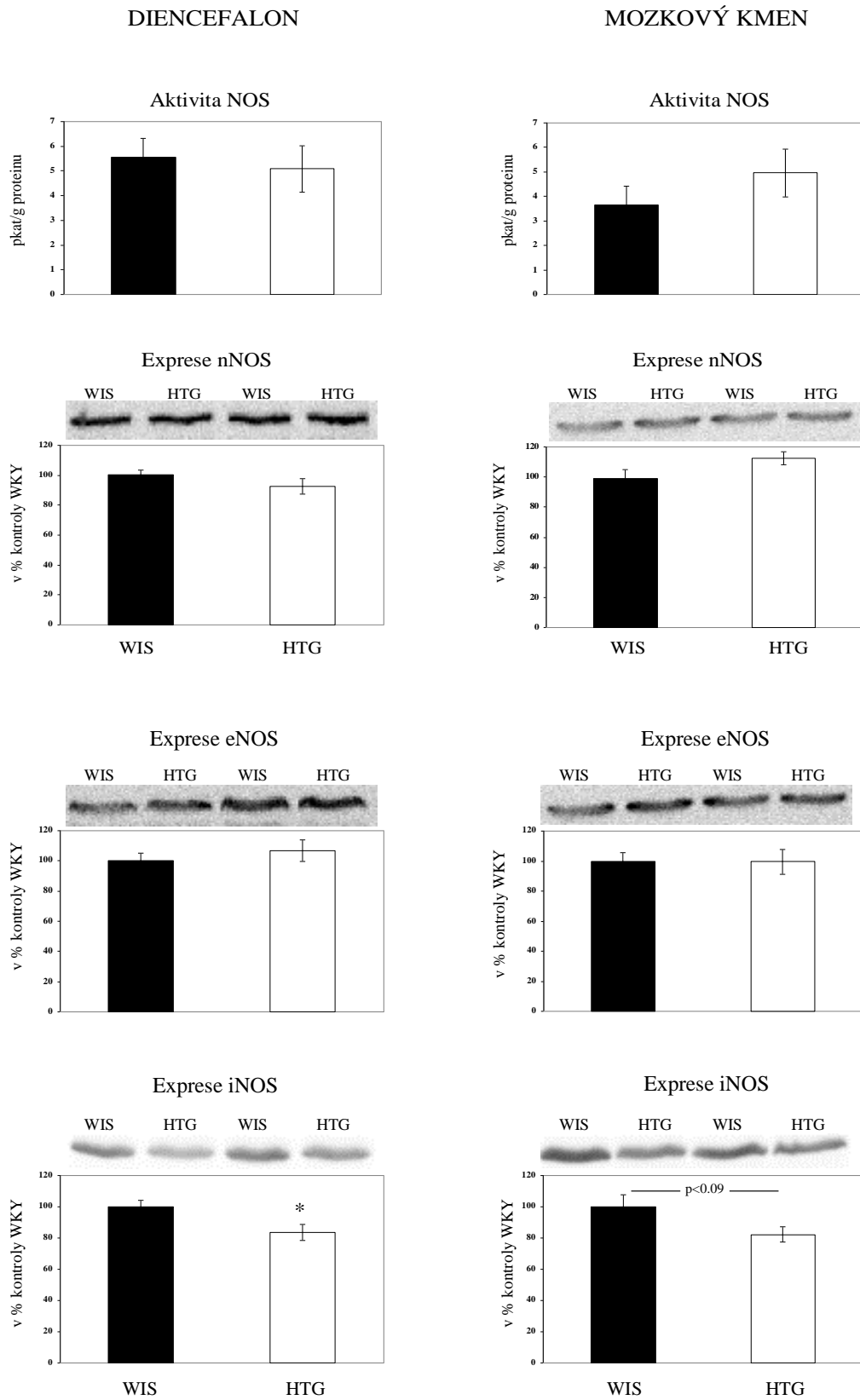
Hodnoty jsou průměry ± S.E.M. n – počet zvířat ve skupině, SBP – systolický krevní tlak, MAP – střední arteriální tlak, DBP – diastolický krevní tlak

* p < 0.05, ** p < 0.01 signifikantní rozdíl vůči WIS

U tohoto modelu metabolického syndromu jsme opět měřili jak celkovou aktivitu NOS, tak také proteinové exprese všech tří isoform v centrálních oblastech (diencefalon a mozkový kmen) a dvou periferních orgánech (srdce, ledviny). V CNS (obr. 17) se nejvýraznější rozdíly mezi HTG a WIS potkany objevily v expresi indukibilní isoformy, jejíž pokles byl u potkanů kmene HTG významný v obou studovaných mozkových strukturách (v diencefalonu dokonce signifikantně). V enzymatické aktivitě a ani v expresích dalších dvou isoform (nNOS, eNOS) nebyly zaznamenány žádné další změny.

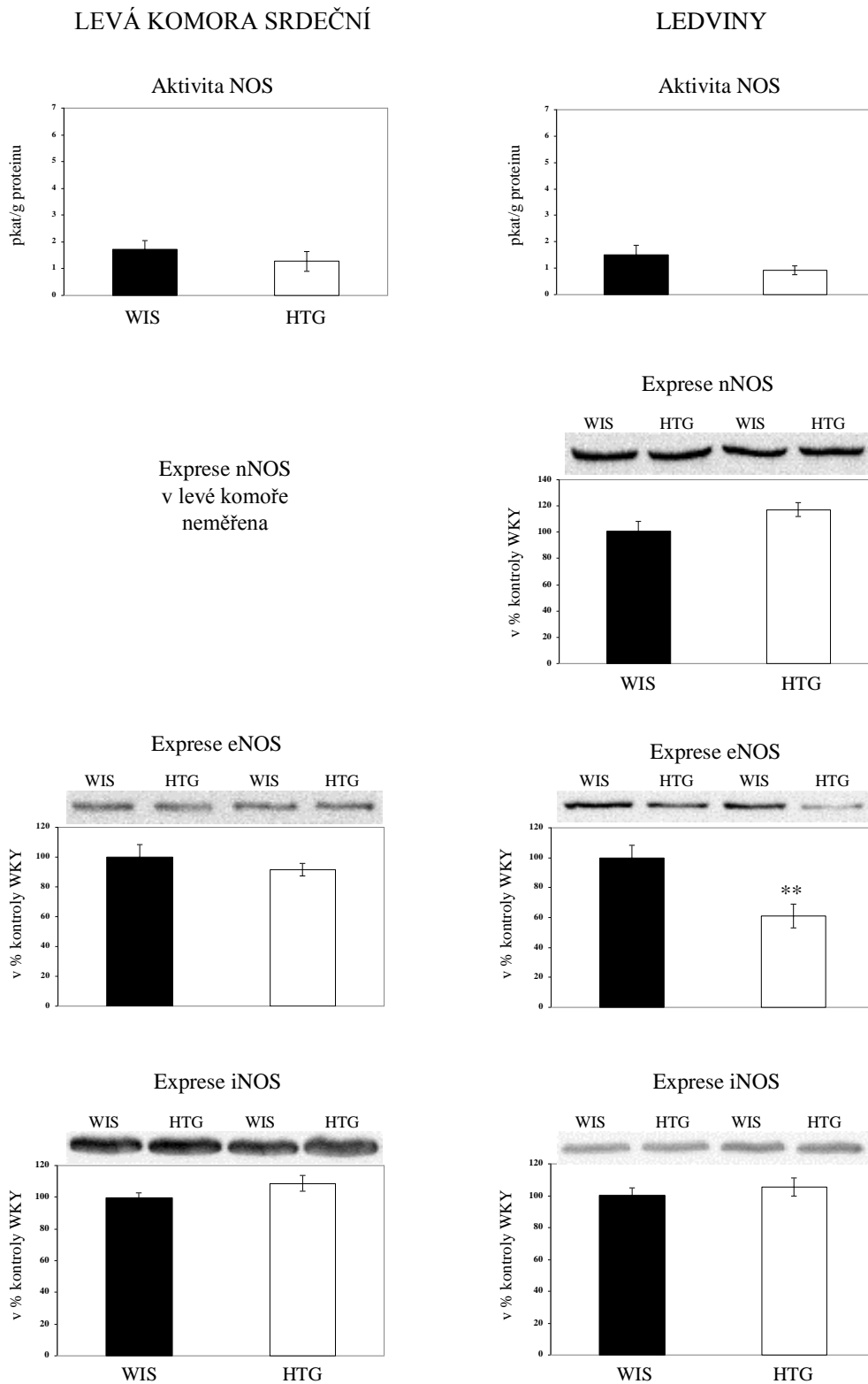
Tak jako se jednotlivé komponenty centrálního systému oxidu dusnatého a jejich aktivita příliš nelišily u HTG potkanů od kontrolního kmene Wistar, tak ani v periferních orgánech se neobjevily výrazné rozdíly ve stanovovaných parametrech systému NO (obr. 18). V srdeční i ledvinné tkáni dosahovaly u HTG potkanů hodnoty aktivity a expresí isoform NOS kontrolní úrovně. Výjimku představovaly homogenáty připravené z ledvin HTG potkanů, ve kterých byla nalezena signifikantně snížená exprese endoteliální NOS oproti kontrole z kmene Wistar.

Obr. 17 Celková aktivita NOS a proteinové exprese všech tří isoform NOS v diencefalonu a mozkovém kmeni u hypertriglyceridemických potkanů (HTG) a u potkanů kmene Wistar (WIS). Počty zvířat ve skupině je uveden v tab. 8.



* $p < 0.05$ vs. WIS

Obř. 18 Celková aktivita a proteinové exprese vřech tře isoform NOS v srdci a ledvinách u hypertriglyceridemických potkanů (HTG) a u potkanů kmene Wistar (WIS). Počty zvřrat ve skupině je uveden v tab. 8.



** $p < 0.01$ vs. WIS

5. Diskuse

Nerovnováha mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními systémy ovlivňující tonus odporových cév je jedním z charakteristických znaků hypertenze. Od doby, kdy byl objeven endoteliální relaxační faktor a rozpoznán jako oxid dusnatý, bylo provedeno značné množství experimentů odhalujících zhoršenou schopnost cév relaxovat a to jak u lidské esenciální hypertenze, tak také u potkanů s genetickou hypertenzí (Noll a kol., 1997, Vanhoutte, 1999). Oxid dusnatý je krátce žijící radikál (jeho tvorbu katalyzuje enzym syntáza oxidu dusnatého - NOS), který je v organismu zapojen nejen do mechanismu vazodilatace, ale také do celé řady dalších dějů jako je např. neurotransmise a buněčná toxicita. Předmětem této disertační práce bylo vysledovat, jaké změny na úrovni genu, proteinové exprese a celkové aktivity jednotlivých isoenzymů NOS doprovázejí rozvoj a napomáhají udržení geneticky podmíněné hypertenze u různých zvířecích modelů (Dahl, SHR, HTG).

