

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

VLIV C-REAKTIVNÍHO PROTEINU NA ENDOTEL V AORTĚ SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍCH POTKANŮ

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

ALEŠ KOSÁN

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D., za odbornou pomoc a vedení, které mi poskytla při zpracování této diplomové práce. Další poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří mě během zpracování práce podporovali.

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

V Hradci Králové

Obsah

1. ABSTRAKT.....	6
2. ABSTRACT	7
3. ÚVOD	8
4. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE	9
5. TEORETICKÁ ČÁST	10
5.1 Metabolický syndrom.....	10
5.1.1 Metabolický syndrom a C-reaktivní protein	12
5.2 Cévní endotel	13
5.2.1 Role oxidu dusnatého v regulaci tonu cévy	14
5.2.2 Endotelová dysfunkce	16
5.3 Endotelin-1	19
5.4 Hemoxygenáza	21
5.4.1 Role hemoxygenázy-1 v regulaci tonu cévy	22
5.5 Endoglin.....	23
5.5.1 Funkce endoglinu v CVS	24
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
6.1 Materiál.....	26
6.1.1 Zvířata.....	26
6.2 Pracovní postup.....	27
6.2.1 Gelová elektroforéza.....	27
6.2.2 Western blot	29
6.2.3 Imunodetekce, chemiluminiscenční detekce	29
6.3 Vyhodnocení, statistické vyhodnocení	30
7. VÝSLEDKY	31
8. DISKUSE.....	35

9. ZÁVĚR.....	37
10. POUŽITÉ ZKRATKY	38
11. SEZNAM TABULEK.....	41
12. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	41
13. SEZNAM GRAFŮ	41
14. POUŽITÁ LITERATURA.....	42

1. ABSTRAKT

VLIV C-REAKTIVNÍHO PROTEINU NA ENDOTEL V AORTĚ SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍCH POTKANŮ

Diplomová práce

Autor: Aleš Kosán

Studijní obor: Farmacie

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Endotelová dysfunkce a chronický zánět jsou faktory hrající roli v patogenezi metabolického syndromu. Tato práce je koncipována jako pilotní studie, jejímž cílem je navrhnout další směr zkoumání v oblasti vlivu C-reaktivního proteinu na endotel.

Pomocí metody Western blot byla sledována exprese čtyř látek, v minulosti spojených se vznikem endotelové dysfunkce: endotelinu-1, hemoxygenázy-1, endoglinu a fosforylované syntázy oxidu dusnatého. Měření bylo provedeno na vzorcích z homogenizovaných potkaních aort transgenních spontánně hypertenzních potkanů exprimujících lidský C-reaktivní protein. Jako kontrolní skupina byl využit kmen standardních spontánně hypertenzních potkanů. Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu na RTG filmy a získaná data byla semikvantitativně vyhodnocena denzitometrickou metodou.

U endoglinu jsme zaznamenali zvýšenou expresi v hodnotě 186,3 % oproti kontrolní skupině. Exprese fosforylované formy endotelové syntázy představovala 325,6 % v porovnání s kontrolní skupinou. U hemoxygenázy-1 byl nárůst exprese minimální (109,0 %) a exprese endotelinu-1 byla překvapivě nižší než u kontrolních zvířat (87,4 %). Tyto výsledky by měly pomoci stanovit další cíle výzkumu a naznačit dopady působení C-reaktivního proteinu na endotel.

Klíčová slova: C-reaktivní protein, endotelová dysfunkce, metabolický syndrom, oxid dusnatý, endoglin, hemoxygenáza-1, endotelin-1, endotelová syntáza oxidu dusnatého, spontánně hypertenzní potkan

2. ABSTRACT

C-REACTIVE PROTEIN EFFECTS ON AORTIC ENDOTHELIUM IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Diploma thesis

Author: Aleš Kosán

Study program: Pharmacy

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Endothelial dysfunction and chronic inflammation are factors figuring in pathogenesis of metabolic syndrome. This paper is outlined as a pilot study, which represents basis for further research in the question of C-reactive protein influence on endothelium.

The expression of four proteins previously associated with the development of endothelial dysfunction, was studied using the Western blot method: endothelin-1, heme oxygenase-1, endoglin and phosphorylated nitric oxide synthase. Analysis was carried out on the samples of homogenized rat aortas of transgenic spontaneously hypertensive rats with expression of human C-reactive protein. A standard spontaneously hypertensive rat strain was used as a control group. The detection was made by chemiluminescence substrate on the X-ray films and data were semiquantitatively evaluated by densitometry.

We found increased expression in endoglin levels, valued at 186.3 % contrary to the control group. The expression of phosphorylated nitric oxide synthase was 325.6 % in comparison with the control group. The increase of expression was minimal (109.0 %) in the heme oxygenase-1 levels and the expression of endothelin-1 was surprisingly decreased when compared to control animals (87.4 %). These results should help to determine further research objectives and suggest the impact of C-reactive protein on the endothelium.

Key words: C-reactive protein, endothelial dysfunction, metabolic syndrome, nitric oxide, endoglin, heme oxygenase-1, endothelin-1, endothelial nitric oxide synthase, spontaneously hypertensive rat

3. ÚVOD

Metabolický syndrom je soubor faktorů, které hrají roli v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a diabetu mellitu 2. typu. Ačkoliv není zatím zcela známa patogeneze tohoto onemocnění, byla popsána celá řada provázejících jevů, mezi které patří i endotelová dysfunkce. Mechanismy spjaté se selháním funkcí endotelu jsou velmi komplexní, ale společným rysem je snížená vazodilatace vznikající v důsledku nedostatečného působení oxidu dusnatého. Ten za přirozených podmínek významně ovlivňuje napětí cévní stěny a zachovává homeostázu kardiovaskulárního systému. V této pilotní práci se zaměřuji na vliv jednoho z prozánětlivých cytokínů, C-reaktivního proteinu, na buňky endotelu. Soustředím se na látky, které již byly v minulosti spojeny s rozvojem endotelové dysfunkce, především skrze ovlivnění vazodilatačně působícího oxidu dusnatého. Sleduji vazokonstrikční působek endotelin-1, transmembránový protein endoglin, enzym hemoxygenázu-1 a expresi fosforylované endotelové syntázy oxidu dusnatého.

4. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE

Cílem této pilotní studie bylo navrhnout další směr výzkumu vlivu C-reaktivního proteinu na endotel. Byla sledována exprese následujících látek: endotelinu-1, endoglinu, hemoxygenázy-1 a fosforylované endotelové syntázy oxidu dusnatého pomocí metody Western blot.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 *Metabolický syndrom*

Metabolický syndrom (MS) je soubor vzájemně propojených faktorů, které hrají roli v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a diabetes mellitus 2. typu (DM2). Především je to obezita, porucha glukózové homeostázy, dyslipidémie a vysoký krevní tlak. Z dalších patofyziologických jevů, které byly v souvislosti s MS popsány je nejčastěji zmiňována mikroalbuminurie, hyperurikémie, zvýšená srážlivost krve, známky chronického zánětu nebo endotelová dysfunkce (ED). Jako celek byl syndrom poprvé popsán pod názvem syndrom X Geraldem Ravenem v roce 1988 a dnes je v mnoha studiích spojován se zvýšeným rizikem vzniku DM2 a onemocnění kardiovaskulárního systému (CVS) (Gami, a další, 2007). V současné době existuje několik definic metabolického syndromu vydaných různými institucemi, mimo jiné World Health Organization (WHO), the European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR), the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP:ATPIII), the American Association of Clinical Endocrinology (AACE), the International Diabetes Federation (IDF) a další. Každá z nich se liší diagnostickými kritérii a v důsledku toho i populací, kterou zachycuje. Seznam vybraných kritérií viz Tabulka 1.

Hodnoty prevalence MS závisí do značné míry na zvolených kritériích a struktuře sledované populace. Statistiky se významně liší v závislosti na věku, pohlaví, rase a etnické příslušnosti osob (Cornier, a další, 2008), nicméně dostupná data naznačují významný vzestup incidence syndromu v západním světě (Hillier, a další, 2006). Tři kohortové studie NHANES provedené od roku 1988 do roku 2006 podle zrevidovaných kritérií NCEP:ATPIII vyhodnotily vzestup výskytu MS od začátku první studie o 5 % (Kassi, a další, 2011). V metaanalýze provedené Mottilem se uvádí, že riziko onemocnění CVS je u pacientů s MS 1,5–3krát vyšší (Mottillo, a další, 2010). Riziko vzniku DM2 je udáváno až 5krát vyšší v závislosti na užití definici (Ford, a další, 2008). Tato čísla ukazují potřebu včasné diagnostiky MS a aktivního zachytu rizikových pacientů, kteří jsou ohroženi MS a v důsledku onemocněními CVS a DM2.

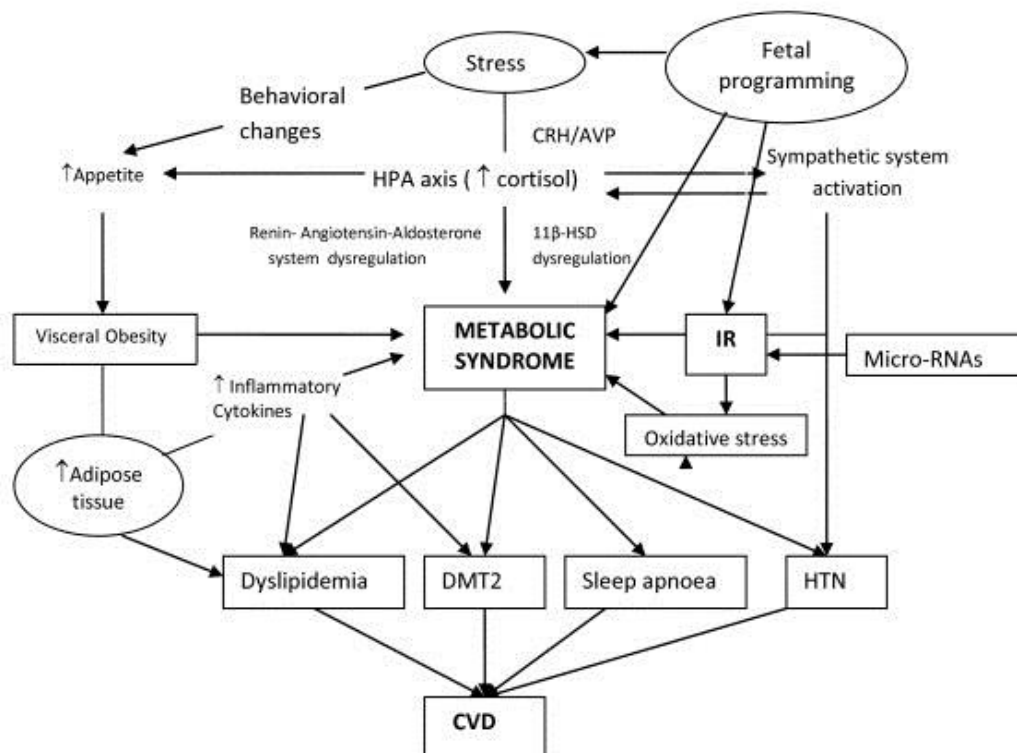
Vznik MS je podle současných poznatků podmíněn více příčinami, nicméně spojitosti mezi nimi nejsou zatím zcela jasné. Jako jejich společný jmenovatel je nejčastěji zmiňována inzulinová rezistence, popsána mimo jiné Bonnorou již v roce 1998, a obezita centrálního typu (Bonora, a další, 1998). Komplexní schéma patofyziologie MS a interakce jednotlivých faktorů viz Obrázek 1.

Tabulka 1 - Kritéria metabolického syndromu podle vybraných institucí

	WHO (1999)	EGIR (1999)	NCEP:ATPIII (revize 2005)	IDF (2005)
Základní požadavky	Inzulinová rezistence	Hyperinzulinémie	Žádné	Centrální obezita
Vyžadovaná kritéria	Inzulinová rezistence nebo diabetes a dvě z pěti vybraných kritérií	Hyperinzulinémie a dvě ze čtyř vybraných kritérií	Jakékoliv tři z vybraných kritérií	Obezita a dvě ze čtyř kritérií
Obezita	Poměr pas/boky: > 0,9 (M) nebo > 0,85 (Ž) nebo BMI > 30 kg/m ²	Obvod pasu: ≥ 94 cm (M) nebo ≥ 80 cm (Ž)	Obvod pasu: > 40 palců (M) nebo > 35 palců (Ž)	Přítomná centrální obezita, obvod pasu ≥ 94 cm (M) nebo ≥ 80 cm (Ž)
Hyperglykémie	Přítomné známky inzulinové rezistence (IGT, IFG, DM2)	Přítomné známky inzulinové rezistence (plasmatický inzulin > 75 percentil nediabetických pacientů)	Glukóza na lačno ≥ 100 mg/dl nebo Rx	Glukóza na lačno ≥ 150 mg/dl nebo Rx
Dyslipidémie	TG ≥ 150 mg/dl nebo HDL-C < 35 mg/dl (M) nebo < 39 mg/dl (Ž)	TG ≥ 177 mg/dl nebo HDL-C < 39 mg/dl	HDL-C < 40 mg/dl (M) nebo HDL-C < 50 mg/dl (Ž) Rx	TG ≥ 150 mg/dl nebo Rx
Hypertenze	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mmHg nebo užívá léky	> 130 mmHg systolický nebo > 85 diastolický tlak nebo Rx	> 130 mmHg systolický nebo > 85 diastolický tlak nebo Rx
Další kritéria	Mikroalbuminurie			

(M) – hodnota pro muže, (Ž) – hodnota pro ženy, TG – triglyceridy, BMI – body mass index, IGT – porucha glukózové tolerance, IFG – porucha glukózy na lačno, DM2 – diabetes mellitus 2. typu, Rx – preskripce léků

Převzato a upraveno z Huang, 2009



Obrázek 1 – Schéma faktorů ovlivňujících patofyziologii MS

IR – inzulinová rezistence, HTN – vysoký krevní tlak, HPA axis – hypotalamo-hypofyzární osa, DM2 – diabetes mellitus 2. typu, CVD – onemocnění kardiovaskulárního systému, CRH - kortikotropin uvolňující hormon, AVP – arginin vazopresin

Behavioral changes - změny chování, fetal programming – zárodečné předurčení (zde dědičnost), Sympathetic system activation – aktivace sympatiku, appetite – chuť k jídlu, visceral obesity – obezita viscerálního typu, adipose tissue – tuková tkáň, inflammatory cytokines – zánětlivé cytokíny, sleep apnoea – spánková apnoe, renin-angiotenzin-aldosteron system dysregulation – dysregulace renin-angiotenzin-aldosteronového systému

Převzato a upraveno z Kassi 2011

5.1.1 Metabolický syndrom a C-reaktivní protein

Jednou z pravděpodobných příčin MS se zdá být dlouhodobý chronický zánět. V souvislosti s ním bylo sledováno několik markerů zánětu, z nichž nejlépe popsán je C-reaktivní protein (CRP). CRP patří do pentraxinové rodiny a jeho název je odvozen od jeho schopnosti vázat C-polysacharid druhu *Streptococcus pneumoniae*. CRP se účastní v lidském těle jak specifické imunitní odpovědi (je schopen opsonizace bakterií), tak té nespecifické (aktivací C1q části komplementu). Primárně je CRP produkován v játrech jako odpověď na stimulaci dalšími cytokíny

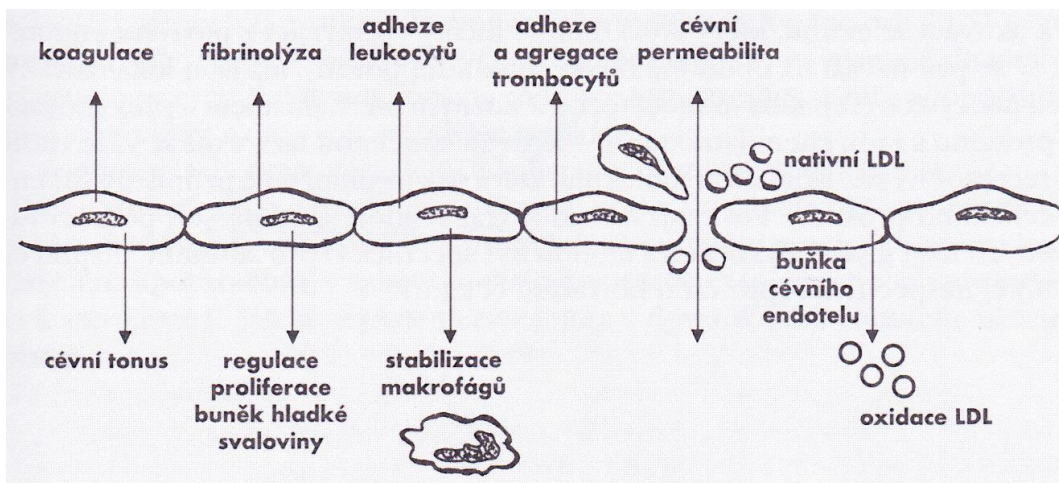
(např. interleukinu 6 - IL-6 nebo tumor nekrotizujícího faktoru α - TNF α), ale zvýšený výskyt byl nalezen i lokálně např. v aterosklerotických plátech nebo buňkách hladké svaloviny cévní stěny (Yasojima, a další, 2001; Calabro, a další, 2003).

Jak již bylo předesláno, tento prozánětlivý cytokín byl v minulosti spojován s MS (Festa, a další, 2000). Právě Festa naznačil korelaci jednotlivých symptomů MS s hladinou high sensitivity CRP (hs-CRP) v krevním oběhu. Velmi výrazná shoda je patrná především s výskytem centrální obezity a inzulínové rezistence. Hladina také pozitivně koreluje s výskytem infarktu myokardu a dalšími onemocněními CVS (Fichtlscherer, a další, 2000). Otázkou zůstává, zda je zvýšená hladina CRP důsledkem nebo naopak původcem onemocnění (či některé z jeho dílčích částí). Výsledky dalších skupin (Pravenec, a další, 2011) v tomto směru zatím naznačují spíše aktivní roli v patogenezi onemocnění.

Spojenci mezi MS a CRP na úrovni endotelových buněk naznačilo již několik autorů (Pravenec, a další, 2011; Devaraj, a další, 2010). Vliv CRP na fyziologické funkce endotelu je popsán dále v samostatné kapitole.

5.2 Cévní endotel

Cévní endotel je souvislá vrstva buněk na rozhraní krevního řečiště a pevné tkáně cévní stěny nebo endokardu. Podle své lokalizace v těle se buňky mohou odlišovat svojí stavbou, tvarem a do jisté míry i funkcí (Fejfar & Přerovský, 2002). Původní představa endotelu jakožto pouhé nesmáčivé bariéry bez dalšího významu byla přehodnocena na základě práce Furchgotta a Zawadzkiho, kteří popsali vazodilatační odezvu endotelu v králičí aortě na působení acetylcholinu (Furchgott & Zawadzki, 1980). Dnes vnímáme endotel jako multifunkční orgán hrající významnou roli v udržování homeostázy. Jednou z jeho základních úloh je zajišťování průniku nízké i vysokomolekulárních látek mezi krevním řečištěm a tkáněmi. Endotel tak slouží jako semipermeabilní membrána umožňující korigovaný přestup nejen živin, ale také monocytů a leukocytů. Dále je známo, že je tkání, která odpovídá na mechanické i chemické podněty a reguluje vazomotorické funkce cévy produkcí mnoha vazoaktivních působků. Zasahuje také do imunologických a zánětlivých procesů, angiogeneze či tvorby trombu. Souhrn funkcí endotelu viz Obrázek 2. Dysfunkce tohoto systému vede k selhání ochrany přirozeného prostředí organismu a rozvoji CVS onemocnění a MS.

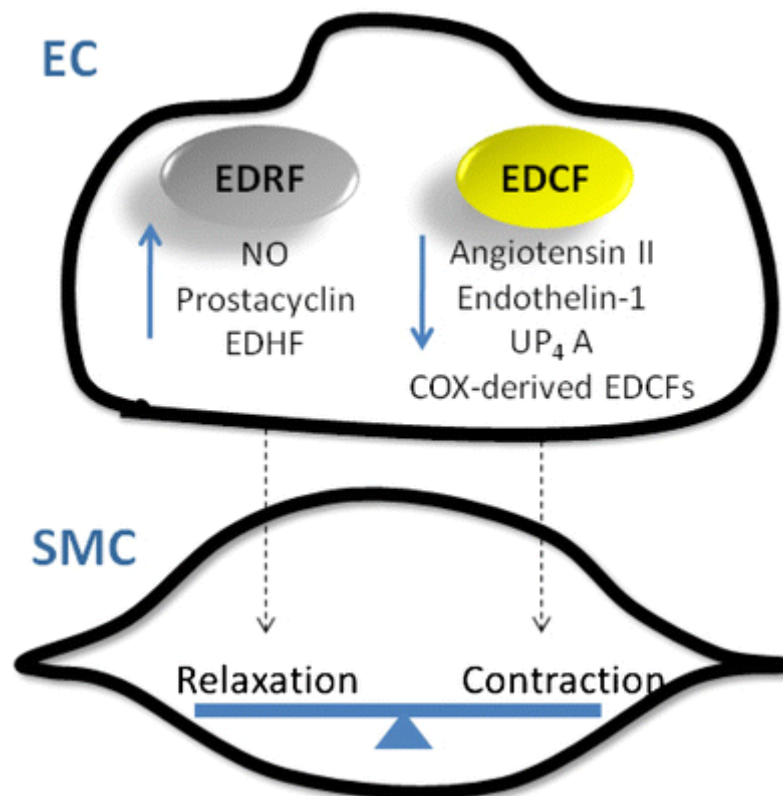


Obrázek 2 – Intraluminální a extraluminální působení endotelu

Převzato a upraveno z Bultas 1999

5.2.1 Role oxidu dusnatého v regulaci tonu cévy

Nejvíce zřetelnou úlohou, kterou endotel zastává, zůstává regulace průtoku krve cévou. Jsou-li buňky endotelu eufunkční, reagují na namáhání a hemodynamické změny uvolňováním látek, které nastavují adekvátní napětí svalových buněk v cévní stěně a v konečném důsledku ovlivňují krevní tlak. Celý systém se nachází v křehké rovnováze udržované celou řadou vazodilatačních a vazokonstrikčních působků. Mezi nimi má významnou roli oxid dusnatý (NO) patřící mezi tzv. endotelem derivované relaxační faktory (EDRF). Opačný efekt na cévní svalovinu pak mají endotelem derivované kontrakční faktory (EDCF), angiotenzin II nebo endotelin-1 (Tang & Vanhoutte, 2010). Viz Obrázek 3.