5.1. Genetická analýza genu *iNos* u Dahlových potkanů z pražské kolonie

Dahlovi sůl-senzitivní a sůl-rezistentní potkani byli začátkem 60. let minulého století vyšlechtěni jako model sloužící ke studiu na soli závislé hypertenze (Dahl a kol., 1963) a nyní patří mezi nejpoužívanější experimentální model k hledání genetických determinant sůl-senzitivity. Mezi sůl-senzitivními a sůl-rezistentními Dahlovými potkany byly nalezeny polymorfismy v genu pro *iNos* (Deng a Rapp, 1995, Chen a kol., 1998), jejichž přítomnost jsme se pokusili potvrdit u naší kolonie Dahlových potkanů chovaných ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Přestože jsme pro genetickou analýzu použili shodné primery i PCR podmínky jako zmínění autoři, žádný polymorfismus jsme v tomto genu mezi DS a DR jedinci z pražské kolonie nenalezli (Hojná a kol., 2003). Jedním z možných vysvětlení takto odlišných výsledků může být genetická kontaminace Dahlových potkanů pocházejících z chovu v Harlanu, ke které došlo počátkem 90. let minulého století (St. Lezin a kol., 1994, Lewis a kol., 1994). Tato zvířecí kolonie byla pak opět obnovena z původních chovných párů, ale tyto „noví“ Dahlovi potkani z Harlanu se liší v několika fenotypových znacích (hmotnost těla, úmrtnost, tlaková odpověď na vysoký příjem soli) od původního inbredního kmene vyšlechtěného prof. Rappem (Walder a kol., 1996). Je tedy

pravděpodobné, že u tohoto nově ustanoveného kmene Dahlových potkanů z Harlanu došlo ke genetickým změnám, které byly později zafixovány. K takovému vysvětlení napomáhají i naše výsledky genetické analýzy, které potvrdily domněnku, že pražská inbrední kolonie Dahlových potkanů založená v roce 1987 z několika chovných párů věnovaných prof. Rappem (Toledo, OH) se v rámci genu *iNos* chová jako původní kolonie Dahlových potkanů z Brookhavenu. Nepřítomnost polymorfismu v tomto genu u našich sůl-senzitivních jedinců nemusí představovat významný problém, jelikož pozdější genetické analýzy provedené u kongenního kmene, v jehož genotypu byla odstraněna malá oblast chromozomu obsahující *iNos* gen, lokalizovala tento gen na chromozomu 10 mimo oblast QTL pro krevní tlak (Dukhanina a kol., 1997, Garrett a kol., 2001). Náš neúspěch při hledání polymorfismu v genu pro *iNos* u DS potkanů je naopak v souladu s naším nedávným pozorováním, že jak akutní, tak ani chronické podání inhibitoru inducibilní isoformy NOS, aminoguanidinu, nezpůsobilo odlišnou tlakovou odpověď u sůl-senzitivních jedinců v porovnání se sůl-rezistentními jedinci z pražské kolonie Dahlových potkanů (Kuneš a kol., 2004). Tato zjištění jsou ale v rozporu s dřívějšími poznatky poukazujícími na důležitost patofyziologické úlohy inducibilní NOS při rozvoji a udržování solné hypertenze u Dahlových potkanů původem z Harlanu (Chen a Sanders, 1993, Rudd a kol., 1999, Tan a kol., 2000).

Zkoumali jsme i možnou přítomnost polymorfismu v genech kódujících jednotlivé isoformy NOS mezi jiným hypertenzním kmenem HTG a kontrolními potkany (kmen Lewis), ale ani u těchto zvířat jsme nedetekovali žádné mutace v genech pro NO syntázy (Kadlecová a kol., 2003).

5.2. Změny v systému NO u jednotlivých hypertenzních modelů

V našich předchozích pokusech jsme se zaměřili na studování změn rovnováhy dvou hlavních vazoaktivních systémů – sympatického nervového systému a systému oxidu dusnatého, jejichž podíl na regulaci krevního tlaku je u normotenzivních zvířat vyrovnán, avšak u hypertenzivních jedinců je tato balance narušena. Použitím metody (původně popsané v publikaci Minami a kol., 1995) postupné blokády nejprve RAS pomocí ACE inhibitoru kaptoprilu, dále SNS ganglioplegikem pentoliniem a nakonec systému NO podáním neselektivního inhibitoru NO syntázy L-NAME jsme odhalili dysbalanci mezi

zvýšenou sympatickou vazokonstrikcí a relativním deficitem periferní NO-dependentní vazodilatace u všech zvířat se spontánní (SHR, HTG potkani) a solnou hypertenzí (Dahl) (tab. 9). Z této tabulky je patrné, že především u Dahlových a spontánně hypertenzních potkanů je výše krevního tlaku značně závislá na sympatické komponentě, přičemž kompenzatorní NO-dependentní vazodilatace je pouze mírně zvýšena. Tyto nálezy jsou ve shodě s výsledky experimentů prováděných skupinou Huang a Leenena (1994), podle nichž Dahlovy sůl-senzitivní potkany na vysokosolné dietě charakterizuje snížená sympatoinhibice spolu s výraznou excitací sympatiku. Navíc mají všechny námi studované modely zvýšený reziduální tlak (hladina, na kterou klesne krevní tlak po blokádě dvou nejvýznamnějších vazokonstrikčních systémů – RAS a SNS), což svědčí o přítomných strukturálních změnách vyskytujících se především na úrovni rezistentních cév hypertenzních jedinců.

Tab. 9: Příspěvek jednotlivých vazoaktivních systémů na udržování hladiny krevního tlaku u námi používaných experimentálních hypertenzních modelů.

	Dahl DS (8 % NaCl) vs. Dahl DR (8 % NaCl)	SHR vs. WKY (12 týdnů)	SHR vs. WKY (30 týdnů)	HTG vs. WIS
angiotenzin-dependentní vazokonstrikce	=	=	↑	↑
noradrenalin-dependentní (sympatická) vazokonstrikce	↑↑	↑↑	↑↑	=
NO-dependentní vazodilatace	(↑)	=	↑	=
reziduální TK (strukturální změny)	↑↑	↑	↑↑	↑
	1)	2)	3)	4)

- 1) Zicha J, Dobesova Z, Kunes J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens.* 19:247-54, 2001.
- 2) Paulis L, Liskova S, Pinterova M, Dobesova Z, Kunes J, Zicha J. Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats. (submitted to *Acta Physiol.*)
- 3) Hojna S, Kadlecova M, Dobesova Z, Valouskova V, Zicha J, Kunes J. The participation of brain NO synthase in blood pressure control of adult spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* Sep 29, 2006.
- 4) Kunes J, Dobesova Z, Zicha J. Altered balance of main vasopressor and vasodepressor systems in rats with genetic hypertension and hypertriglyceridaemia. *Clin Sci.* 102:269-77, 2002.

Abychom zjistili důvod, kvůli kterému nedokáže systém oxidu dusnatého u hypertenzních potkanů plně kompenzovat zvýšenou sympatickou aktivitu, zaměřili jsme se na hledání abnormalit jednotlivých isoformů NOS u hypertenzních kmenů a naše nálezy shrnuje tabulka 10.

Tab. 10: *Vzájemné porovnání proteinových expresí jednotlivých isoform NOS ve studovaných tkáních a orgánech u námi používaných experimentálních modelů hypertenze.*

nNOS	Dahl DS (8 % NaCl) vs. Dahl DR (8 % NaCl)	SHR vs. WKY (12 týdnů)	SHR vs. WKY (30 týdnů)	HTG vs. WIS
DIENCEFALON	↓↓	=	=	=
MOZKOVÝ KMEN	↓	↓↓	=	=
SRDCE	NEMĚŘENO	NEMĚŘENO	NEMĚŘENO	NEMĚŘENO
LEDVINY	=	=	NEMĚŘENO	=

eNOS	Dahl DS (8 % NaCl) vs. Dahl DR (8 % NaCl)	SHR vs. WKY (12 týdnů)	SHR vs. WKY (30 týdnů)	HTG vs. WIS
DIENCEFALON	=	=	↓↓	=
MOZKOVÝ KMEN	=	=	↑	=
SRDCE	=	=	NEMĚŘENO	=
LEDVINY	↓↓	↓↓	NEMĚŘENO	↓↓

iNOS	Dahl DS (8 % NaCl) vs. Dahl DR (8 % NaCl)	SHR vs. WKY (12 týdnů)	SHR vs. WKY (30 týdnů)	HTG vs. WIS
DIENCEFALON	↓↓	=	↑	↓
MOZKOVÝ KMEN	↓	(↓)	=	(↓)
SRDCE	=	=	NEMĚŘENO	=
LEDVINY	↓	=	NEMĚŘENO	=

Dahl DS (8 % NaCl) – Dahl sůl-senzitivní potkan na vysokosolné dietě

Dahl DR (8 % NaCl) – Dahl sůl-rezistentní potkan na vysokosolné dietě, kontrola pro Dahl DS (8 % NaCl)

SHR – spontánně hypertenzní potkan

WKY – potkan kmene Wistar-Kyoto, kontrola pro SHR

HTG – pražský hereditárně hypertriglyceridemický potkan

WIS – potkan kmene Wistar, kontrola k HTG

= shodná proteinová exprese u hypertenzního i kontrolního zvířete

↓↑ signifikantně snížená, respektive zvýšená exprese u hypertenzního zvířete v porovnání s kontrolou

K interpretaci těchto výsledků jsme zvolili přístup vzájemného porovnávání námi studovaných hypertenzních modelů.

5.2.1. Porovnání změn odehrávajících se v systému NO u spontánní a solné hypertenze rozvinuté v mládí

Z výsledkové části je patrné, že pro studium spontánní hypertenze jsme použili mladé 12-ti týdenní samce kmene SHR, zatímco solnou hypertenzi mladých (8 týdnů) Dahlových potkanů jsme studovali na samicích. Do tohoto srovnání dvou odlišných pohlaví jsme se pustili i přesto, že je velice dobře známo, že incidence kardiovaskulárních onemocnění je v mužské, respektive v samčí populaci vyšší oproti populaci ženské, resp. samicí. Tento fakt bývá částečně přičítán nejen ochrannému efektu ženských pohlavních hormonů, ale také přítomnosti odlišných buněčných regulačních mechanismů, které dokazují experimenty prováděné na tkáňových kulturách (Loukotova a kol., 2002. Bacakova a Kunes, 2000). V dospělé lidské populaci platí, že hypertenzí trpí více muži nežli ženy, avšak u některých zvířat, např. u Dahlových potkanů se solnou hypertenzí dosahuje krevní tlak vyšších hodnot překvapivě u samic (Zicha a kol., 2001). Toto byl jeden z důvodů, proč jsme se odvážili porovnat změny v systému NO bez ohledu na pohlaví. Srovnávání výsledků získaných analýzou samců a samic ospravedlňuje i naše dosud nepublikovaná studie, ve které jsme současně s měřením aktivity NOS u Dahlových sůl-senzitivních a sůl-rezistentních samic stanovovali i enzymatickou aktivitu téhož proteinu u samců a výsledky měření byly velice obdobné.