Obrázek 3 – Vliv působků endotelu na hladkosvalové buňky

EC – buňka endotelu, SMC – buňka hladké svaloviny, NO – oxid dusnatý, EDRF – endotelem derivovaný relaxační faktor, EDCF – endotelem derivovaný kontrakční faktor, EDHF - endotelem derivovaný hyperpolarizující faktor, UP4A - uridin adenosin tetrafosfát

Prostacyclin – prostacyklin, angiotensin II – angiotenzin II, Endothelin-1 – Endotelin-1, relaxation - uvolnění, contraction – stažení, COX-derived EDCFs – cyklooxygenázou derivované endotelem derivované kontrakční faktory

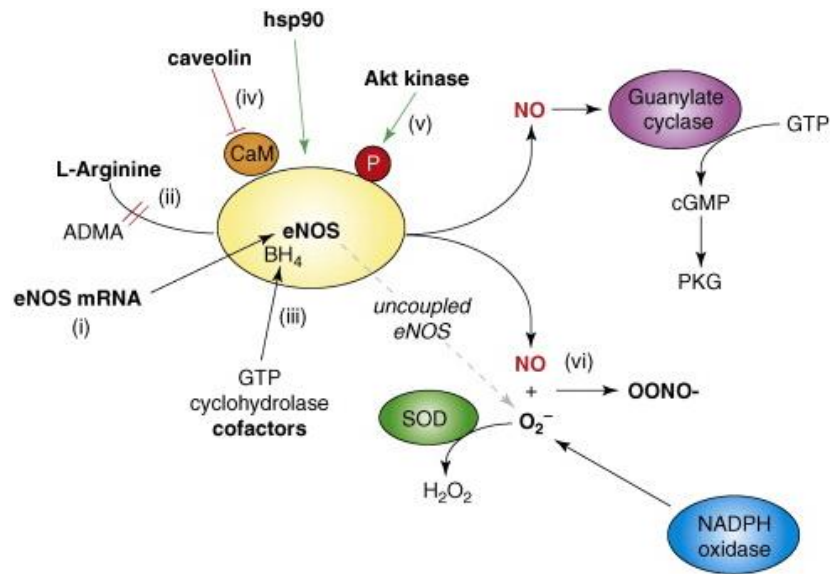
Převzato a upraveno z Tang & Vanhoutte 2010

NO je v současné době nejvíce sledovaným fyziologickým vazodilatantem, za jehož identifikaci byla v minulosti udělena Nobelova cena za chemii. Jedná se o biologicky aktivní plyn, který díky své nízké molekulové hmotnosti a neutrálnímu náboji molekuly snadno přestupuje membránou buněk, kde reguluje množství vápenatých iontů v cytosolu, a tak v hladké svalovině cévní stěny působí relaxaci. Regulace tonu skrze NO má v lidském těle místo jak při fyziologických (např. fyzická zátěž), tak při patologických situacích (např. zánět). Svým vlivem na hladkosvalové buňky udržuje NO průchodnost cév a jejich bazální relaxaci. Čím více je céva namáhána krevním proudem (tzv. shear stress, který lze vyjádřit jako třecí sílu v dyn/cm^2), tím větší aktivitu NO sledujeme. Kromě tohoto významu se NO podílí také na inhibici trombogeneze, inhibici hromadění leukocytů v subendotelové vrstvě nebo na snížení permeability endotelu pro aterogenní molekuly (Esper, a další, 2006).

Syntéza NO probíhá v endotelových buňkách z aminokyseliny L-argininu oxidativním procesem, v kterém hraje hlavní roli enzym NO syntáza (NOS). Reakci ovlivňuje přítomnost koenzymů, především nikotinamidadeninukleotid fosfátu (NADP) a tetrahydrobiopterinu (BH4) (Vanhoutte, a další, 2009). NOS se u člověka vyskytuje ve třech izoformách. Neuronální NOS (nNOS, NOS1) a endotelová NOS (eNOS, NOS3) patří mezi konstitutivní formy, které reagují na stimulaci stálou produkcí malého množství NO. Inducibilní forma NOS (iNOS, NOS2) je tvořena v makrofázích a endotelu jako odpověď na prozánětlivé cytokíny a uvolňuje NO v několikanásobně vyšší koncentraci než ostatní formy. (Vojáček, Malý, a kolektiv, 2004). V regulaci krevního tlaku se angažuje především NO tvořený eNOS. Množství produkovaného enzymu se v čase mění v závislosti na přijímaných podnětech a potřebách organismu. Produkce NO je tak ovlivňována jak pozitivně, tak negativně celou řadou faktorů. Aktivitu eNOS zvyšuje hemodynamické namáhání (tzv. shear stress), některé hormony (estrogeny), cytokíny (transforming growth factor β - TGF β), dostatečné množství substrátů a koenzymů nebo fosforylace enzymu Akt signální kaskádou. Sníženou aktivitu pozorujeme u pacientů vysokou hladinou cukru a lipidů v krvi, hypertenzních pacientů nebo při zvýšeném oxidativním stresu (Bultas, a další, 1999). Nedostatečná tvorba NO se účastní na rozvoji selhání fyziologických funkcí endotelu, častěji popisovaných jako endotelová dysfunkce (Vanhoutte, a další 2009).

5.2.2 Endotelová dysfunkce

Endotelová dysfunkce (ED) je patologický stav, kdy schopnost endotelu zachovávat homeostázu je oslabena. Jako první popsal ve své práci tento fenomén Panza v roce 1990 (Panza, a další, 1990). K ED může docházet z důvodu poškození nebo úplné ztráty endotelových buněk, ale svou úlohu při vzniku může hrát také oxidativní stres, nadbytek volných mastných kyselin, zánětlivé cytokíny nebo glykace pozměňující nitrobuňčné dráhy endotelu (Huang, 2009). ED je jedním z faktorů, který přispívá k tvorbě aterosklerotického plátu, ale účastní se také patofyziologie hypertenze, dyslipoproteinémie a diabetu mellitu (Endemann & Schiffrin, 2004; Panza, a další, 1990). Není náhodou, že důsledky ED sledují do značné míry projevy MS. ED je třeba vnímat v širším kontextu jako jev, který je jeho součástí. Rozvoj ED je spojen s nedostatečnou vazodilatační odpovědí na NO. To může být způsobeno na několika úrovních: ovlivněním aktivity eNOS nebo sníženou biodostupností NO jako takového, viz Obrázek 4. Dále popisují některé z jevů podílejících se na vzniku ED, které neřídka působí synergicky. Vlastní kapitola je věnována působení CRP.



Obrázek 4 – Mechanismy endotelové dysfunkce

Biodostupnost NO produkovaného eNOS může být ovlivněna na různých úrovních, včetně (i) eNOS mRNA nebo exprese proteinu; (ii) dostupnosti L-argininu, který je substrátem eNOS; (iii) dostupností kofaktorů (BH₄); (iv) interakce protein-protein (např. s caveolinem nebo hsp90); (v) posttranslačních modifikací (např. fosforylace na S1177) a (vi) oxidačním stresem.

ADMA – asymetrický dimethylarginin, BH₄ – tetrahydrobiopterin, eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého, GTP – guanosin trifosfát, hsp90 – protein teplotního šoku 90, NO – oxid dusnatý, O₂⁻ - superoxidový anion, OONO⁻ - peroxynitritový anion, PKG – protein kináza G, SOD – superoxid dismutáza, CaM – vápníkem aktivovaný kalmodulin

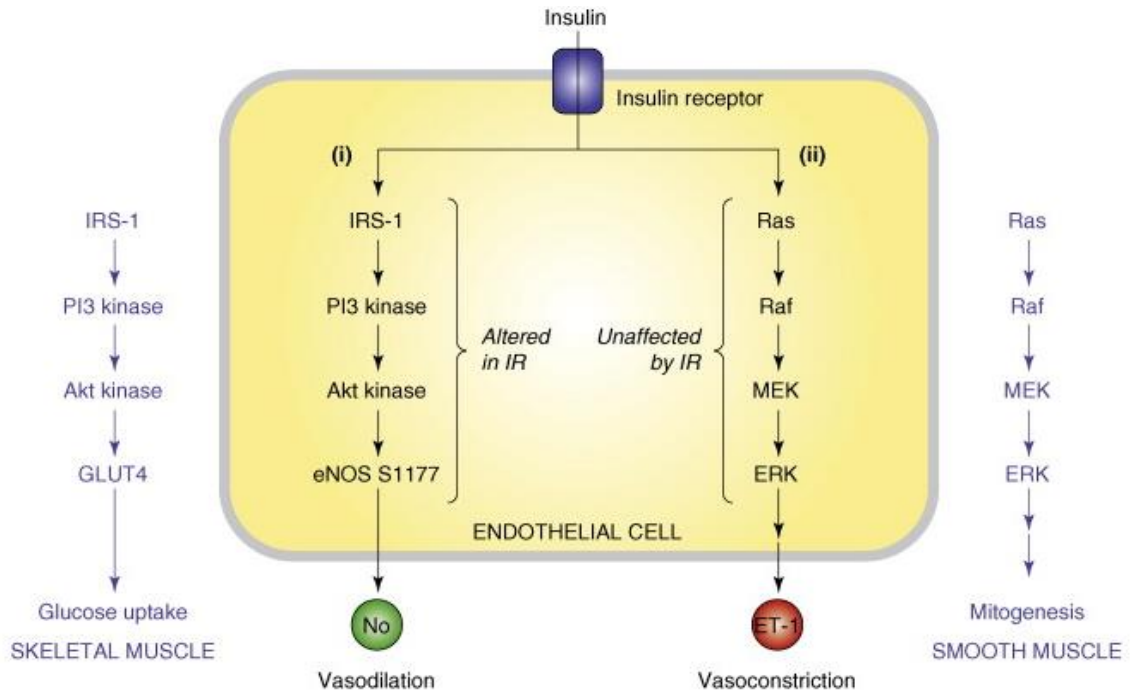
Cyclohydrolase cofactors – kofaktory cyklohydrolázy, Guanylate cyclase – guanylát cykláza

Převzato a upraveno z Huang 2009

Významným faktorem v patogenezi ED je oxidační stres. Mnoho enzymů v lidském těle (např. NADPH oxidáza, xantin oxidáza, cyklooxygenáza, ale i samotná NOS při nedostatku L-argininu) jsou původci volných radikálů, které vychytávají NO za vzniku peroxynitritového aniontu ONOO⁻ (Vanhoutte, a další, 2009). Ten je významným oxidantem a může transformovat důležitý kofaktor eNOS, BH₄, na oxidovanou formu BH₂. Ten nemůže plnit svoji funkci a dochází tak k tzv. uncouplingu eNOS, stavu, kdy eNOS tvoří O₂⁻ a zvyšuje oxidační stres. Výsledkem je další snížení množství NO (Munzel, a další, 2005).

Aktivita eNOS je spojena zejména s fosforylací enzymu na serinu 1177 a threoninu 495 a může být ovlivňována celou řadou faktorů. K fosforylaci dochází v rámci inzulinové signální dráhy PI3K-Akt, která je paralelní k dráze zakončené produkcí vazokonstriktoru endotelinu-1 (ET-1), viz Obrázek 5. Inzulinová rezistence vede k oslabení PI3K-Akt dráhy a snížené aktivitě eNOS (Huang, 2009; Boo, a další, 2006). Signální dráhu

PI3K-Akt mohou ovlivňovat také některé cytokíny, především adipokiny. TNF α , IL-6 nebo rezistin negativně ovlivňují fosforylaci enzymu, zatímco adiponektin působí na fosforylaci pozitivně (Huang, 2009).



Obrázek 5 – Signální dráha inzulinu v endotelu

Inzulin aktivuje dvě paralelní dráhy: (i) PI3-Akt a (ii) Ras/Raf/Map kinázu. Význam dráhy v jiných tkáních je naznačen na okrajích obrázku.