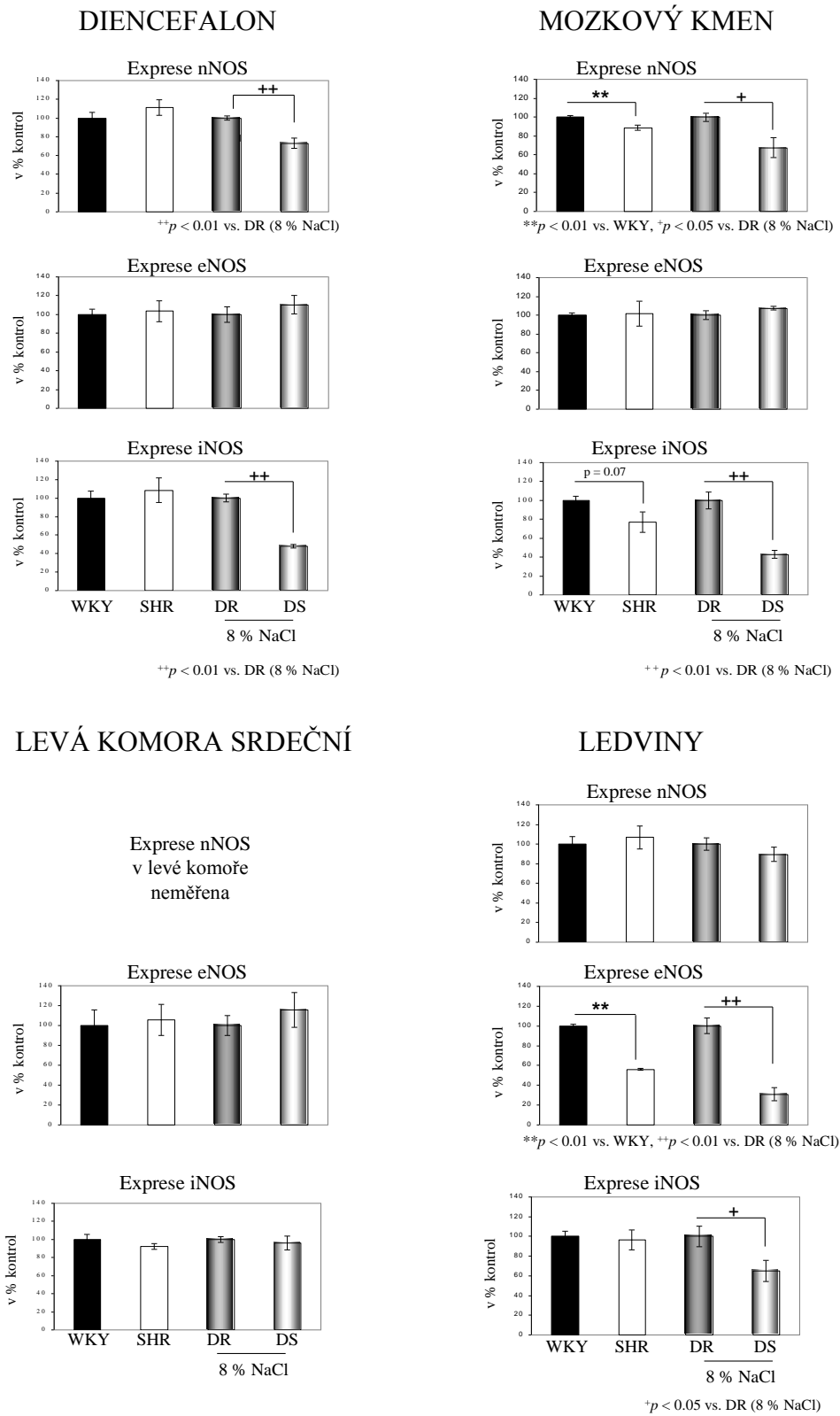
Při sledování změn v aktivitě NOS a v expresi jednotlivých isoform NOS u mladých potkanů se spontánní a solnou hypertenzí jsme zjistili sníženou expresi neuronální a indukibilní NOS v mozkovém kmeni (obr. 20). Tento nálezný by mohl souviset s úlohou, kterou v této mozkové oblasti hraje NO při regulaci sympatického tonu, jenž je u obou forem experimentální hypertenze zvýšený. Spontánní i solná hypertenze jsou dále provázeny potlačenou expresí endoteliální isoformy NOS v ledvinách, což by mohlo hrát určitou roli v poruše renální exkrece sodíku. Signifikantně nižší aktivitu eNOS v renální dřeni pozoroval i Hayakawa a Raj (1998) u obou modelů genetické hypertenze. Solná hypertenze u Dahlových potkanů je navíc charakterizována sníženou expresí neuronální a indukibilní NOS v diencefalonu, který se prostřednictvím řady svých struktur citlivých na zvýšený příjem soli (viz. Obr. 3) také účastní patogeneze solné hypertenze, a dále

redukovanou expresí inducibilní isoformy NO syntázy v ledvinách. Jak potvrzují některé biochemické a funkční studie, renální iNOS by mohla hrát důležitou úlohu v rozvoji sůlsenzitivní hypertenze (Manning a kol., 2001). Tuto domněnku podporují i v 90. letech provedené molekulárně-genetické vazebné analýzy, které ukázaly, že lokus pro iNOS (Deng a Rapp, 1995), avšak ne lokus pro eNOS (Deng a Rapp, 1997), kosegreguje s krevním tlakem u DS jedinců. Výsledky studií (Tan a kol., 2000, Rudd a kol., 1999) se selektivními inhibitory iNOS (AMG – aminoguanidin, AMT–2-amino-5,6-dihydro-6-metyl-4H-1,3-thiazin) nasvědčují tomu, že NO vyprodukovaný za fyziologických podmínek inducibilní isoformou napomáhá u sůl-rezistentních Dahlových potkanů zamezit rozvoji solné hypertenze, zatímco u sůl-senzitivních jedinců snižuje citlivost na sůl. Redukovanou proteinovou expresi iNOS nejen v ledvině, ale také v levé komoře srdeční a aortě DS jedinců na vysokosolném režimu potvrdila i Vazirihova skupina (1999). Naopak v rozporu s našimi výsledky naměřila shodnou expresi eNOS v ledvině u obou Dahlových kmenů a ani solí obohacená dieta na ni neměla žádný vliv. Na druhou stranu se naše nálezy z velké části shodují s výsledky získanými stejným týmem o dva roky později (Ni a Vaziri, 2001) v experimentu provedeném na normotenzních potkanech kmene Sprague-Dawley, kteří se na vysokosolné dietě svým chováním velice podobají DS jedincům. Nejenže těmto zvířatům po třech týdnech na solí obohacené (8%) dietě signifikantně vzroste krevní tlak, ale dojde také ke změnám proteinové exprese jednotlivých isoform NOS. Zvýšení krevního tlaku doprovází jak snížená exprese iNOS v celé ledvině, srdci a aortě resp. exprese eNOS v ledvinné kůře, tak také redukce nNOS v mozku a ledvině. A právě nálezy exprese neuronální isoformy v ledvině u jedinců se solnou hypertenzí jsou značně rozporuplné. Lze najít práce popisující u Dahlových potkanů jak zvýšenou expresi (Manning a kol., 2001), tak i sníženou (Ikeda a kol., 1995, Yoshihara a kol., 2005, Szentivanyi a kol., 2001) a nebo nezměněnou expresi (naše nálezy) tohoto enzymu v ledvinném parenchymu.

Značně nejasná jsou i data týkající se exprese jednotlivých isoform NOS v ledvině u spontánní hypertenze. V naší laboratoři jsme u mladých SHR potkanů naměřili o 50 % sníženou expresi endoteliální isoformy NOS v porovnání s kontrolou WKY, což je ve shodě s prací Kumar a kol. (2003), zatímco Vaziri a kol. (1998) detekovali v celé ledvině její zvýšení, stejně tak jako Welch a kol. (2000) v juxtaglomerulárním aparátu. Shodnou expresi renální eNOS u SHR a WKY potkanů potvrzují i výsledky Fernandez a kol. (2003). Podobně nejednotné nálezy jsou i pro zbylé dvě isoformy (Kumar a kol., 2003, 2005, Fernandez a kol., 2003, Welch a kol., 2000). Přestože neexistuje jednotný náhled na

tvorbu oxidu dusnatého v ledvinách u potkanů se spontánní hypertenzí, Person a Thorup (2000) zastávají názor, že produkce NO je u hypertenzních zvířat zhoršena, s čímž souvisí zvýšené uvolňování reninu a tedy i tvorba angiotenzinu II významně přispívající k vzestupu krevního tlaku.

Obr. 20: Porovnání změn jednotlivých expresí NOS u spontánní a solné hypertenze vznikající v mládí.



WKY – Wistar-Kyoto (kontrola pro SHR), SHR – spontánně hypertenzní potkan
 DR (8 % NaCl) – Dahlův sůl-rezistentní potkan na vysokosolné dietě (kontrola pro DS)
 DS (8 % NaCl) – Dahlův sůl-senzitivní potkan na vysokosolné dietě

5.2.2. Porovnání úlohy centrálního NO v rozvoji, respektive udržování hypertenze u mladých a dospělých SHR potkanů

Na základě měření celkové aktivity NOS a proteinové exprese všech tří isoform NOS ve dvou oblastech CNS (diencefalon, mozkový kmen) podílejících se na regulaci sympatického tonu a krevního tlaku můžeme říci, že centrální systém NO hraje odlišnou úlohu v mládí (12 týdnů) při rozvoji hypertenze než u dospělých (30 týdnů) jedinců s již rozvinutou hypertenzí. U obou věkových skupin však předchází měření (Hojná a kol., 2007, Paulis a kol., 2007, viz. též tab. 9) potvrdila příčinu výskytu vysokého krevního tlaku, kterou je zesílená sympatická vazokonstrikce a zvýšený reziduální TK, zatímco příspěvek angiotenzin II-dependentní vazokonstrikce je méně výrazný. Nezměněná NO-dependentní vazodilatace u mladých SHR, respektive mírně zesílená u dospělých jedinců není schopná zcela kompenzovat účinky těchto dvou nejsilnějších vazokonstrikčních systémů. Podobné nálezy týkající se relativní NO deficiencie jsme získali i při studiu solné hypertenze u Dahlových potkanů (Zicha a kol., 2001, Dobešová a kol., 2002).

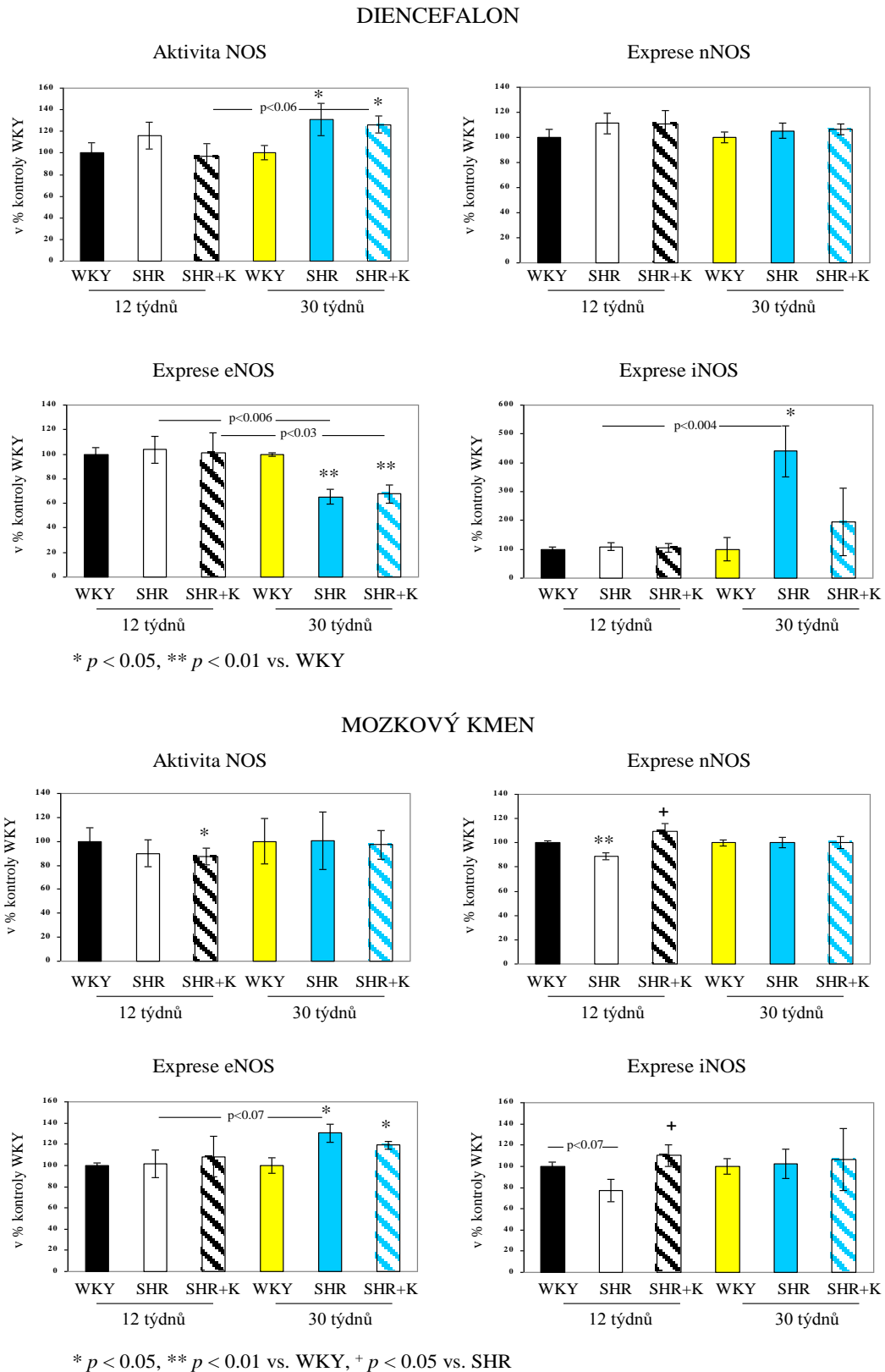
Mladí SHR jedinci se od dospělých liší tlakovou odpovědí na chronickou léčbu ACE inhibitorem kaptoprilem. Zatímco u 12-ti týdenních zvířat dokáže dlouhodobé včasné podávání antihypertenziva udržet krevní tlak na kontrolní úrovni a tento efekt částečně přetrvává i po jeho vysazení, u dospělých SHR potkanů sice dojde k tlakovému poklesu, ale hodnota TK zůstává nadále nad úrovní kontrolní skupiny WKY. U těchto zvířat po ukončení léčby antihypertenzivní efekt nepřetrvává a krevní tlak se během krátké doby vrací na své původní hodnoty (Harrap a kol., 1990). Pokles tlaku po kaptoprilu je převážně dosažen redukcí sympatické vazokonstrikce, zatímco oslabená angiotenzin II-dependentní vazokonstrikce a reparační procesy na rezistentních cévách se uplatňují mnohem méně. Tato data se shodují s představou zabývající se postavením centrálního angiotenzinu II v patogenezi sympatické hyperaktivity, jež je charakteristická pro tento model spontánní hypertenze (Krukoff, 1998, Allen, 2002, Veerasingham a Raizada, 2003).