IRS-1 – substrát inzulinového receptoru 1, GLUT4 – na inzulinu nezávislý glukózový transportér, ET-1 – endotelin-1, MAP kináza – mitogenem aktivovaná protein kináza, PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza, eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého

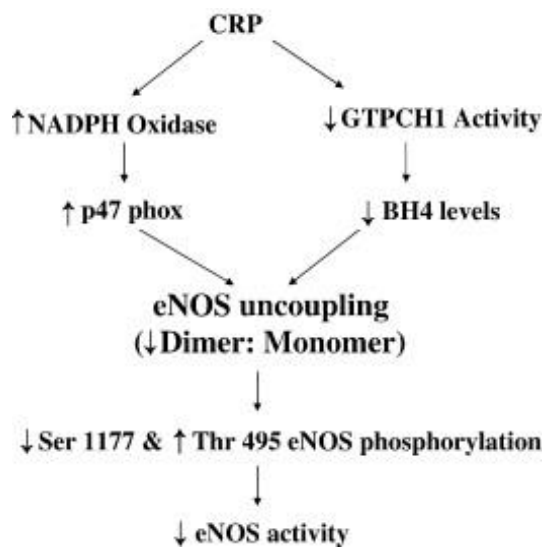
Skeletal muscle – kosterní sval, smooth muscle – hladký sval, altered in IR – změněno při inzulinové rezistenci, unaffected by IR – neovlivněno inzulinovou rezistencí, endothelial cell – endotelová buňka

Převzato a upraveno z Huang 2009

5.2.2.1 Vliv C-reaktivního proteinu na ED

V předchozí části práce již byla zmíněna souvislost CRP s výskytem onemocnění CVS. Možným vysvětlením tohoto jevu je, že CRP přispívá k uncouplingu eNOS. Bylo zjištěno, že zvýšené hladiny CRP zvyšují expresi NADPH oxidázy, jejíž aktivita vede v důsledku k zvýšenému oxidačnímu stresu (Singh, a další, 2007; Hein, a další 2009). Vzniklé

radikály pak snižují koncentraci NO a aktivitu BH4, jak bylo popsáno výše. Dalším vysvětlením je, že CRP přímo ovlivňuje dráhu BH4, která tak nemůže vykonávat svoji úlohu kofaktoru v tvorbě NO. CRP snižuje aktivitu guanozin trifosfát cyklohydrolázy 1 - GTPCH1 (Singh, a další, 2007), která je klíčovým enzymem v syntetické dráze BH4 (Thony, a další, 2000). Toto snížení vede opět k nedostatku BH4 jako kofaktoru. Podíl obou mechanismů na uncouplingu eNOS viz Obrázek 6.



Obrázek 6 – Schéma možné inhibice eNOS vlivem CRP

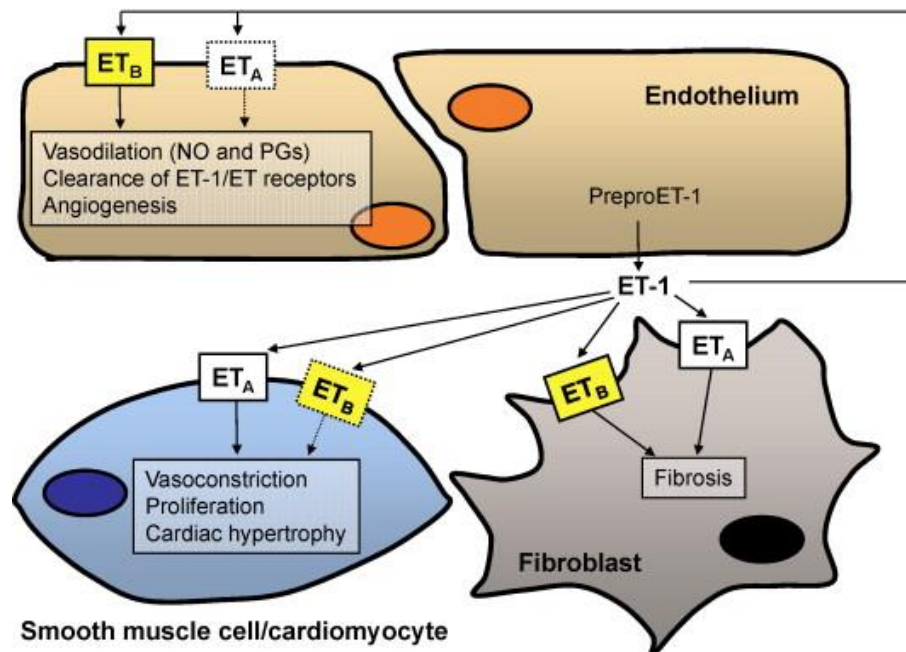
CRP – C-reaktivní protein, NADPH oxidase – nikotinamidnukleotid fosfát oxidáza, GTPCH1 - guanozin trifosfát cyklohydroláza, eNOS - endotelová syntáza oxidu dusnatého, ser - serin, thr - threonin

Převzato a upraveno z Singh 2007

5.3 Endotelin-1

Endothelin-1 (ET-1) patří mezi významné vazokonstrikční látky organismu. Podílí se na regulaci napětí cévní stěny, hraje roli v angiogenezi a remodelaci cévní stěny (Rodriguez-Pascual, a další, 2011). Tento peptid se vyskytuje v hladkosvalových buňkách, ve fibroblastech a především v endotelu (Miyachi & Masaki, 1999). Jeho cílovou strukturou jsou dva typy receptorů označované jako ET_A a ET_B. Oba patří mezi receptory spřažené s G proteinem (Yanagisawa, a další, 1990), avšak jejich aktivace vyvolává rozdílné účinky, jak je uvedeno dále. Exprese ET-1 je řízena mnoha faktory. Pozitivně ji ovlivňuje např. transformující růstový faktor β, tumor nekrotizující faktor α, angiotenzin II, bradykinin nebo stav hypoxie (Rodriguez-Pascual, a další, 2011).

Ačkoliv je ET-1 obecně přijímán jako vazokonstriktor, jeho efekt na jednotlivé tkáně se do značné míry odvíjí od poměru exprimovaných receptorů. Předpokládá se, že v endotelu převládá exprese ET_B , který stimuluje uvolňování vazodilatačních látek NO a prostacyklinu a odstraňuje z cirkulace ET-1 (Thorin & Webb, 2010). Tuto myšlenku potvrzují studie provedené na ET_B defektních zvířatech (Kelland, a další, 2010; Bagnall, a další, 2006). Souhra těchto mechanismů vede v důsledku k dilataci cévy a snížení krevního tlaku. V hladkosvalové buňce cévy je situace opačná: převládá ET_A typ receptoru (Bacon & Davenport, 1996), který způsobuje převahu vazokonstriční odpovědi. Působení ET-1 skrze jednotlivé receptory je znázorněno na Obrázku 7.



Obrázek 7 – Působení endotelinu-1 na kardiovaskulární systém

Odpověď endotelových buněk na podnět je dána především receptory ET_B , zatímco odpověď hladkosvalové buňky zprostředkovává receptor ET_A . Endotelové buňky se podílejí na vazodilataci uvolněním NO a prostaglandinů a snižováním hladin ET-1. Hladkosvalové buňky se účastní vazokonstrikce.

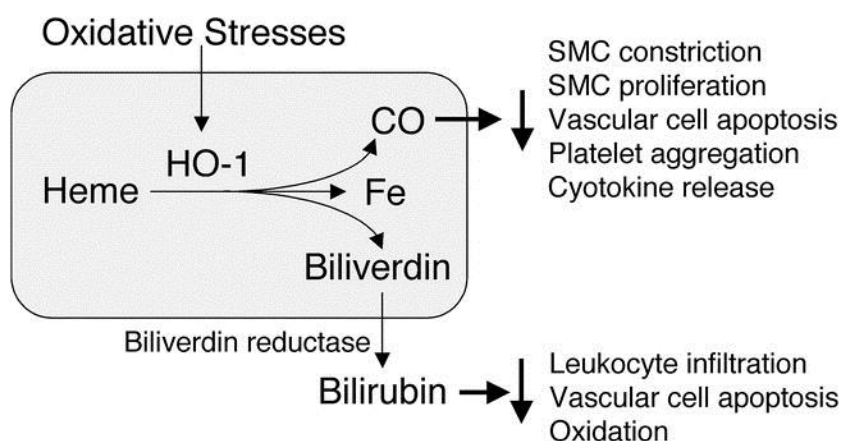
Smooth muscle cell – hladkosvalová buňka, cardiomyocyte – buňka srdeční svaloviny, fibrosis - ztvrdnutí, endothelium – endotel, vasodilatation – vazodilatace, vasoconstriction - vazokonstrikce, proliferation – proliferace, cardiac hypertrophy – srdeční hypertrofie, clearance – odstranění, receptors – receptory, angiogenesis – novotvorba cév, PGs – prostaglandiny

Převzato a upraveno z Rodriguez-Pascual 2011

Působení ET-1 na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění bylo již popsáno v mnoha studiích. ET-1 je spojován s aterosklerózou, diabetem a hypertenzí (Rodriguez-Pascual, a další, 2011). Spojnicí mezi těmito onemocněními může být ED, potvrzená v souvislosti se zvýšenou expresí ET-1 na zvířecím modelu (Amiri, a další, 2004). O vlivu ET-1 na vznik ED svědčí i fakt, že ET-1 se podílí na tvorbě oxidačního stresu aktivací NADPH oxidázy (Li, a další, 2003) a xantin oxidázy (Touyz, a další, 2004). Oba enzymy mohou prohlubovat ED snižováním biodostupnosti NO jeho přeměnou na ONOO^- (Vanhoutte, a další, 2009).

5.4 Hemoxygenáza

Hemoxygenáza (HO) je enzym účastnící se metabolismu hemu, který rozkládá na oxid uhelnatý (CO), biliverdin (BV) a volné železo (Pae, a další, 2008). HO i vzniklé metabolity zastávají v lidském organismu významnou cytoprotektivní funkci, vykazují protizánětlivé a antioxidační účinky. HO existuje ve více izoformách: HO-2 je konstitutivní forma vyskytující se hojně v celém organismu, zatímco HO-1 je forma inducibilní (Ryter, a další, 2006). Expresi HO-1 zvyšují mimo jiné faktory často spojované s onemocněními CVS: diabetes mellitus, dyslipidémie, hypertenze a další (Ryter, a další, 2006). Vliv HO-1 a jednotlivých metabolitů degradace hemu na udržování kardiovaskulární homeostázy je zachycen na Obrázku 8.



Obrázek 8 – Vliv hemoxygenázy a jejích produktů na kardiovaskulární systém

Oxidative stresses – oxidativní stresy, heme – hem, biliverdin reductase – biliverdin reductáza, SMC constriction – stažení hladkosvalových buněk, SMC proliferation – proliferace hladkosvalových buněk, vascular cell apoptosis – apoptóza cévní buňky, platelet aggregation - shlukování destiček, cytokine release – uvolnění cytokínů, leukocyte infiltration - pronikání bílých krevních buněk, oxidation – oxidace

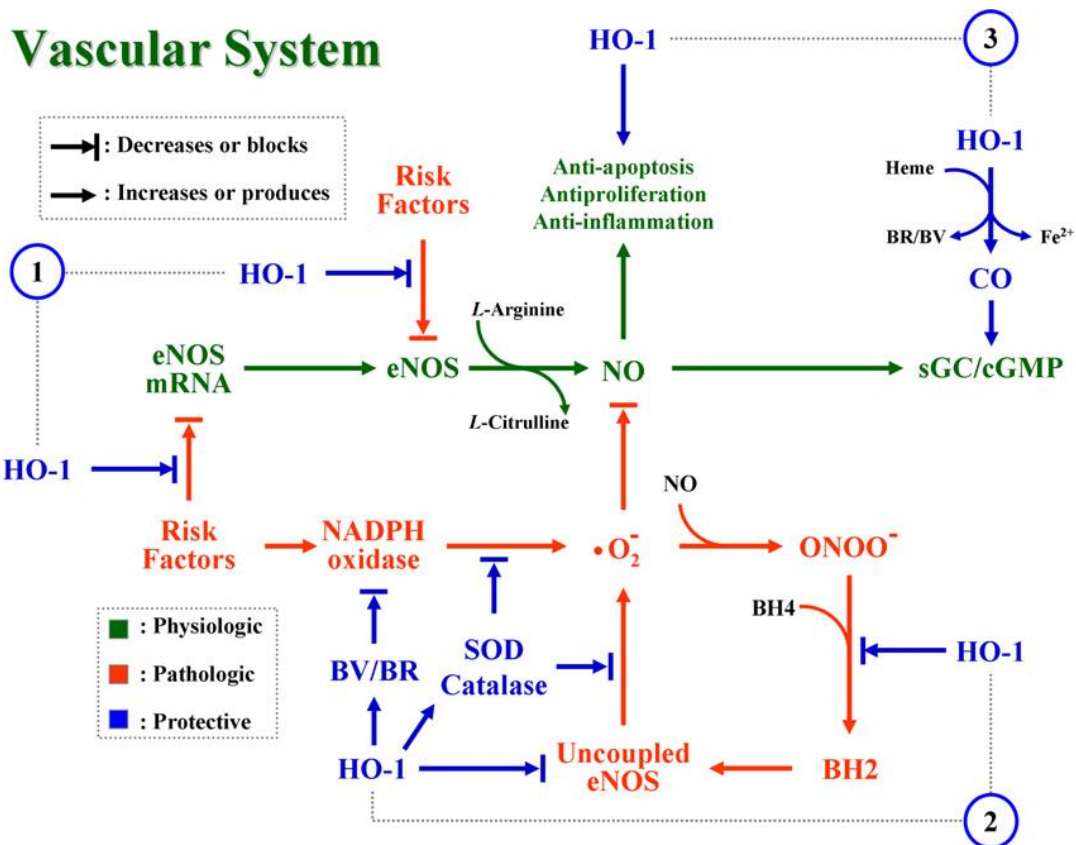
Převzato a upraveno z Ohta & Yachie, 2004

5.4.1 Role hemoxygenázy-1 v regulaci tonu cévy

HO-1, potažmo látky vzniklé jejím působením, ovlivňují tonus cévních hladkosvalových buněk na několika synergických úrovních. Ovlivňují a) množství produkovaného NO, b) expresi eNOS, c) mohou svojí funkcí zastoupit NO.