Abychom objasnili úlohu NO v mozku při regulaci sympatického tonu, měřili jsme jak celkovou aktivitu NOS, tak také exprese všech tří jejích isoform v diencefalonu a mozkovém kmeni u obou věkových skupin SHR potkanů (obr. 21). Dále jsme sledovali případné změny odehrávající se v centrálním systému NO v důsledku vlivu antihypertenzivní léčby kaptoprilem. Mírný vzestup aktivity NOS byl v oblasti diencefalonu SHR potkanů patrný již ve 12. týdnu věku a ve 30. týdnu byl tento nárůst

v porovnání s kontrolní skupinou WKY signifikantní. Velice podobná data získali Qadri a kol. (2003) u 12-13ti týdenních SHR potkanů. Tato skupina naměřila významně vyšší aktivitu NOS u těchto zvířat nejen v hypotalamu, ale i v mozkovém kmeni. Shodně zapůsobila i antihypertenzivní léčba. Jak námi chronicky podávaný kaptopril, tak i jejich 10-ti denní léčba enalapilem nebo losartanem normalizovala u mladých SHR jedinců aktivitu NOS v diencefalonu, resp. hypotalamu, ale bez výrazného efektu na aktivitu v mozkovém kmeni. Na rozdíl od nedávno publikovaných prací popisujících významně zvýšenou expresi nNOS v některých oblastech CNS (Plochocka-Zulinska a Krukoff, 1997, Hauser a kol., 2005) jsme našli pouze signifikantně sníženou proteinovou expresi této isoformy v mozkovém kmeni mladých SHR, zatímco u dospělých jedinců byla exprese v obou testovaných oblastech beze změny. Na druhou stranu jsme ale detekovali překvapivé změny v expresi endoteliální NOS přítomné pouze u dospělých SHR potkanů. Proteinová exprese endoteliální isoformy v mozkovém kmeni stoupla, kdežto v oblasti AV3V došlo k jejímu signifikantnímu snížení. Zvýšenou celkovou aktivitu NOS v diencefalonu 30-ti týdenních zvířat můžeme tedy přičíst mohutnému vzestupu exprese indukibilní NOS. Nejen naše skupina, ale i Chou a kol. (1998) popsali u spontánně hypertenzních potkanů s věkem klesající expresi eNOS, která je provázána narůstající expresí iNOS. Možnost vzájemné záměny eNOS a iNOS v CNS u SHR potkanů nedávno publikovali Yamakawa a kol. (2003).

Výsledky této věkové studie potvrdily naši domněnku, že antihypertenzivní léčba přináší mnohem výraznější benefit mladému organismu než dospělému jedinci s již dlouhodobě rozvinutou hypertenzí. Chronická léčba ACE inhibitorem kaptoprilem u 12-ti týdenních SHR potkanů normalizovala mírně zvýšenou aktivitu NOS v diencefalonu a současně dokázala stimulovat expresi neuronální a indukibilní NOS v mozkovém kmeni na kontrolní úroveň WKY. Dá se dokonce říci, že téměř dokázala vymazat rozdíl mezi normotenzním a hypertenzním jedincem, zaměříme-li se na změny odehrávající se v centrálním systému NO. Toto ale neplatí pro dospělé SHR potkany, u nichž zůstala úroveň aktivity a převážná část exprese NOS léčbou neovlivněná. Přesto jsme však mohli u dospělých SHR léčených kaptoprilem pozorovat v diencefalonu tendenci k redukci výrazné exprese indukibilní isoformy.

Obr. 21 Porovnání aktivity NOS a exprese všech tří isoform NOS mezi mladými a dospělými SHR jedinci a vliv léčby kaptoprilem na tvorbu NO v diencefalonu a mozkovém kmeni.



WKY – potkan Wistar-Kyoto, SHR – spontánně hypertenzní potkan
SHR+K – spontánně hypertenzní potkan léčený kaptoprilem

5.2.3. Změny NO syntázy u modelu metabolického syndromu

Pražští hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani (HTG) byli původně vyšlechtěni jako genetický model pro hypertriglyceridemii (Vrána a Kazdová, 1990, Klimeš a kol., 1995), ale později u nich byly objeveny i další symptomy metabolického syndromu jako jsou inzulínová rezistence (Štolba a kol., 1993), glukózová intolerance (Vrána a kol., 1993) a hypertenze (Štolba a kol., 1992, Lichardus a kol., 1993). Vzhledem k tomu, že HTG potkani jsou ojedinělým modelem, je velmi obtížné naše výsledky týkající se úlohy systému NO u tohoto kmene diskutovat s nálezy jiných autorů.

Přestože aktivita NO syntázy byla ve všech studovaných orgánech shodná u HTG i kontrolních potkanů Wistar, mohli jsme v obou centrálních oblastech (diencefalón, mozkový kmen) HTG zvířat sledovat pokles proteinové exprese indukibilní isoformy NOS a současně jsme našli, obdobně jako u ostatních námi analyzovaných hypertenzních modelů, signifikantně sníženou expresi eNOS v ledvinách. Ta by mohla souviset s poruchami renální exkrece sodíku a tedy i s vzestupem krevního tlaku. Tlakový rozdíl mezi HTG jedinci a kontrolními zvířaty bychom mohli na základě naší předchozí studie (Kuneš a kol., 2002) připsat také zvýšenému reziduálnímu tlaku, zesílenému účinku superoxidových aniontů a výrazně aktivované angiotenzin-dependentní vazokonstrikci (viz. tab. 9), zatímco účast SNS a periferního systému NO na udržování TK se nezdá být mezi HTG a kontrolními potkany příliš rozdílná.

6. Závěr

Předmětem této práce bylo získat poznatky o změnách, které se odehrávají v centrálním a periferním systému oxidu dusnatého na úrovni genů, proteinové exprese a celkové aktivity jednotlivých isoform enzymu NOS při rozvoji a udržování geneticky podmíněné hypertenze u různých zvířecích modelů (Dahl, SHR, HTG).

Ani v jednom prováděném pokuse v rámci experimentu 1 se nám metodami PCR a SSCP nepodařilo potvrdit polymorfismy v genu pro *iNos* mezi sůl-senzitivními a sůl-rezistentními Dahlovými potkany z pražské kolonie, jež byly u těchto zvířat detekovány u jiných kolonií. Výsledky této genetické analýzy nás utvrdily v domněnce, že důvodem by mohl být rozdíl mezi Dahlovými potkany od firmy Harlan a pražskou kolonií, která se v rámci *iNos* genu chová shodně jako původní kolonie Dahlových potkanů z Brookhavenu.

U mladých potkanů se spontánní (SHR) a solnou (Dahl) hypertenzí jsme zjistili sníženou expresi neuronální a indukibilní NOS v mozковém kmeni a u sůl-senzitivních Dahlových potkanů současně i v diencefalonu. Tyto nálezy by mohly souviset s úlohou, kterou v těchto mozkových oblastech hraje NO při regulaci sympatického tonu, jenž je zvýšený u obou forem experimentální hypertenze. Výsledky měření exprese NOS v diencefalonu u Dahlových potkanů dokládá úzký vztah těchto na příjem soli senzitivních struktur k solné hypertenzi. Snížená tvorba endoteliálního NO v ledvinách by navíc mohla přispívat k poruše renální exkrece sodíku a tím napomáhat ke zvýšení krevního tlaku u obou hypertenzních modelů. Na základě námi pozorovaných změn odehrávajících se v centrálním a periferním systému NO lze říci, že se tyto změny podílejí ve větší míře při rozvoji solné hypertenze nežli u spontánní hypertenze.

Výsledky z experimentu 2 potvrzují představu o tom, že centrální systém oxidu dusnatého hraje částečně odlišnou úlohu v mládí při rozvoji spontánní hypertenze než u dospělých SHR potkanů s již rozvinutou hypertenzí. Reakce tohoto vazodilatačně působícího systému na antihypertenzivní léčbu je také věkově závislá. Zatímco chronická léčba ACE inhibátorem kaptopilem u SHR potkanů od 4. týdne věku normalizovala krevní tlak a převážně i aktivitu NOS spolu s expresí jednotlivých isoform NOS na kontrolní úroveň WKY, u dospělých jedinců zůstala, s výjimkou dočasného poklesu TK, aktivita a značná část expresí NOS léčbou neovlivněna.

I poslední námi použitý zvířecí model vyvinutý ke studiu symptomů metabolického syndromu (kmen HTG) vykazoval některé odchylky jak v centrálním (snížená exprese

iNOS v obou mozkových oblastech) tak také v periferním (výrazně nižší exprese eNOS v ledvině) systému NO oproti kontrolní skupině Wistar. Přesto tlakový rozdíl mezi oběma srovnávanými kmeny by podle naší předchozí studie mohl být připsán spíše zvýšenému reziduálnímu tlaku a tvorbě kyslíkových radikálů spolu s výrazně aktivovaným RAS, zatímco účast systému NO a sympatického nervového systému se zdá být méně významná.

V naší práci se nám podařilo podrobněji analyzovat změny odehrávající se v systému oxidu dusnatého hlavně na úrovni enzymatické aktivity a exprese NO syntázy u tří různých modelů genetické hypertenze (Dahl, SHR, HTG). Především se dá říci, že charakteristicky vysoká hladina krevního tlaku jak u dospělých, tak i u mladých spontánně hypertenzních potkanů je převážně udržována chronicky zvýšeným sympatickým nervovým tonusem, strukturální remodelací rezistentních cév a u dospělých též zesíleným vazokonstrikčním efektem angiotenzinu II. Ačkoli jsme neprokázali sníženou aktivitu NO syntázy, tj. pokles celkové tvorby NO všemi třemi isoformami NOS ve vybraných oblastech mozku, pozorovali jsme sníženou expresi nNOS a iNOS v mozkovém kmeni u mladých SHR a Dahlových potkanů. Tento nález se zdá být ve shodě s hypotézou, že v RVLM oblasti prodloužené míchy se NO podílí na regulaci sympatického tonu. Naproti tomu u dospělých SHR s rozvinutou hypertenzí je zvýšený sympatický tonus patrně zajišťován jinými mechanismy, než je porucha centrální tvorby oxidu dusnatého. Výrazně zvýšená exprese indukibilní isoformy NOS v diencefalonu u dospělých SHR se zdá být spíše kompenzačním než patogenetickým mechanismem.

V budoucnu bychom se chtěli zaměřit na ještě detailnější studium úlohy centrálního systému NO a jeho možné přímé ovlivnění inhibitory NOS a dalšími farmaky ve vztahu k výši krevního tlaku.

7. Literatura

ALBRECHT E.W., STEGEMAN C.A., HEERINGA P., HENNING R.H., VAN GOOR H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 199:8-17, 2003.

ALLEN A.M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension.* 39:275-80, 2002.

ANDERSON E.A., SINKEY C.A., LAWTON W.J., MARK A.L. Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension.* 14:177-83, 1989.

BACAKOVA L., KUNES J. Gender differences in growth of vascular smooth muscle cells isolated from hypertensive and normotensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 22:33-44, 2000.

BADOER E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28:95-9, 2001.

BAINS J.S., FERGUSON A.V. Reduced NMDA receptor sensitivity may underlie the resistance of subpopulations of PVN neurons to excitotoxicity. *Neuroreport.* 7;8:2101-5, 1997.

BALLIGAND J.L., KELLY R.A., MARSDEN P.A., SMITH T.W., MICHEL T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signalling system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:347-51, 1993.

BALLIGAND J.L., UNGUREANU-LONGROIS D., SIMMONS W.W., PIMENTAL D., MALINSKI T.A., KAPTURCZAK M., TAHA Z., LOWENSTEIN C.J., DAVIDOFF A.J., KELLY R.A., ET AL. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem.* 269:27580-8, 1994.

BALLINGER S.W., PATTERSON C., YAN C.N., DOAN R., BUROW D.L., YOUNG C.G., YAKES F.M., VAN HOUTEN B., BALLINGER C.A., FREEMAN B.A., RUNGE M.S. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 86:960-6, 2000.

BANERJI M.A., LEBOWITZ J., CHAIKEN R.L., GORDON D., KRAL J.G., LEBOVITZ H.E. Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol.* 273:E425-32, 1997.

BECKMAN J.S., BECKMAN T.W., CHEN J., MARSHALL P.A., FREEMAN B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1620-4, 1990.

BECKMAN J.S., KOPPENOL W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271:1424-37, 1996.

- BEIERWALTES W.H. Macula densa stimulation of renin is reversed by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol.* 272:R1359-64, 1997.
- BENDER A.T., SILVERSTEIN A.M., DEMADY D.R., KANELAKIS K.C., NOGUCHI S., PRATT W.B., OSAWA Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem.* 274:1472-8, 1999.
- BOULANGER C.M., HEYMES C., BENESSIANO J., GESKE R.S., LEVY B.I., VANHOUTTE P.M. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 83:1271-8, 1998.
- BOULDEN B.M., WIDDER J.D., ALLEN J.C., SMITH D.A., AL-BALDAWI R.N., HARRISON D.G., DIKALOV S.I., JO H., DUDLEY S.C. JR. Early determinants of H(2)O(2)-induced endothelial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 41:810-7, 2006.
- BRAAM B. Renal endothelial and macula densa NOS: integrated response to changes in extracellular fluid volume. *Am J Physiol.* 276:R1551-61, 1999.
- BRASCH H., SIEROSLAWSKI L., DOMINIAK P. Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. *Hypertension.* 22:699-704, 1993.
- BREDT D.S., FERRIS C.D., SNYDER S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem.* 267:10976-81. 1992.
- BREDT D.S., HWANG P.M., SNYDER S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347:768-70, 1990.
- BREDT D.S., SNYDER S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.*63:175-95, 1994.
- BRENMAN J.E., CHAO D.S., XIA H., ALDAPE K., BREDT D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 82:743-52, 1995.
- BRODY M.J., FINK G.D., BUGGY J., HAYWOOD J.R., GORDON F.J. AND JOHNSON A.K. The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. *Circ. Res.* 43 (Suppl. I):2-13, 1978.
- BROOKS V.L., OSBORN J.W. Hormonal-sympathetic interactions in long-term regulation of arterial pressure: an hypothesis. *Am J Physiol.* 268:1343-58, 1995.
- BRUNZELL J.D., AYYOBI A.F. Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 115 Suppl 8A:24-28, 2003.
- BUTTERY L.D., SPRINGALL D.R., CHESTER A.H., EVANS TJ., STANDFIELD E.N., PARUMS D.V., YACCOUB M.H., POLAK J.M. Inducible nitric oxide synthase is present

within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* 75:77-85, 1996.

CAPLEA A., SEACHRIST D., DANESHVAR H., DUNPHY G., ELY D. Noradrenergic content and turnover rate in kidney and heart shows gender and strain differences. *J Appl Physiol.* 92:567-71, 2002.

CARRETERO O.A., OPARIL S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation.* 101:329-35, 2000.

CICILA G.T., LEE S.J. Identifying candidate genes for blood pressure quantitative trait loci using differential gene expression and a panel of congenic strains. *Hypertens Res.* 21:289-96, 1998.

CITTADINI A., ISHIGURO Y., STROMER H., SPINDLER M., MOSES A.C., CLARK R., DOUGLAS P.S., INGWALL J.S., MORGAN J.P. Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca²⁺ through a wortmannin-sensitive pathway: studies in rat and ferret isolated muscles. *Circ Res.* 83:50-9, 1998.

COLLISTER J.P., HENDEL M.D. Role of the subfornical organ in the chronic hypotensive response to losartan in normal rats. *Hypertension.* 41:576-82, 2003.

COSENTINO F., PATTON S., D'USCIO L.V., WERNER E.R., WERNER-FELMAYER G., MOREAU P., MALINSKI T., LUSCHER T.F. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest.* 101:1530-7, 1998.

COUET J., LI S., OKAMOTO T., IKEZU T., LISANTI M.P. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 272:6525-33, 1997.

COY V. Genetics of essential hypertension. *J Am Acad Nurse Pract.* 17:219-24, 2005.

CULOTTA.E., KOSHLAND D.E. Jr. NO news is good news. *Science.* 258:1862-5, 1992.

DAHL L.K., HEINE M., AND TASSINARI L. Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *J Exp Med.* 115:1173-1190, 1962a.

DAHL L.K., HEINE M., AND TASSINARI L. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. *Nature.* 194:480-482, 1962b.

DAHL L.K., HEINE M., TASSINARI L. Effects of chronic excess salt ingestion. Role of genetic factors in both doca-salt and renal hypertension. *J Exp Med.* 118:605-17, 1963.

DAMPNEY R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 74:323-64, 1994.

DAVIDSON C.A., KAMINSKI P.M., WU M., WOLIN M.S. Nitrogen dioxide causes pulmonary arterial relaxation via thiol nitrosation and NO formation. *Am J Physiol.* 270:1038-43, 1996.

DE BACKER G., AMBROSIONI E., BORCH-JOHNSEN K., BROTONS C., CIFKOVA R., DALLONGEVILLE J., EBRAHIM S., FAERGEMAN O., GRAHAM I., MANCIA G., CATS V.M., ORTH-GOMER K., PERK J., PYORALA K., RODICIO J.L., SANS S., SANSOY V., SECHTEM U., SILBER S., THOMSEN T., WOOD D. Third Joint Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease and Prevention in Clinical Practice. European guidelines on cardiovascular disease and prevention in clinical practice. *Atherosclerosis.* 171:145-55, 2003.

DE WARDENER H.E. The hypothalamus and hypertension. *Physiol Rev.* 81:1599-658, 2001.

DENG A.Y., RAPP J.P. Locus for the inducible, but not a constitutive, nitric oxide synthase cosegregates with blood pressure in the Dahl salt-sensitive rat. *J Clin Invest.* 95:2170-7, 1995.

DEVYNCK M.A., KUNEŠ J., LE QUAN SANG K.H., ZICHA J. Membrane microviscosity and plasma triacylglycerols in the rat. *Clin Sci (Lond).* 94:79-85, 1998.

DIBONA G.F., JONES S.Y., SAWIN L.L. Effect of endogenous angiotensin II on renal nerve activity and its arterial baroreflex regulation. *Am J Physiol.* 271:361-7, 1996.

DIBONA G.F. Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension.* 36:1083-8, 2000.

DINERMAN J.L., STEINER J.P., DAWSON T.M., DAWSON V., SNYDER S.H. Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology.* 33:1245-51, 1994.

DOBESOVA Z., KUNES J., ZICHA J. The altered balance between sympathetic nervous system and nitric oxide in salt hypertensive Dahl rats: ontogenetic and F2 hybrid studies. *J Hypertens.* 20:945-55, 2002.

DOELLE G.C. The clinical picture of metabolic syndrome. An update on this complex of conditions and risk factors. *Postgrad Med.* 116:30-2, 35-8, 2004.

ELIASSON M.J., BLACKSHAW S., SCHELL M.J., SNYDER S.H. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3396-401, 1997.

ENDOH M., MAIESE K., WAGNER J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res.* 651:92-100, 1994.

ENGELI S., SHARMA A.M. Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res.* 32:485-99, 2000.

- ESLER M., JACKMAN G., BOBIK A., LEONARD P., KELLEHER D., SKEWS H., JENNINGS G., KORNER P. Norepinephrine kinetics in essential hypertension. Defective neuronal uptake of norepinephrine in some patients. *Hypertension*. 3:149-56, 1981.
- FAN J.G., ZHU J., LI X.J., CHEN L., LU Y.S., LI L., DAI F., LI F., CHEN S.Y. Fatty liver and the metabolic syndrome among Shanghai adults. *J Gastroenterol Hepatol*. 20:1825-32, 2005.
- FERGUSON A.V., BAINS J.S. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 24:96-101, 1997.
- FERGUSON A.V. Paraventricular nucleus neurons projecting to the dorsomedial medulla are influenced by systemic angiotensin. *Brain Res Bull*. 20:197-201, 1988.
- FERNANDEZ A.P., SERRANO J., CASTRO S., SALAZAR F.J., LOPEZ J.C., RODRIGO J., NAVA E. Distribution of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 21:2375-88, 2003.
- FERON O., BALLIGAND J.L. Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc Res*. 69:788-97, 2006.
- FERRONI P., BASILI S., PAOLETTI V., DAVI G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 16:222-33, 2006
- FINDLING J.W., RAFF H., HANSSON J.H., LIFTON R.P. Liddle's syndrome: prospective genetic screening and suppressed aldosterone secretion in an extended kindred. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:1071-4, 1997.
- FISHER-FERRARO C., NAHMOD V.E., GOLDSTEIN D.J., FINKELMAN S. Angiotensin and renin in the rat and dog brain. *J Exp Med*. 133: 353-361, 1971.
- FONTBONNE A., CHARLES M.A., THIBULT N., RICHARD J.L., CLAUDE J.R., WARNET J.M., ROSSELIN G.E., ESCHWEGE E. Hyperinsulinaemia as a predictor of coronary heart disease mortality in a healthy population: the Paris Prospective Study, 15-year follow-up. *Diabetologia*. 34:356-61, 1991.
- FORD C.M., LI S., PICKERING J.G. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:1843-51, 1999.
- FORSTERMANN U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide. *Eur J Clin Pharmacol*. 62 Suppl 13:5-12, 2006.
- FROHLICH E.D. Arthus C. Corcoran Memorial Lecture. Influence of nitric oxide and angiotensin II on renal involvement in hypertension. *Hypertension*. 29:188-93, 1997.
- FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288:373-6, 1980.