- a) Produkty působení HO-1 inhibují NADPH oxidázu (Datla, a další, 2007), významný zdroj O_2^- , který zvyšuje hladiny ONOO⁻ na úkor NO (jak bylo popsáno výše). Na mechanismu působení se podílí bilirubin, přirozený metabolit BV a CO (Wang, a další, 2007). Kromě toho HO-1 zvyšuje expresi superoxid dismutázy (SOD) a katalázy, enzymů podílejících se na odbourávání O_2^- a snižování oxidačního stresu (Turkseven, a další, 2005).
- b) Snížení koncentrace ONOO⁻ má pozitivní vliv na hladiny BH₄, koenzymu významného pro funkčnost eNOS (Huang, 2009). Zároveň HO-1 může pod vlivem jaderného transkripčního faktoru Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 - related factor 2) snižovat expresi eNOS a přispívat k jejímu couplingu zachováním stechiometrie mezi BH₄ a eNOS (Heiss, a další, 2009).
- c) CO vykazuje obdobné vazorelaxační účinky jako NO. Působí prostřednictvím cGMP (cyklického guanozin monofosfátu) a v případě snížené dostupnosti NO může tuto ztrátu částečně kompenzovat (Pae, a další, 2010).

Mechanismy, kterými HO-1 udržuje aktivitu NO, znázorňuje Obrázek 9.



Obrázek 9 – Vliv hemoxygenázy na aktivitu oxidu dusnatého

Decreases – snížení, blocks – zábrany, increases – zvýšení, produces – produkce, risk factors - rizikové faktory, anti-apoptosis – protiapoptotický, antiproliferation – antiproliferační, anti-inflammation – protizánětlivý, heme – hem, physiologic – fyziologický, pathologic - patologický, protective – ochranný, katalase – kataláza

Převzato a upraveno z Pae 2010

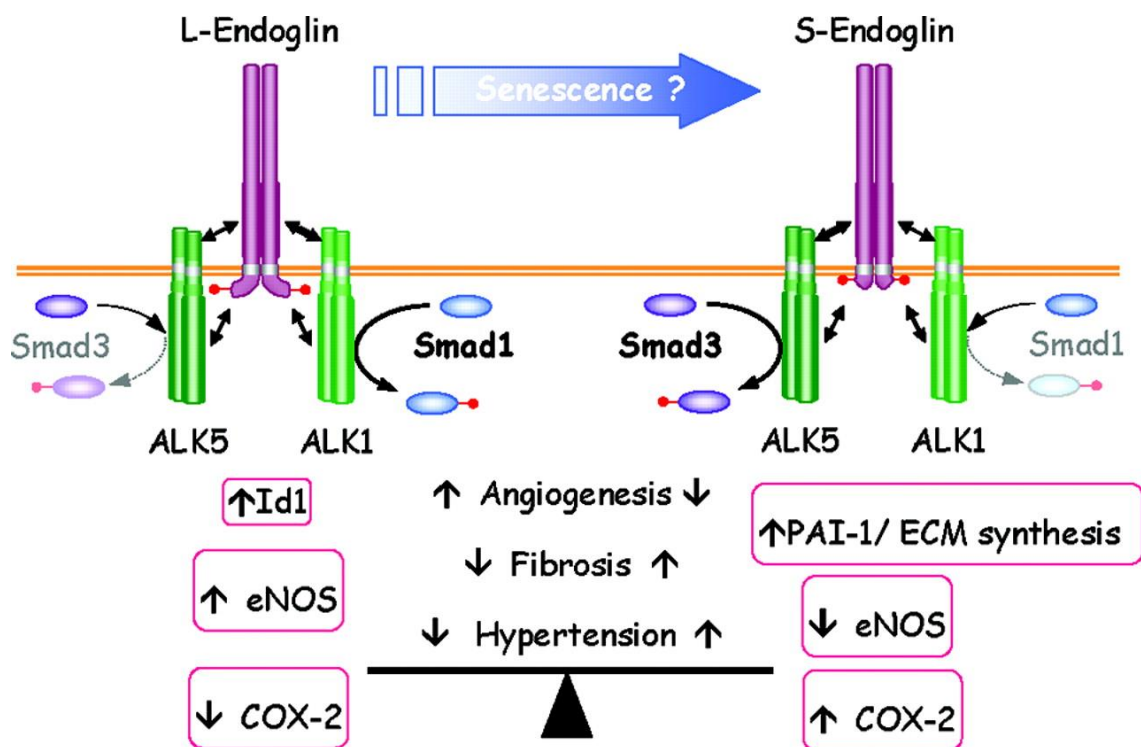
5.5 Endoglin

Endoglin (ENG), označovaný také jako CD 105, je transmembránový glykoprotein sloužící jako doplňkový receptor TGFβ (Santibanez, a další, 2011). Výzkumy poukazují na jeho důležitou roli v angiogenezi (Jonker & Arthur, 2002), aterogenezi (Nachtigal, a další, 2012) a také v modulaci napětí cévní stěny (Jerkic, a další, 2004; Toporsian, a další, 2005). ENG je svojí strukturou homodimer spojený dvěma disulfidickými můstky s extracelulární částí o velikosti 561 aminokyselin, hydrofobní transmembránovou a krátkou intracelulární částí (Lopez-Novoa & Bernabeu, 2010). Byly identifikovány jeho dvě izoformy, které se liší sestřihem, a tedy délkou aminokyselinového řetězce v cytosolické části. Označujeme je short (S-ENG, 14 AMK) a long (L-ENG, 47 AMK). Rozdílné jsou nejen svojí strukturou, ale i svojí funkcí a afinitou k receptorům (Blanco, a další, 2008). Specifický výskyt ENG naznačuje jeho

úlohu v angiogenezi, ale signální dráha TGF β , jejíž je součástí, se účastní celé řady jevů. ENG byl detekován v buňkách endotelu (především v buňkách aktivně se podílejících na novotvorbě cév) (Jonker & Arthur, 2002), v srdečních fibroblastech (Chen, a další, 2004) nebo hladkosvalových buňkách cév postižených aterosklerózou (Conley, a další, 2000). Zvýšená exprese také doprovází stavy hypoxie a cévního poranění (Botella, a další, 2002).

5.5.1 Funkce endoglinu v CVS

Konečný význam ENG pro CVS zatím nebyl zcela objasněn. Ze současných sledování víme, že ENG se účastní formování CVS, angiogeneze a patrně hraje také důležitou roli v procesu aterosklerózy. Kritickou roli má ve formování CVS během fetálního vývoje (Arthur, a další, 2000). Většina současných studií se zaměřuje především na L-formu ENG, která vykazuje protektivní účinky na endotel. Za zmínku stojí závislost exprese eNOS na ENG popsaná různými autory především v souvislosti s hereditární hemoragickou teleangiektázií a novotvorbou cév (Toporsian, a další, 2005; Jerkic, a další, 2004). Tyto studie naznačují spojitost mezi expresí ENG a produkcí NO, ačkoliv uspokojivé závěry zatím nebyly prezentovány. V pokusu na ENG-haploidních myších bylo prokázáno snížení aktivity eNOS spolu se sníženou dilatační odezvou cévy (Jerkic, a další, 2004). V další studii pak při výzkumu dědičné hemoragické teleangiektázie bylo zjištěno, že ENG stabilizuje komplex eNOS/heat shock protein 90 a snižuje tvorbu reaktivního O $_2^-$ (Toporsian, a další, 2005). Ovlivnění eNOS bylo zaznamenáno také na úrovni transkripce. ENG zvyšuje stabilitu Smad2, který je součástí TGF β signální dráhy udržující vaskulární homeostázu (Santibanez, a další, 2007). V souvislosti se zánětem bylo zjištěno, že exprese ENG je zvýšená a koreluje s hladinou T-lymfocytů (Torsney, a další, 2002). Je možné, že podobné mechanismy se uplatňují i v patogenezi MS a ED. S-ENG vykazuje oproti L-ENG antagonistické účinky. Rozdílnost v chování obou izoform je patrně dána rozdílnou afinitou k receptorům TGF β 1. typu, viz Obrázek 10 (Blanco, a další, 2008). Je možné, že poměr obou forem ENG určuje rovnováhu v signální dráze TGF β a v důsledku toho i fyziologickou odpověď.



Obrázek 10 – Hypotetický model působení S a L izoformy ENG

Cox-2 – cyklooxygenáza 2, PAI-1 - inhibitor plazminogenového aktivátoru, ECM – mimobuněčná matrix, senescence – stárnutí, angiogeneze – novotvorba cév, fibrosis – fibróza/zvazivovatění, hypertension – vysoký krevní tlak, Id1 – inhibitor diference

Převzato a upraveno z Blanco 2008

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Vliv CRP na endotel v potkaní aortě byl sledován metodou Western blot s chemiluminiscenční detekcí. Vzorky potkaní aorty byly homogenizovány s inhibitory proteáz a fosfatáz. Proteiny byly rozděleny pomocí gelové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (metoda SDS-PAGE) a převedeny na polyvinylidendifluoridové membrány. Membrány byly blokovány a poté inkubovány primárními protilátkami. Kontrola nanášky proteinů byla provedena pomocí glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy. Vizualizace proteinů byla umožněna sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidázou. Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu na RTG filmy a výsledky byly kvantifikovány denzitometrickou metodou.

6.1 Materiál

6.1.1 Zvířata

V experimentu byli využiti spontánně hypertenzní (SHR) potkaní samci ve věku 16 měsíců a transgenní potkaní samci exprimující lidský C-reaktivní protein. Transgenní potkaní byli získáni mikroinjekcemi obsahujícími cDNA pro lidský CRP do zygot SHR. Exprese CRP byla korigována do jaterní tkáně za využití promotoru apolipoproteinu E.

Zvířata byla rozdělena do 2 skupin:

Skupina 1 (n = 6) – potkan SHR, kontrolní skupina

Skupina 2 (n = 4) – potkan transgenní SHR + CRP lidský

Potkaní byli chováni za konstantní teploty a vlhkosti ve 12ti hodinovém světelném cyklu. Během chovu měli volný přístup k vodě a byli na standardní dietě. Zvířata byla usmrcena v hluboké narkóze a byla jim odebrána aorta, která byla zmražena v tekutém dusíku a uchovávána při -80 °C.

Veškerá manipulace se zvířaty byla prováděna v souladu s pravidly pro práci se zvířaty (Zákon č. 246/1992 Sb., Vyhláška MZ č. 311/1997)“ a schválena etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky.

6.2 Pracovní postup

6.2.1 Gelová elektroforéza

Zpracování vzorků

Vzorky potkaní aorty byly zhomogenizovány v RIPA lyzačním pufru (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) s inhibitory proteáz (SERVA Electrophoresis, Německo) a fosfatáz (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA). Koncentrace proteinů byla stanovena bicinchoninovou metodou (BCA) (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Příprava gelů

Hřeben a skla se odmastily lihem a nechaly volně oschnout. Sestava se upevnila ve stojanu otočením dvířek do boku tak, aby byla zarovnána s podložkou a dobře těsnila. Namíchal se separační gel (separating gel) v koncentraci 10 %, viz Tabulka 2. Pomocí 1ml pipety se jím naplnila komora do ½ vrchního zeleného trámu stojánku (asi 5ml/gel). Gel se opatrně překryl vrstvou sekundárního izobutanolu saturovaného destilovanou H₂O, aby se zamezilo přístupu vzduchu. Hladina izobutanolu se zarovнала s okrajem skel, aby pod ním nezůstaly žádné vzduchové bubliny. Gel se nechal polymerizovat přibližně 1 hodinu, poté se slila vrstva izobutanolu a gel se opláchnul destilovanou vodou (zbytky lze odsát gázou). Vrstva separačního gelu se překryla vrstvou 5% krycího gelu (stacking gel) tak, aby ve vrstvě opět nebyly přítomné vzduchové bubliny. Gel se připravil pro všechny koncentrace separačního gelu stejně koncentrovaný, viz Tabulka 2. Do gelu se vložil hřebínek a každé 2 minuty se po stranách doplňoval pipetou krycí gel až do jeho zatuhnutí.

Příprava vzorků

Vzorky se ředily do 0,5ml mikrozkušavek typu Eppendorf. Vzorek se smísil v poměru 1:1 se vzorkovým Laemmli pufrům s β-merkaptóetanolem, promísil na třepačce a stočil na centrifuze. V termostatu se povařil 5 minut při teplotě 95 °C. Vzorky se před nanášením nechaly vychladnout na laboratorní teplotu.

Tabulka 2 - Příprava gelů

	Separáční gel	Krycí gel
	10% (ml)	5% (ml)
Destilovaná voda	9,8	12,3
Separating gel buffer	5	-
Stacking gel buffer	-	5
Acrylamide-bis Solution	5	2,5
10% SDS	0,2	0,2
10% APS	0,06	0,06
TEMED	0,03	0,03

Pozn. množství je uvedeno pro 2 separační minigely

Elektroforéza a nanesen  vzorků

Připravil se horní elektroforetický pufr a nechal se vychladit. Ze zpolymerizovaného gelu se vysunul hřebínek, aniž by se poškodily vznikl  jamky. Obě skla se vyjmula ze stojánku a jamky se promyly připraveným pufr m. Skla se umístila do aparatury tak, aby kratší sklo směřovalo k těsnění. Zajištěná skla vytvořila prostor pro horní pufr 1D SDS-PAGE, který se dolil až k jejich okraji. Bylo třeba d bře zkontrolovat těsnost aparatury, aby pufr pod skly nepodt kal. Elektroforetická vana se naplnila dolním pufr m 1D SDS-PAGE do jedné poloviny.

Do jamek vzniklých v gelu se pipetovalo 5 µg standardu o známé molekulové hmotnosti (Bio-Rad, CA, USA) a vzorky po 10 µg. Hladina dolního pufru se zarovnal po značku na elektroforetické vaně, která se následně uzavřela víkem s elektrodami. Nastavily se podmínky pro separaci:

- konstantní napětí 200 V
- maximální proud 60 mA/gel

Aparatura se během separace obložila chladítky z hlubokomrazicího boxu. Po vyjetí čela (značeného bromfenolovou modří ve vzorkovém pufru) se vypnul zdroj a slily se oba pufrы. Obě skla se opatrně oddělila tak, aby se gel neporušil. Odřízнул se zaostřovací gel a okraje. Takto upravený gel se přenesl do transferového pufru.

6.2.2 Western blot

PVDF membrána (Milipore, NY, USA) se nastříhala, aby odpovídala velikosti gelu, a označila se v rohu obyčejnou tužkou. S membránami se zacházelo citlivě pinzetou nebo lopatkou. Membrány se postupně aktivovaly 15 sekund ve 100 ml metanolu, pak 2 minuty v destilované H₂O a nakonec se 20 minut třepaly na třepačce v transferovém pufru. Během třepání se pufr 3x vyměnil.

V misce se smočily silné filtrační papíry v transferovém pufru (jsou potřeba 2 na jednu membránu). Do transferového přístroje se pak na anodu umístily silné filtrační papíry podle počtu membrán. Na ně se položily membrány a vytlačily se vzduchové bubliny pod nimi. Gel se opatrně položil na membránu, přikryl dalším silným filtračním papírem a opět se vytlačily bubliny vzduchu. Umístila se katoda a uzavřelo se víko přístroje. Parametry pro 4 blotované gely: konstatní napětí 25 V a 200 mA po dobu 75 min. Po uplynutí předepsaného času se přístroj rozložil a membrány se promyly v destilované vodě. Membrány se vysušily mezi filtračními papíry a byly skladovány při 2-8 °C.

6.2.3 Imunodetekce, chemiluminiscenční detekce

Blokace vazebných míst, inkubace s protilátkami

Membrány se zachycenými proteiny se zaktivovaly 1 minutu v 100 ml metanolu a poté 10 minut ve 100 ml TBS. Následně se membrány blokovaly při pokojové teplotě po dobu 3 hodin ve 100 ml připraveného roztoku 5% mléka s obsahem TBS s 0,1% Tween-20 (TBS-T). Došlo k vyvázání nespecifických vazebných míst na membráně. Následně se membrány inkubovaly 16 hodin s primární protilátkou při teplotě 4 °C. Nanesly se protilátky ředěné 5% mlékem v TBS-T:

- Rabbit polyclonal anti-phospho-eNOS 1:100 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)
- Goat polyclonal anti-endoglin 1:100 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)
- Rabbit polyclonal anti-heme-oxygenase-1 1:2000 (Abcam, Cambridge, UK)
- Mouse monoclonal anti-endothelin-1 1:3000 (Abcam, Cambridge, UK)

K potvrzení nanášky proteinů imunodetekcí se použila myší monoklonální anti-GAPDH protilátka v ředění 1:10000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Inkubace se sekundární protilátkou se provedla na třepačce při pokojové teplotě. Nejprve se membrány na třepačce 8x promyly po 5 minutách v roztoku TBS-T, a poté

se inkubovaly 1 hodinu. Sekundární protilátky se ředily na příslušnou koncentraci 5% mlékem v TBS-T:

- HRP-linked goat anti-rabbit IgG – (Fab)² 1:2000 (Abcam, Cambridge, UK) pro phospho-eNOS
- HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG 1:4000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro ENG
- HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 1:20000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro GAPDH
- HRP-linked goat anti-rabbit IgG – (Fab)² 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK) pro HO-1
- HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 1:6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro ET-1

Provedlo se další promytí na třepačce: 8x promytí po 9 minutách v TBS-T a 1x promytí 5 minut v TBS.

Detekce na RTG filmy

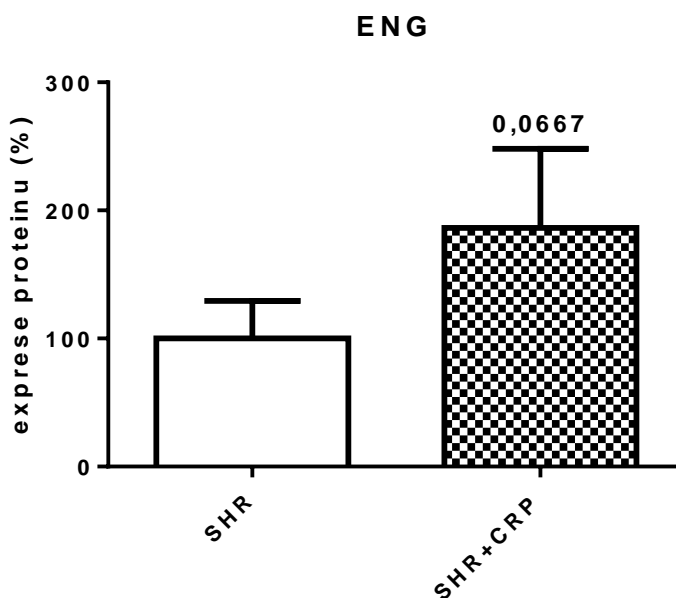
Složky detekčního kitu (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA) se smíchaly v poměru 1:1 a substrát se nanese do velké parafilmové vaničky (1,6 ml na membránu). Promytá membrána se pak vloží do kapky proteiny dolů a nechala se inkubovat. Bylo třeba dobře ponořit celou membránu. Po uplynutí času se membrána lehce osuší a vloží do průhledné folie. Přetřením gázou se vytlačily bubliny vzduchu a folie se upevnila do kazety. V temné komoře se do tří vaniček připravila vývojka, ustalovač a voda. RTG filmy (Foma, ČR) se přikládaly na membrány a po expozici vyvolaly.

6.3 Vyhodnocení, statistické vyhodnocení

Vyhodnocení RTG filmů probíhalo denzitometrickou metodou. Pruhy byly naskenovány a semikvantitativně vyhodnoceny pomocí NIS-Elements software, version 4.0 (Laboratory Imaging, ČR). Statistické hodnocení bylo provedeno použitím softwaru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka průměru (SD, standard deviation). Pro určení statistických významností byla stanovena hladina $p \leq 0,05$. Pro hodnocení statistické významnosti změn mezi skupinami byl použit Mann-Whitneyho test.

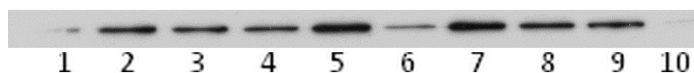
7. VÝSLEDKY

Výsledky znázorňují expresi sledovaných látek ve vzorcích potkaní aorty v závislosti na jednotlivých skupinách. Naše měření ukázala, že aorty SHR potkanů s lidským CRP vykazují vyšší expresi ENG, která v průměru dosahovala téměř dvojnásobných hladin oproti kontrolním SHR potkanům (viz Graf 1). Velmi výrazný nárůst jsme sledovali u exprese phospho-eNOS, kde jsme zaznamenali více než 3x vyšší expresi enzymu než v kontrolní skupině (viz Graf 2). Expresse hemoxygenázy-1 nevykazují výraznější rozdíly mezi skupinami (viz Graf 3). Expresse ET-1 byla jen 87,4 % oproti kontrolní skupině (viz Graf 4). Záznamy z detekce na RTG filmu jsou vyobrazeny na Obrázku 11, Obrázku 12, Obrázku 14 a Obrázku 14. Potvrzení nanášky proteinů pomocí GAPDH viz Obrázek 15.



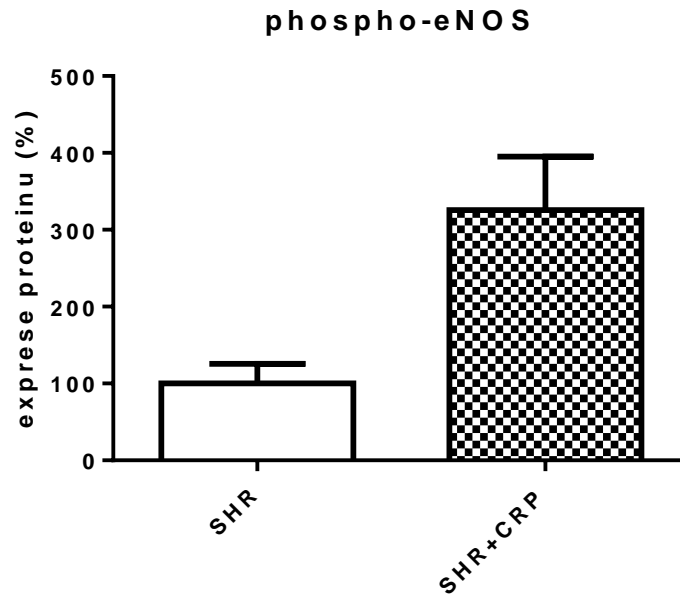
Graf 1 – Expresse endoglinu

Sloupec 1 odpovídá expresi ENG u standardních SHR potkanů. Sloupec 2 odpovídá expresi ENG u SHR potkanů se zvýšenými hladinami lidského CRP, která dosahovala 186,3 % kontroly.