- GANONG W.F. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27:422-7, 2000.
- GANTEN D., SPECK G. The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. *Biochem Pharmacol.* 27:2379-89, 1978.
- GARTHWAITE J., CHARLES S.L., CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 336:385-8, 1988.
- GATTONE V.H. 2ND, EVAN A.P., OVERHAGE J.M., SEVERS W.B. Developing renal innervation in the spontaneously hypertensive rat: evidence for a role of the sympathetic nervous system in renal damage. *J Hypertens.* 8:423-8, 1990.
- GEROVA M., MASANOVA C., PAVLASEK J. Inhibition of NO synthase in the posterior hypothalamus increases blood pressure in the rat. *Physiol Res.*44:131-134, 1995.
- GHOSH S., GACHHUI R., CROOKS C., WU C., LISANTI M.P., STUEHR D.J. Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem.* 273:22267-71, 1998.
- GOREN Z., ASLAN N., BERKMAN K., SAN T., SULE O., ONAT F. Role of paraventricular and dorsomedial nuclei of the hypothalamus and central nucleus of the amygdala on muscimol-induced cardiovascular responses. *Fundam Clin Pharmacol.*11:408-15, 1997.
- GOYER M., BUI H., CHOU L., EVANS J., KEIL L.C., REID I.A. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on vasopressin secretion in conscious rabbits. *Am J Physiol.* 266:822-8, 1994.
- GRAHAM D., MCBRIDE M.W., BRAIN N.J., DOMINICZAK A.F., Congenic/consomic models of hypertension. *Methods Mol Med.* 108:3-15, 2005.
- GRANDATI M., VERRECCHIA C., REVAUD M.L., ALLIX M., BOULU R.G., PLOTKINE M. Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol.* 122:625-30, 1997.
- GRANGER J.P., ALEXANDER B.T., LLINAS M. Mechanisms of pressure natriuresis. *Curr Hypertens Rep.* 4:152-9, 2002
- GRASSI G., COLOMBO M., SERAVALLE G., SPAZIANI D., MANCIA G., Dissociation between muscle and skin sympathetic nerve activity in essential hypertension, obesity, and congestive heart failure. *Hypertension.* 31:64-7,1998.
- GRIENDLING K.K., SORESCU D., USHIO-FUKAI M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86:494-501, 2000.
- GRYGLEWSKI R.J., PALMER R.M., MONCADA S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 320:454-6, 1986.

- Guidelines Committee, 1999 World Health Organization – International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens.* 17:151-183, 1999.
- GUYTON A.C. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol.* 259:R865-77, 1990.
- HALL J.E. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. *Am J Hypertens.* 10:49-55, 1997.
- HALL J.E. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension.* 41:625-33, 2003.
- HAN X., SHIMONI Y., GILES W.R. An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate. *J Physiol.* 476:309-14, 1993.
- HARPER A.A., DAVIS J.P., CHIPPERFIELD A.R., Activation of two inward chloride transport systems in rat femoral arterial smooth muscle in deoxycorticosterone acetate/salt hypertension. *Clin Sci (Lond).* 93:295-8, 1997.
- HARRAP S.B., VAN DER MERWE W.M., GRIFFIN S.A., MACPHERSON F., LEVER A.F. Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. *Hypertension.* 16:603-14, 1990.
- HARRISON D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 100:2153-7, 1997.
- HAUSER W., SASSMANN A., QADRI F., JOHREN O., DOMINIAK P. Expression of nitric oxide synthase isoforms in hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the development of spontaneous hypertension in rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 138:198-204, 2005.
- HAYAKAWA H., RAIJ L. Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. *Hypertension.* 31:266-70, 1998.
- HEAD R.J. Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels.* 26:1-20, 1989.
- HEDNER T. The clinical profile of the angiotensin II receptor blocker eprosartan. *J Hypertens.* 20:33-8, 2002.
- HEINZEL B., JOHN M., KLATT P., BOHME E., MAYER B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J.* 281:627-30, 1992.
- HOJNA S., KADLECOVA M., DOBESOVA Z., VALOUSKOVA V., ZICHA J., KUNES J. The participation of brain NO synthase in blood pressure control of adult spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2007. (in press)

- HOJNA S., KADLECOVA M., ZICHA J., KUNES J. Polymorphism in Nos2 gene is absent in Prague colony of Dahl/Rapp salt-sensitive and salt-resistant rats. *Physiol Res.* 54:201-6, 2005.
- HUANG Z., HUANG P.L., PANAHIAN N., DALKARA T., FISHMAN M.C., MOSKOWITZ M.A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science.* 265:1883-5, 1994.
- HUNTER S.J., GARVEY W.T. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 105:331-45, 1998.
- CHAO J., CHAO L. Kallikrein gene therapy: a new strategy for hypertensive diseases. *Immunopharmacology.* 36:229-36, 1997.
- CHEN A.F., REN J., MIAO C.Y. Nitric oxide synthase gene therapy for cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol.* 89:327-36, 2002.
- CHEN P.Y., GLADISH R.D., SANDERS P.W. Vascular smooth muscle nitric oxide synthase anomalies in Dahl/Rapp salt-sensitive rats. *Hypertension.* 31:918-24, 1998.
- CHEN Z.P., MITCHELHILL K.I., MICHELL B.J., STAPLETON D., RODRIGUEZ-CRESPO I., WITTERS L.A., POWER D.A., ORTIZ DE MONTELLANO P.R., KEMP B.E. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443:285-9, 1999.
- CHO H.J., MARTIN E., XIE Q.W., SASSA S., NATHAN C. Inducible nitric oxide synthase: identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:11514-8, 1995.
- CHOU T.C., YEN M.H., LI C.Y., DING Y.A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension.* 31:643-8, 1998.
- CHRISTOPHERSON K.S., BREDT D.S. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest.* 100:2424-9, 1997.
- CHRISTOPHERSON K.S., HILLIER B.J., LIM W.A., BREDT D.S. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem.* 274:27467-73, 1999.
- IADECOLA C., ZHANG F., XU S., CASEY R., ROSS M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15:378-84, 1995.
- ITO S., KOMATSU K., TSUKAMOTO K., KANMATSUSE K., SVED A.F. Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension.* 40:552-9, 2002.

- IYER S.N., LU D., KATOVICH M.J., RAIZADA M.K. Chronic control of high blood pressure in the spontaneously hypertensive rat by delivery of angiotensin type 1 receptor antisense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9960-5, 1996.
- KADLECOVA M, CEJKA J, ZICHA J, KUNES J. Does Cd36 gene play a key role in disturbed glucose and fatty acid metabolism in Prague hypertensive hypertriglyceridemic rats? *Physiol Res.* 53:265-71, 2004.
- KAGIYAMA S., TSUCHIHASHI T., ABE I., FUJISHIMA M. Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 31:1030-4, 1998.
- KAWANABE Y., NAULI S.M. Involvement of extracellular Ca²⁺ influx through voltage-independent Ca²⁺ channels in endothelin-1 function. *Cell Signal.* 17:911-6, 2005.
- KEILHOFF G, FANSA H, WOLF G. Nitric oxide synthase, an essential factor in peripheral nerve regeneration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 49:885-97, 2003.
- KENNEY M.J., WEISS M.L., HAYWOOD J.R. The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. *Acta Physiol Scand.* 177:7-15, 2003.
- KESSLER P., BAUERSACHS J., BUSSE R., SCHINI-KERTH V.B. Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:1746-55, 1997.
- KHOR G.L. Cardiovascular epidemiology in the Asia-Pacific region. *Asia Pac J Clin Nutr.* 10:76-80, 2001.
- KIM W.K., CHOI Y.B., RAYUDU P.V., DAS P., ASAAD W., ARNELLE D.R., STAMLER J.S., LIPTON S.A. Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻. *Neuron.* 24:461-9, 1999.
- KLIMES I., VRANA A., KUNES J., SEBOKOVA E., DOBESOVA Z., STOLBA P., ZICHA J. Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Press.* 4:137-42, 1995.
- KONE B.C. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis.* 30:311-33, 1997.
- KRUKOFF T.L. Central regulation of autonomic function: no brakes? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 25:474-8, 1998.
- KUMAR U., CHEN J., SAPOZNIKHOV V., CANTEROS G., WHITE B.H., SIDHU A. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens.* 27:17-31, 2005.
- KUMAR U., SHIN Y., WERSINGER C., PATEL Y., SIDHU A. Diminished expression of constitutive nitric oxide synthases in the kidney of spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens.* 25:271-82, 2003

KUNES J., DOBESOVA Z., ZICHA J. Altered balance of main vasopressor and vasodepressor systems in rats with genetic hypertension and hypertriglyceridaemia. *Clin Sci* . 102:269-77, 2002.

KUNES J., ZICHA J. Developmental windows and environment as important factors in the expression of genetic information: a cardiovascular physiologist's view. *Clin Sci (Lond)*. 111:295-305, 2006.

KUNES J., ZICHA J. Experimentální modely hypertenze. *Klinická patofyziologie hypertenze*. 28-36, 2002.

LEENEN F.H., RUZICKA M., HUANG B.S. The brain and salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 4:129-35, 2002.

LEENEN F.H., YUAN B. Prevention of hypertension by irbesartan in Dahl S rats relates to central angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension*. 37:981-4, 2001.

LEWIS J.L., RUSSELL R.J., WARNOCK D.G. Analysis of the genetic contamination of salt-sensitive Dahl/Rapp rats. *Hypertension*. 24:255-9, 1994.

LI D., SWEENEY G., WANG Q., KLIP A. Participation of PI3K and atypical PKC in Na⁺-K⁺-pump stimulation by IGF-I in VSMC. *Am J Physiol*. 276:2109-16, 1999.

LI Z., FERGUSON A.V. Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: modulation of IA by angiotensin II. *Neuroscience*. 71:133-45, 1996.

LIFTON R.P. Genetic determinants of human hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8545-51, 1995.

LICHARDUS B., SEBOKOVA E., JEZOVA D., MITKOVA A., ZEMANKOVA A., FOLDES O., VRANA A., KLIMES I. Effect of a low salt diet on blood pressure and vasoactive hormones in the hereditary hypertriglyceridemic rat. *Ann N Y Acad Sci*. 683:289-94, 1993.

LIN K.F., CHAO J., CHAO L. Human atrial natriuretic peptide gene delivery reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension*. 26:847-53, 1995.

LIST B.M., KLOSCH B., VOLKER C., GORREN A.C., SESSA W.C., WERNER E.R., KUKOVETZ W.R., SCHMIDT K., MAYER B. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J*. 323 :159-65, 1997.

LIU S., PREMONT R.T., KONTOS C.D., HUANG J., ROCKEY D.C. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem*. 278:49929-35, 2003.