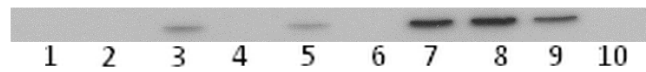
Obrázek 11 – Detekce endoglinu (84 kDa) na RTG filmu

Z leva nanášeno: zvíře 1 až 6 – potkan SHR, zvíře 7-10 potkan transgenní SHR+CRP.



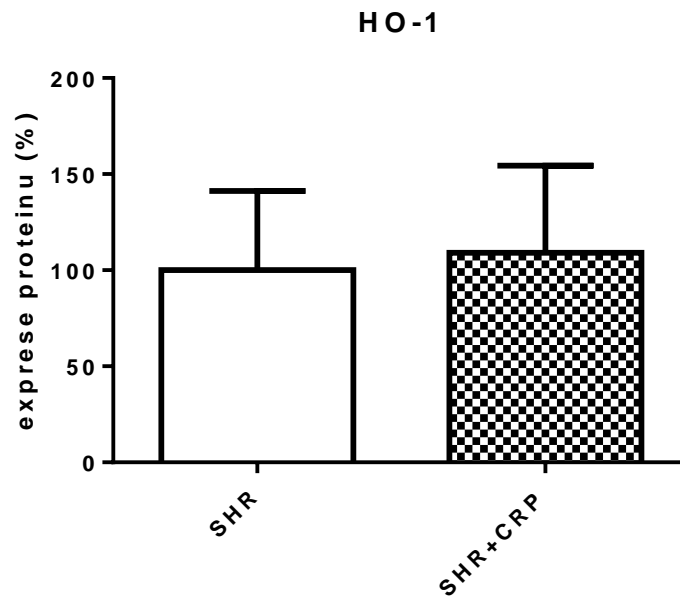
Graf 2 – Exprese phospho-eNOS

Sloupec 1 odpovídá expresi phospho-eNOS u standardních SHR potkanů. Sloupec 2 odpovídá expresi phospho-eNOS u SHR potkanů se zvýšenými hladinami lidského CRP, která dosahovala 325,6 % kontroly.



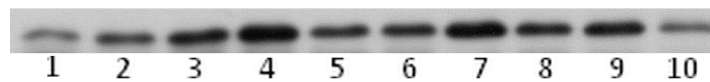
Obrázek 12 – Detekce phospho-eNOS (140 kDa) na RTG filmu

Z leva nanášeno: zvíře 1 až 6 – potkan SHR, zvíře 7-10 potkan transgenní SHR+CRP.



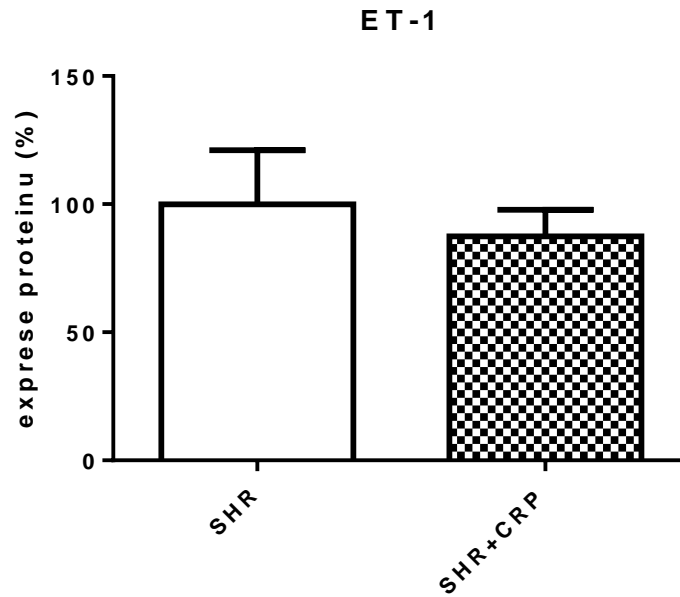
Graf 3 – Expres hemoxygenázy-1

Sloupec 1 odpovídá expresi HO-1 u standardních SHR potkanů. Sloupec 2 odpovídá expresi HO-1 u SHR potkanů se zvýšenými hladinami lidského CRP, která dosahovala 109,0 % kontroly.



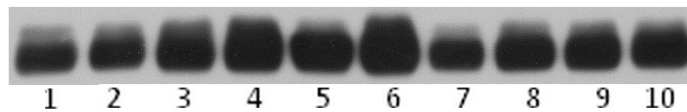
Obrázek 13 – Detekce hemoxygenázy-1 (32 kDa) na RTG filmu

Z leva nanášeno: zvíře 1 až 6 – potkan SHR, zvíře 7-10 potkan transgenní SHR+CRP.



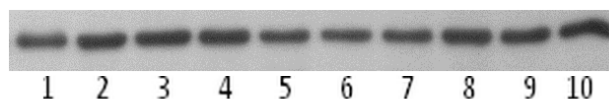
Graf 4 – Expese endotelinu-1

Sloupec 1 odpovídá expresi ET-1 u standardních SHR potkanů. Sloupec 2 odpovídá expresi ET-1 u SHR potkanů se zvýšenými hladinami lidského CRP, která odpovídala 87,4 % kontroly.



Obrázek 14 – Detekce endotelinu-1 (23 kDa) na RTG filmu

Zleva nanášeno: zvíře 1 až 6 – potkan SHR, zvíře 7-10 potkan transgenní SHR+CRP.



Obrázek 15 – Kontrola nanášky proteinů GAPDH (37 kDa)

8. DISKUSE

Mnohé studie prokázaly, že u pacientů vykazujících jednotlivé symptomy MS se také ve velkém procentu naleznou zvýšené hladiny CRP (Haffner, 2006). Předpokládá se, že CRP by mohlo být příčinou snížené vazodilatace cév a rozvoje ED, jevů spojených s patogenezí MS. Mezi mechanismy zmíněnými v této souvislosti patří zvýšený oxidativní stres a uncoupling klíčového enzymu v produkci NO - eNOS (Devaraj, a další, 2009).

Vhodnost studia CRP na myších modelech byla opakovaně zpochybněna z důvodu, že CRP se u myši neúčastní akutní fáze zánětu (Tennent, a další, 2008; Reifenberg, a další, 2005). Z toho důvodu probíhala tato studie na aortách transgenních potkanů se zvýšenou expresí lidského CRP. Tento zvířecí model byl navržen pro sledování dlouhodobého působení CRP a umožňuje sledování chronických onemocnění, mezi které MS patří (Pravenec, a další, 2011).

V minulosti bylo dokázáno, že CRP způsobuje snížení exprese eNOS jak in vitro, tak in vivo (Venugopal, a další, 2002; Hein, a další, 2009). Byl popsán fenomén zvaný uncoupling eNOS, který byl spojen s působením oxidačního stresu (Munzel, a další, 2005). Zdá se, že CRP se podílí na snížení aktivity eNOS více mechanismy: způsobuje zvýšenou aktivitu NADPH oxidázy (významného původce oxidačního stresu) a snižuje aktivitu GTPCH1 (Singh, a další, 2007), což vede k snížené produkci kofaktoru eNOS - BH4. Při sledování účinků HO-1 bylo zjištěno, že může snižovat oxidační stres potlačením funkcí NADPH oxidázy (Datla, a další, 2007) a stimulací enzymů SOD a katalázy (Turkseven, a další, 2005). Sledoval jsem expresi HO-1, abych vyhodnotil její potenciální protektivní účinek ve vztahu k zvýšeným hladinám CRP, ale oproti očekávání jsem nezaznamenal výrazné změny v její expresi.

Fosforylace (především na serinu 1177) výrazně ovlivňuje aktivitu eNOS (Boo, a další, 2006). Hypoteticky může fosforylace být důležitou spojnicí mezi MS a ED. Napovídá tomu několik faktů. Fosforylace je snížena u zvířecích modelů diabetu, aterosklerózy a hypercholesterolémie (Kobayashi, a další, 2004; Naoum, a další, 2004). Naopak zvýšení bylo sledováno vlivem hemodynamického namáhání (Boo & Jo, 2003) a po terapii statiny (Kureishi, a další, 2000). Má měření zaznamenala u transgenních potkanů více než trojnásobný nárůst fosforylované eNOS oproti kontrolní skupině. Toto zjištění nekoresponduje s předpokládanou rolí CRP v rozvoji MS. Naopak předpokládám, že zvýšení fosforylace eNOS může představovat kompenzační mechanismus.

Hlavním zdrojem ET-1 v organismu je endotel, jak bylo potvrzeno na modelu homozygotně knockoutovaných myší (Kisanuki, a další, 2010). Zvýšené hladiny ET-1

byly již dříve popsány u pacientů s hypertenzí (Ferri, a další, 1997) a aterosklerózou (Lerman, a další, 1991). Amiri ve své práci popsal vliv tohoto zvýšení na rozvoj ED (Amiri, a další, 2004). Zároveň formuloval hypotézu, že za zhoršení endotelových funkcí může oxidativní stres podporující činnost NADPH oxidázy. Má měření však překvapivě nezaznamenala žádné změny v expresi ET-1. Zdá se tedy, že hladiny CRP neovlivňují expresi ET-1.

Studie vlivu ENG na cévní systém provedené v rámci výzkumu hereditární hemoragické teleangiectázie naznačují jeho význam pro správnou funkci CVS. Toporsian ve své práci zaznamenal snížení exprese eNOS u ENG haploidních myši a zároveň předpokládá, že ENG pozitivně ovlivňuje vznik komplexu eNOS/Hsp 90. V jeho nepřítomnosti narůstá produkce O_2^- a může docházet k uncouplingu eNOS (Toporsian, a další, 2005). Jeho výsledky potvrzuje další práce, ve které haploidní myši prokázaly sníženou vazodilatační odpověď a nízkou expresi eNOS (Jerkic, a další, 2004). V experimentu in vitro bylo demonstrováno, že ENG zvyšuje expresi eNOS také prostřednictvím zvýšení hladin a stability Smad 2 proteinu (Santibanez, a další, 2007). Mnou sledovaný nárůst exprese ENG u CRP transgenních potkanů by mohl souviset s jeho potenciální protektivní funkcí v kardiovaskulárním systému. Potvrdil se také úzký vztah ENG a aktivity eNOS, nicméně výsledky této pilotní studie si vyžadují další ověření na větším počtu zvířat.

9. ZÁVĚR

V práci byla vyhodnocena exprese endotelinu-1, endoglinu, hemoxygenázy-1 a fosforylované endotelové syntázy oxidu dusnatého v aortách transgenních potkanů, kteří vykazovali zvýšené hladiny CRP. Proteiny byly separovány metodou Western blot a jejich detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu. Získaná data byla semikvantitativně vyhodnocena s následujícími výsledky:

Expresse endotelinu-1 byla 87,4 % kontroly SHR.

Expresse hemoxygenázy-1 byla 109,0 % kontroly SHR.

Expresse endoglinu byla 186,3 % kontroly SHR.

Expresse fosforylované syntázy oxidu dusnatého byla 325,6 % kontroly SHR.