- LOUKOTOVA J., KUNES J., ZICHA J. Gender-dependent difference in cell calcium handling in VSMC isolated from SHR: the effect of angiotensin II. *J Hypertens.* 20:2213-9, 2002.
- MACKAY J., MENSAH G.A. The atlas of heart disease and stroke. *World Health Organization.* Geneva: 2005.
- MACMICKING J.D., NATHAN C., HOM G., CHARTRAIN N., FLETCHER D.S., TRUMBAUER M., STEVENS K., XIE Q.W., SOKOL K., HUTCHINSON N., ET AL. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 81:641-50, 1995.
- MAJID D.S., NAVAR L.G. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens.* 14:74S-82S, 2001.
- MARTENS J.R., GELBAND C.H. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res.* 79:295-301, 1996.
- MARTENS J.R., GELBAND C.H. Ion channels in vascular smooth muscle: alterations in essential hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med.* 218:192-203, 1998.
- MARTIN D.S., SEGURA T., HAYWOOD J.R. Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. *Hypertension.* 18:48-55, 1991.
- MASSION P.B., DESSY C., DESJARDINS F., PELAT M., HAVAUX X., BELGE C., MOULIN P., GUIOT Y., FERON O., JANSSENS S., BALLIGAND J.L. Cardiomyocyte-restricted overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) attenuates beta-adrenergic stimulation and reinforces vagal inhibition of cardiac contraction. *Circulation.* 110:2666-72, 2004.
- MATTSON D.L., BELLEHUMEUR T.G. Neural nitric oxide synthase in the renal medulla and blood pressure regulation. *Hypertension.* 28:297-303, 1996.
- MAYER B, JOHN M, HEINZEL B, WERNER ER, WACHTER H, SCHULTZ G, BOHME E. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* 288:187-91, 1991.
- MAYER B., PFEIFFER S., SCHRAMMEL A., KOESLING D., SCHMIDT K., BRUNNER F. A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J Biol Chem.* 273:3264-70, 1998.
- MCKINLEY M.J., BADOER E., VIVAS L., OLDFIELD B.J. Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. *Brain Res Bull.* 37:131-7, 1995.
- MICHEL J.B., FERON O., SACKS D., MICHEL T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem.* 272:15583-6, 1997.
- MICHEL T., LI G.K., BUSCONI L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:6252-6, 1993.

- MINAMI N., IMAI Y., HASHIMOTO J., ABE K. Contribution of vascular nitric oxide to basal blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats. *Clin Sci.* 89:177-82, 1995.
- MONCADA S., PALMER R.M., HIGGS E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-42, 1991.
- MORO M.A., DE ALBA J., LEZA J.C., LORENZO P., FERNANDEZ A.P., BENTURA M.L., BOSCA L., RODRIGO J., LIZASOAIN I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci.* 10:445-56, 1998.
- MURAKAMI H., MURAKAMI R., KAMBE F., CAO X., TAKAHASHI R., ASAI T., HIRAI T., NUMAGUCHI Y., OKUMURA K., SEO H., MUROHARA T. Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:973-8, 2006.
- NOLAN J.J., LUDVIK B., BALOGA J., REICHART D., OLEFSKY J.M. Mechanisms of the kinetic defect in insulin action in obesity and NIDDM. *Diabetes.* 46:994-1000, 1997.
- NOLL G., TSCHUDI M., NAVA E., LUSCHER T.F. Endothelium and high blood pressure. *Int J Microcirc Clin Exp.* 17:273-9, 1997.
- OGURA T., YOKOYAMA T., FUJISAWA H., KURASHIMA Y., ESUMI H. Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:1014-22, 1993.
- OHLSTEIN E.H., GELLAI M., BROOKS D.P., VICKERY L., JUGUS J., SULPIZIO A., RUFFOLO R.R. JR, WEINSTOCK J., EDWARDS R.M. The antihypertensive effect of the angiotensin II receptor antagonist DuP 753 may not be due solely to angiotensin II receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther.* 262:595-601, 1992.
- OKAMOTO K., AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 27:282-93, 1963.
- OKAMOTO K. Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol.* 7:227-70, 1969.
- ONAKA U., FUJII K., ABE I., FUJISHIMA M. Antihypertensive treatment improves endothelium-dependent hyperpolarization in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 98:175-82, 1998.
- ORII G.K. Angiotensin II-induced ET and PGI₂ release in rat aortic endothelial cells is mediated by PKC. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 61:113-7, 1999.
- OSBORN J.W. JR, LIVINGSTONE R.H., SCHRAMM L.P. Elevated renal nerve activity after spinal transection: effects on renal function. *Am J Physiol.* 253:619-25, 1987.

- PALMER R.M., REES D.D., ASHTON D.S., MONCADA S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 153:1251-6, 1988.
- PANZA J.A., QUYYUMI A.A., BRUSH J.E. JR, EPSTEIN S.E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 323:22-7, 1990.
- PARATI G., DI RIENZO M., ULIAN L., SANTUCCIU C., GIRARD A., ELGHOZI J.L., MANCIA G. Clinical relevance blood pressure variability. *J Hypertens Suppl.* 16:25-33, 1998.
- PATEL K.P., ZHANG K., ZUCKER I.H., KRUKOFF T.L. Decreased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in hypothalamus and brainstem of rats in heart failure. *Brain Res.* 734:109-15, 1996.
- PAULIS L., LISKOVA S., PINTEROVA M., DOBESOVA Z., KUNES J., ZICHA J. Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats (submitted to *Acte Physiol Scand*).
- PEACH M.J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 57:313-70, 1977.
- PEREIRA L.M., MANDARIM-DE-LACERDA C.A. Quantitative examination of the cardiac myocytes in hypertensive rats under chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Biomed Sci.* 5:363-9, 1998.
- PERONDI R., SAINO A., TIO R.A., POMIDOSSI G., GREGORINI L., ALESSIO P., MORGANTI A., ZANCHETTI A., MANCIA G. ACE inhibition attenuates sympathetic coronary vasoconstriction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 85:2004-13, 1992.
- PERSOON A.E., GUTIERREZ A., PITTNER J., RING A., OLLERSTAM A., BROWN R., LIU R., THORUP C. Renal NO production and the development of hypertension. *Acta Physiol Scand.* 168:169-74, 2000.
- PHILLIPS G.B., JING T.Y., RESNICK L.M., BARBAGALLO M., LARAGH J.H., SEALEY J.E. Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension. *J Hypertens.* 11:699-702, 1993.
- PHILLIPS M.I. Antisense inhibition and adeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension. *Hypertension.* 29:177-87, 1997.
- PLOCHOCKA-ZULINSKA D., KRUKOFF T.L. Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 48:291-7, 1997.
- PRABHAKAR P., CHENG V., MICHEL T. A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric-oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem.* 275:19416-21, 2000.

- PRESTA A., LIU J., SESSA W.C., STUEHR D.J. Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity. *Nitric Oxide*. 1:74-87, 1997
- PRITCHARD K.A. JR, ACKERMAN A.W., GROSS E.R., STEPP D.W., SHI Y., FONTANA J.T., BAKER J.E., SESSA W.C. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 276:17621-4, 2001.
- PYORALA K. Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: results from two population studies in Finland. *Diabetes Care*. 2:131-41, 1979.
- QADRI F., ARENS T., SCHWARZ E.C., HAUSER W., DENDORFER A., DOMINIAK P. Brain nitric oxide synthase activity in spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *J Hypertens*. 21:1687-94, 2003.
- RAMCHANDRA R., BARRETT C.J., MALPAS S.C. Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 32:440-6, 2005.
- RAPP J. P., DENE H. Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* 7, 340-349, 1985.
- RAPP J. R. Characteristics of Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats, in Handbook of Hypertension Vol. 4. Experimental and genetic models of hypertension (de Jong W., ed), 287-295. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.
- RAPP J.P., Use and misuse of control strains for genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 10:7-10, 1987.
- RATOVITSKI E.A., ALAM M.R., QUICK R.A., MCMILLAN A., BAO C., KOZLOVSKY C., HAND T.A., JOHNSON R.C., MAINS R.E., EIPPER B.A., LOWENSTEIN C.J. Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 274:993-9, 1999.
- REAVEN G.M., LITHELL H., LANDSBERG L. Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med*. 334:374-81, 1996.
- REID I.A. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol*. 262:763-78, 1992.
- REN J., SAMSON W.K., SOWERS J.R. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 31:2049-61, 1999.
- RIBEIRO M.O., ANTUNES E., DE NUCCI G., LOVISOLO S.M., ZATZ R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 20:298-303, 1992.

RODRIGO J., SPRINGALL D.R., UTTENTHAL O., BENTURA M.L., ABADIA-MOLINA F., RIVEROS-MORENO V., MARTINEZ-MURILLO R., POLAK J.M., MONCADA S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 345:175-221, 1994.

ROSSI G.P., SACCHETTO A., CESARI M., PESSINA A.C. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res.* 43:300-7, 1999.

RUMANTIR M.S., KAYE D.M., JENNINGS G.L., VAZ M., HASTINGS J.A., ESLER M.D. Phenotypic evidence of faulty neuronal norepinephrine reuptake in essential hypertension. *Hypertension.* 36:824-9, 2000.

RUSCHE K.M., SPIERING M.M., MARLETTA M.A. Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 37:15503-12, 1998.

SAWCHENKO P.E., SWANSON L.W., GRZANNA R., HOWE P.R., BLOOM S.R., POLAK J.M. Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 241:138-53, 1985.

SESSA W.C. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res.* 31:131-43, 1994.

SHAUL P.W., SMART E.J., ROBINSON L.J., GERMAN Z., YUHANNA I.S., YING Y., ANDERSON R.G., MICHEL T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem.* 271:6518-22, 1996.

SHAUL P.W. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol.* 547:21-33, 2003.

SCHMIDT B., DIMICCO J.A. Blockade of GABA receptors in periventricular forebrain of anesthetized cats: effects on heart rate, arterial pressure, and hindlimb vascular resistance. *Brain Res.* 301:111-9, 1984.

SIDDHANTA U., PRESTA A., FAN B., WOLAN D., ROUSSEAU D.L., STUEHR D.J. Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J Biol Chem.* 273:18950-8, 1998.

SILVA E.G., FREDIANI-NETO E., FERREIRA A.T., PAIVA A.C., PAIVA T.B. Role of Ca(+)-dependent K-channels in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 113:1022-8, 1994.

SILVAGNO F., XIA H., BREDET D.S. Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem.* 271:11204-8, 1996.

SINGH R.B., SUH I.L., SINGH V.P., CHAITHIRAPHAN S., LAOTHAVORN P., SY R.G., BABILONIA N.A., RAHMAN A.R., SHEIKH S., TOMLINSON B., SARRAF-

- ZADIGAN N. Hypertension and stroke in Asia: prevalence, control and strategies in developing countries for prevention. *J Hum Hypertens*. 14:749-63, 2000.
- SOLIMENA M. Vesicular autoantigens of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev*. 14:227-40, 1998.
- SONG K., ALLEN A.M., PAXINOS G., MENDELSON F.A. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol*. 316:467-84, 1992.
- SONG Y., ZWEIER J.L., XIA Y. Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca²⁺/calmodulin binding. *Biochem J*. 355:357-60, 2001.
- SOWERS J.R. Hypertension in Type II Diabetes: Update on Therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 1:41-47, 1999.
- SOWERS J.R. Insulin and insulin-like growth factor in normal and pathological cardiovascular physiology. *Hypertension*. 29:691-9, 1997.
- SOWERS J.R., SOWERS P.S., PEULER J.D. Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis. *J Lab Clin Med*. 123:647-52, 1994.
- ST. LEZIN E.M., PRAVENEK M., WONG A., WANG J.M., MERRIIONS T., NEWTON S., STEC D.E., ROMAN R.J., LAU D., MORRIS R.C. JR, ET AL. Genetic contamination of Dahl SS/Jr rats. Impact on studies of salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 23:786-90, 1994.
- ST. LEZIN E.M., SIMONET L., PRAVENEK M., KURTZ T. W. Hypertensive strains and normotensive control strains - how closely are they related. *Hypertension* 19:419-424, 1992.
- STAMLER J., ROSE G., ELLIOTT P., DYER A., MARMOT M., KESTELOOT H., STAMLER R. Findings of the International Cooperative INTERSALT Study. *Hypertension*. 17:9-15, 1991.
- STOCKER R., KEANEY J.F. JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 84:1381-478, 2004.
- STOLBA P., DOBESOVA Z., HUSEK P., OPLTOVA H., ZICHA J., VRANA A., KUNES J. The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life Sci*. 51:733-40, 1992.
- STOLBA P., OPLTOVA H., HUSEK P., NEDVIDKOVA J., KUNES J., DOBESOVA Z., NEDVIDEK J., VRANA A. Adrenergic overactivity and insulin resistance in nonobese hereditary hypertriglyceridemic rats. *Ann N Y Acad Sci*. 683:281-8, 1993.
- STROES E., HIJMERING M., VAN ZANDVOORT M., WEVER R., RABELINK T.J., VAN FAASSEN E.E. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett*. 438:161-4, 1998.

- STUEHR D.J., KWON N.S., NATHAN C.F., GRIFFITH O.W., FELDMAN P.L., WISEMAN J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem.* 266:6259-63, 1991.
- STUMVOLL M., FRITSCHÉ A., HARING H.U. Clinical characterization of insulin secretion as the basis for genetic analyses. *Diabetes.* 51 Suppl 1:122-9, 2002.
- SULLIVAN J.C., POLLOCK J.S. Coupled and uncoupled NOS: separate but equal? Uncoupled NOS in endothelial cells is a critical pathway for intracellular signaling. *Circ Res.* 98:717-9, 2006.
- SULLIVAN J.C., POLLOCK J.S. NOS 3 subcellular localization in the regulation of nitric oxide production. *Acta Physiol Scand.* 179:115-22, 2003.
- SUN M.K., REIS D.J. Urethane directly inhibits chemoreflex excitation of medullary vasomotor neurons in rats. *Eur J Pharmacol.* 293:237-43, 1995.
- SWANSON L.W., SAWCHENKO P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 6:269-324, 1983.
- SWISLOCKI A., TSUZUKI A. Insulin resistance and hypertension: glucose intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty acids in the lean spontaneously hypertensive rat. *Am J Med Sci.* 306:282-6, 1993.
- SZENTIVANYI M. JR., ZOU A.P., MATTSON D.L., SOARES P., MORENO C., ROMAN R.J., COWLEY A.W. JR. Renal medullary nitric oxide deficit of Dahl S rats enhances hypertensive actions of angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283:R266-72, 2002.
- ŠTOLBA P., DOBEŠOVÁ Z., HUŠEK P., OPLTOVÁ H., ZICHA J., VRÁNA A., KUNEŠ J. The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life Sci.* 51:733-740, 1992.
- ŠTOLBA P., OPLTOVÁ H., HUŠEK P., NEDVÍDKOVÁ J., KUNEŠ J., DOBEŠOVÁ Z., NEDVÍDEK J., VRÁNA A. Adrenergic overactivity and insulin resistance in nonobese hereditary hypertriglyceridemic rats. *Ann NY Acad Sci.* 683:281-288, 1993.
- TCHERNOF A., LAMARCHE B., PRUD'HOMME D., NADEAU A., MOORJANI S., LABRIE F., LUPIEN P.J., DESPRES J.P. The dense LDL phenotype. Association with plasma lipoprotein levels, visceral obesity, and hyperinsulinemia in men. *Diabetes Care.* 19:629-37, 1996.
- TORVIK A. Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J Comp Neurol.* 106:51-141, 1956.
- TOUYZ R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 44:248-52, 2004.

- TSENG C.J., LIU H.Y., LIN H.C., GER L.P., TUNG C.S., YEN M.H. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension*. 27:36-42, 1996.
- UENO T., TREMBLAY J., KUNES J., ZICHA J., DOBESOVA Z., PAUSOVA Z., DENG A.Y., SUN Y.L., JACOB H.J., HAMET P. Resolving the composite trait of hypertension into its pharmacogenetic determinants by acute pharmacological modulation of blood pressure regulatory systems. *J Mol Med*. 81:51-60. 2003.
- UENO T., TREMBLAY J., KUNES J., ZICHA J., DOBESOVA Z., PAUSOVA Z., DENG A.Y., SUN Y.L., JACOB H.J., HAMET P. Rat model of familial combined hyperlipidemia as a result of comparative mapping. *Physiol Genomics*. 17:38-47, 2004.
- VALTSCHANOFF J.G., WEINBERG R.J. Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J Neurosci*. 21:1211-7, 2001.
- VANHOUTTE P.M. How to assess endothelial function in human blood vessels. *J Hypertens*. 17:1047-58, 1999.
- VAZIRI N.D., NI Z., OVEISI F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 31:1248-54, 1998.
- VEERASINGHAM S.J., RAIZADA M.K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol*. 139:191-202, 2003.
- VIDAL M.J., ROMERO J.C., VANHOUTTE P.M. Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol*. 149:401-2, 1988.
- VINCENT S.R., KIMURA H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 46:755-84, 1992.
- VORSTER H.H. The emergence of cardiovascular disease during urbanisation of Africans. *Public Health Nutr*. 5:239-43, 2002.
- VRANA A., KAZDOVA L. The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc*. 22:2579, 1990.
- VRÁNA A., KAZDOVÁ L., DOBEŠOVÁ Z., KUNEŠ J., KŘEN V., BÍLÁ V., ŠTOLBA P., KLIMEŠ I. Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains: effects of dietary carbohydrates. *Ann NY Acad Sci*. 683:57-68, 1993.
- WALDER R.Y., MORGAN D.A., HAYNES W.G., SIGMUND R.D., MCCLAIN A.M., STOKES J.B., MARK A.L. Genetic characterization of the "new" Harlan Sprague Dawley Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 27:546-51, 1996.
- WALLACE M.N., BISLAND S.K. NADPH-diaphorase activity in activated astrocytes represents inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience*. 59:905-19, 1994.
- WANG X., LU M., GAO Y., PAPAPETROPOULOS A., SESSA W.C., WANG W. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in principal cell of collecting duct. *Am J Physiol*. 275:395-9, 1998.

WELCH W.J., TOJO A., WILCOX C.S. Roles of NO and oxygen radicals in tubuloglomerular feedback in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278:769-76, 2000.

WELCH W.J., WILCOX C.S., THOMSON S.C. Nitric oxide and tubuloglomerular feedback. *Semin Nephrol.* 19:251-62, 1999.

WESSELLS H., TEAL T.H., ENGEL K., SULLIVAN C.J., GALLIS B., TRAN K.B., CHITALEY K. Fluid shear stress-induced nitric oxide production in human cavernosal endothelial cells: inhibition by hyperglycaemia. *BJU Int.* 97:1047-52, 2006.

WILCOX C.S., WELCH W.J. MURAD F., GROSS S.S., TAYLOR G., LEVI R., SCHMIDT H.H. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:11993-7, 1992.

WRIGHT J.W., HARDING J.W. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Brain Res Rev.* 17:227-62, 1992.

XIE Q.W., KASHIWABARA Y., NATHAN C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 269:4705-8, 1994.

YAGIL C., HUBNER N., KREUTZ R., GANTEN D., YAGIL Y. Congenic strains confirm the presence of salt-sensitivity QTLs on chromosome 1 in the Sabra rat model of hypertension. *Physiol Genomics.* 12:85-95, 2003.

YAMAKAWA H., JEZOVA M., ANDO H., SAAVEDRA J.M. Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23:371-80, 2003.

YAMAZAKI J., FUJITA N., NAGAO T. NG-monomethyl-L-arginine-induced pressor response at developmental and established stages in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 259:52-7, 1991.

YAMORI Y. Development of the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications in Handbook of Hypertension Vol. 4. Experimental and genetic models of hypertension (de Jong W., ed), pp. 224-239. *Elsevier*, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.

YASIN S., COSTA A., TRAINER P., WINDLE R., FORSLING M.L., GROSSMAN A. Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology.* 133:1466-9, 1993.

YOSHIHARA F., SUGA S., YASUI N., HORIO T., TOKUDOME T., NISHIKIMI T., KAWANO Y., KANGAWA K. Chronic administration of adrenomedullin attenuates the hypertension and increases renal nitric oxide synthase in Dahl salt-sensitive rats. *Regul Pept.* 128:7-13, 2005.

YUSUF S., REDDY S., OUNPUU S., ANAND S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 104:2746-53, 2001.

ZALBA G., BEAUMONT F.J., SAN JOSE G., FORTUNO A., FORTUNO M.A., DIEZ J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant*. 16 Suppl 1:2-5, 2001.

ZANNAD F., RADAUCEANU A. Effect of MR blockade on collagen formation and cardiovascular disease with a specific emphasis on heart failure. *Heart Fail Rev*. 10:71-8, 2005.

ZANZINGER J., CZACHURSKI J., SELLER H. Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. *Am J Physiol*. 268:958-62, 1995.

ZENG G., QUON M.J. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 98:894-8, 1996.

ZHANG K., MAYHAN W.G., PATEL K.P. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. *Am J Physiol*. 273:864-72, 1997.

ZHANG K., PATEL K.P. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol*. 275:728-34, 1998.

ZHANG W., KUNCEWICZ T., YU Z.Y., ZOU L., XU X., KONE B.C. Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol Scand*. 179:137-42, 2003.

ZHANG Y., LEE T.S., KOLB E.M., SUN K., LU X., SLADEK F.M., KASSAB G.S., GARLAND T. JR, SHYY J.Y. AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1281-7, 2006.

ZICHA J., DOBESOVA Z., KUNES J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens*. 19:247-54, 2001.

ZICHA J., KUNES J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev*. 79:1227-82, 1999.

ZICHA J., SANG K.H., KUNES J., DEVYNCK M.A. Membrane microviscosity, blood pressure and cytosolic pH in Dahl rats: the influence of plasma lipids. *J Hypertens*. 17:785-92, 1999.

ZIMMERMAN B.G., SYBERTZ E.J., WONG P.C. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. *J Hypertens*. 2:581-7, 1984.

ZIMMERMAN B.G. Actions of angiotensin on adrenergic nerve endings. *Fed Proc.* 37:199-202, 1978.

8. Seznam vlastních publikací

1. KUNEŠ J., HOJNÁ S., KADLECOVÁ M., DOBEŠOVÁ Z., RAUCHOVÁ H., VOKURKOVÁ M., LOUKOTOVÁ J., PECHÁŇOVÁ O., ZICHA J. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiol. Res.* 53 Suppl 1:S23-34, 2004.
2. HOJNÁ S., KADLECOVÁ M., ZICHA J., KUNEŠ J. Polymorphism in Nos2 gene is absent in Prague colony of Dahl/Rapp salt-sensitive and salt-resistant rats. *Physiol Res.* 54:201-6, 2005.
3. KADLECOVÁ M., HOJNÁ S., BOHUSLAVOVÁ R., HUBÁČEK J.A., ZICHA J., KUNEŠ J. Apolipoprotein A5 and hypertriglyceridemia in Prague hypertriglyceridemic rats. *Physiol Res.* 55:373-9, 2006.
4. HOJNÁ S., KADLECOVÁ M., DOBEŠOVÁ Z., VALOUŠKOVÁ V., ZICHA J., KUNEŠ J. The participation of brain NO synthase in blood pressure control of adult spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2007 (přijato do tisku).
5. PAULIS L., ZICHA J., KUNEŠ J., HOJNÁ S., KOJŠOVÁ S., PECHÁŇOVÁ O., ŠIMKO F. Regression of L-NAME-induced hypertension: The role of NO and endothelium-derived constricting factor. (v přijímacím řízení do *Basic Res Cardiol.*).