Výsledky této pilotní studie naznačují, že zvýšené hladiny CRP způsobují změny funkce endotelu zejména ve vztahu k endoglinu a oxidu dusnatému. Zda jsou tyto změny pozitivní nebo spíše negativní, ukážou další studie.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

AACE – *the American Association of Clinical Endocrinology*

ADMA – asymetrický dimetylarginin

Akt – kináza podobná aktivinu

AMK – aminokyselina

APS – peroxodisíran amonný

BH2 – dihydrobiopterin

BH4 – tetrahydrobiopterin

BMI – index tělesné hmotnosti

BR – bilirubin

BV – biliverdin

CaM – vápníkem aktivovaný kalmodulin

cGMP – cyklický guanozin monofosfát

CO – oxid uhelnatý

CRH – kortikotropin uvolňující hormon

CRP – C-reaktivní protein

CVD – kardiovaskulární onemocnění

CVS – kardiovaskulární systém

DM2 – diabetes mellitus 2. typu

ECM – mimobuněčná matrix

ED – endotelová dysfunkce

EDCF – endotelem derivovaný kontrakční faktor

EDRF – endotelem derivovaný relaxační faktor

EGIR – *the European Group for the study of Insulin Resistance*

ENG – endoglin

eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého

ET-1 – endotelin-1

ET_A – receptor endotelinu typ A

ET_B – receptor endotelinu typ B

GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GTP – guanozin-5-trifosfát

GTPCH1 – guanozin trifosfát cyklohydroláza 1

HO – hemoxygenáza

HPA – hypotalamo-hypofyzární osa

hs-CRP – vysoce senzitivní C-reaktivní protein

Hsp90 – protein teplotního šoku 90

HTN – vysoký krevní tlak

IDF – *the International Diabetes Federation*

IFG – porucha glukózy nalačno

IGT – porucha glukózové tolerance

IL-6 – interleukín 6

iNOS – inducibilní syntáza oxidu dusnatého

IR – inzulinová rezistence

IRS-1 – substrát inzulinového receptoru 1

LDL – nízkodenzitní lipoprotein

L-ENG – dlouhá izoforma endoglinu

MAP kinase – mitogenem aktivovaná protein kináza

MS – metabolický syndrom

NADPH – nikotinamidinukleotid fosfát

NCEP:ATPIII – *the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*

nNOS – neuronální syntáza oxidu dusnatého

NO – oxid dusnatý

NOS – syntáza oxidu dusnatého

PAI-1 – inhibitor plazminogenového aktivátoru

phospho-eNOS – fosforylovaná endotelová syntáza oxidu dusnatého

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

PKG – protein kináza G

SDS – dodecylsírán sodný

SDS-PAGE – SDS-polykrylamidová gelová elektroforéza

S-ENG – krátká izoforma endoglinu

ser – serin

sGC – rozpustná guanylátcykláza

SHR – spontánně hypertenzní potkan

SMC – hladkosvalová buňka

SOD – superoxid dismutáza

TBS – tris pufr hydrochlorid

TEMED – tetrametyletylendiamin

TG – trygliceridy

TGF β – transformující růstový faktor β

Thr – threonin

TNF α – tumor nekrotizující faktor α

TRIS – tris(hydroxymetyl)aminometan

UP4A – uridin adenosin tetrafosfát

WHO – Světová zdravotnická organizace

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Kritéria metabolického syndromu podle vybraných institucí.....	11
Tabulka 2 - Příprava gelů	28

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Schéma faktorů ovlivňujících patofyziologii MS.....	12
Obrázek 2 – Intraluminální a extraluminální působení endotelu.....	14
Obrázek 3 – Vliv působků endotelu na hladkosvalové buňky	15
Obrázek 4 – Mechanismy endotelové dysfunkce	17
Obrázek 5 – Signální dráha inzulinu v endotelu	18
Obrázek 6 – Schéma možné inhibice eNOS vlivem CRP	19
Obrázek 7 – Působení endotelinu-1 na kardiovaskulární systém.....	20
Obrázek 8 – Vliv hemoxygenázy a jejích produktů na kardiovaskulární systém	21
Obrázek 9 – Vliv hemoxygenázy na aktivitu oxidu dusnatého	23
Obrázek 10 – Hypotetický model působení S a L izoformy ENG	25
Obrázek 11 – Detekce endoglinu (84 kDa) na RTG filmu.....	31
Obrázek 12 – Detekce phospho-eNOS (140 kDa) na RTG filmu	32
Obrázek 13 – Detekce hemoxygenázy-1 (32 kDa) na RTG filmu	33
Obrázek 14 – Detekce endotelinu-1 (23 kDa) na RTG filmu	34
Obrázek 15 – Kontrola nanášky proteinů GAPDH (37 kDa)	34

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Expres endoglinu	31
Graf 2 – Expres phospho-eNOS.....	32
Graf 3 – Expres hemoxygenázy-1.....	33
Graf 4 – Expres endotelinu-1	34

14. POUŽITÁ LITERATURA

Amiri, F., Viridis, A., Neves, M. F., Iglarz, M., Seidah, N. G., Touyz, R. M., a další. (2004). Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *CIRCULATION*, 110 (15), stránky 2233-2240.

Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., a další. (2000). Endoglin, an ancillary TGF beta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 217 (1), stránky 42-53.

Bacon, C. R., Davenport, A. P. (1996). Endothelin receptors in human coronary artery and aorta. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 117 (5), stránky 986-992.

Bagnall, A. J., Kelland, N. F., Gulliver-Sloan, F., Davenport, A. P., Gray, G. A., Yanagisawa, M., a další. (2006). Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *HYPERTENSION*, 48 (2), stránky 286-293.

Blanco, F. J., Grande, M. T., Langa, C., Oujo, B., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., a další. (2008). S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology. *CIRCULATION RESEARCH*, 103 (12), stránky 1383-U91.

Bonora, E., Kiechl, S., Willeit, J., Oberhollenzer, F., Egger, G., Targher, G., a další. (1998). Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders - The Bruneck Study. *DIABETES*, 47 (10), stránky 1643-1649.

Boo, Y. C., Jo, H. (2003). Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY*, 285 (3), stránky C499-C508.

Boo, Y. C., Kim, H. J., Song, H., Fulton, D., Sessa, W., Jo, H. (2006). Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 41 (1), stránky 144-153.

Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., a další. (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *BLOOD*, 100 (12), stránky 4001-4010.

Bultas, J., Cífková, R., Češka, R., Horký, K., Hradec, J. (1999). *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční* (Sv. 2). Praha: Galén.

- Calabro, P., Willerson, J., Yeh, E. (2003). Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *CIRCULATION*, 108 (16), stránky 1930-1932.
- Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M., Bernabeu, C., Vary, C. (2000). Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *ATHEROSCLEROSIS*, 153 (2), stránky 323-335.
- Cornier, M.-A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. L., Stob, N. R., a další. (2008). The Metabolic Syndrome. *ENDOCRINE REVIEWS*, 29 (7), stránky 777-822.
- Datla, S. R., Dusting, G. J., Mori, T. A., Taylor, C. J., Croft, K. D., Jiang, F. (2007). Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase-derived oxidative stress. *HYPERTENSION*, 50 (4), stránky 636-642.
- Devaraj, S., Singh, U., Jialal, I. (2009). Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY*, 20 (3), stránky 182-189.
- Devaraj, S., Valleggi, S., Siegel, D., Jialal, I. (2010). Role of C-Reactive Protein in Contributing to Increased Cardiovascular Risk in Metabolic Syndrome. *CURRENT ATHEROSCLEROSIS REPORTS*, 12 (2), stránky 110-118.
- Endemann, D. H., Schiffrin, E. L. (2004). Endothelial dysfunction. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY*, 15 (8), stránky 983-992.
- Esper, R. J., Nordaby, R. A., Vilarino, J. O., Paragano, A., Cacharron, J. L., Machado, R. A. (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *CARDIOVASCULAR DIABETOLOGY*, 5 (4).
- Fejfar, Z., Přerovský, I. (2002). *Klinická fyziologie krevního oběhu* (Třetí, přepracované a rozšířené vydání. vyd.). Praha: Galén.
- Ferri, C., Bellini, C., Desideri, G., Mazzocchi, C., DeSati, L., Santucci, A. (1997). Elevated plasma and urinary endothelin-1 levels in human salt-sensitive hypertension. *CLINICAL SCIENCE*, 93 (1), stránky 35-41.
- Festa, A., D'Agostino, R., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R., Haffner, S. (2000). Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome – The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *CIRCULATION*, 102 (1), stránky 42-47.
- Fichtlscherer, S., Rosenberger, G., Walter, D., Breuer, S., Dimmeler, S., Zeiher, A. (2000). Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *CIRCULATION*, 102 (9), stránky 1000 - 1006.

- Ford, E. S., Li, C., Sattar, N. (2008). Metabolic syndrome and incident diabetes - Current state of the evidence. *DIABETES CARE*, 31 (9), stránky 1898-1904.
- Furchgott, R., Zawadzki, J. (1980). The obligatory role of endothelial-cells in the relaxation of arterial smooth-muscle by acetylcholine. *NATURE*, 288 (5789), stránky 373-376.
- Gami, A. S., Witt, B. J., Howard, D. E., Erwin, P. J., Gami, L. A., Somers, V. K., a další. (2007). Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death – A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY*, 49 (4), stránky 403-414.
- Haffner, S. M. (2006). The metabolic syndrome: Inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY*, 97 (2A), stránky 3A-11A.
- Hein, T. W., Singh, U., Vasquez-Vivar, J., Devaraj, S., Kuo, L., Jialal, I. (2009). Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *ATHEROSCLEROSIS*, 206 (1), stránky 61-68.
- Heiss, E. H., Schachner, D., Werner, E. R., Dirsch, V. M. (2009). Active NF-E2-related Factor (Nrf2) Contributes to Keep Endothelial NO Synthase (eNOS) in the Coupled State role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 284 (46), stránky 31579-31586.
- Hillier, T. A., Fagot-Campagna, A., Eschwege, E., Vol, S., Cailleau, M., Balkau, B. (2006). Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: The DESIR Cohort. *INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY*, 35 (1), stránky 190-196.
- Huang, P. L. (2009). eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM*, 20 (6), stránky 295-302.
- Chen, K., Mehta, J. L., Li, D. Y., Joseph, L., Joseph, J. (2004). Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *CIRCULATION RESEARCH*, 95 (12), stránky 1167-1173.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J. V., Prieto, M., Carrón, R., Sanz-Rodríguez, F., Pérez-Barriocanal, F., a další. (2004). Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB JOURNAL*, 18 (1), stránky 609-+.
- Jonker, L., Arthur, H. M. (2002). Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *MECHANISMS OF DEVELOPMENT*, 110 (1-2), stránky 193-196.

- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC MEDICINE*, 9.
- Kelland, N. F., Kuc, R. E., McLean, D. L., Azfer, A., Bagnall, A. J., Gray, G. A., a další. (2010). Endothelial cell-specific ETB receptor knockout: autoradiographic and histological characterisation and crucial role in the clearance of endothelin-1. *CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 88 (6), stránky 644-651.
- Kisanuki, Y. Y., Emoto, N., Ohuchi, T., Widyantoro, B., Yagi, K., Nakayama, K., a další. (2010). Low Blood Pressure in Endothelial Cell-Specific Endothelin 1 Knockout Mice. *HYPERTENSION*, 56 (1), stránky 121-U193.
- Kobayashi, T., Taguchi, K., Yasuhiro, T., Matsumoto, T., Kamata, K. (2004). Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. *HYPERTENSION*, 44 (6), stránky 956-962.
- Kureishi, Y., Luo, Z. Y., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D. J., a další. (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *NATURE MEDICINE*, 6 (9), stránky 1004-1010.
- Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., Heublein, D. M., Sandberg, S. M., Burnett, J. C. (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 325 (14), stránky 997-1001.
- Li, L. X., Fink, G. D., Watts, S. W., Northcott, C. A., Galligan, J. J., Pagano, P. J., a další. (2003). Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *CIRCULATION*, 107 (7), stránky 1053-1058.
- Lopez-Novoa, J. M., Bernabeu, C. (2010). The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY*, 299 (4), stránky H959-H974.
- Miyachi, T., Masaki, T. (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *ANNUAL REVIEW OF PHYSIOLOGY*, 61, stránky 391-415.
- Mottillo, S., Filion, K. B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., a další. (2010). The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk A Systematic Review and Meta-Analysis. *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY*, 56 (14), stránky 1113-1132.
- Munzel, T., Daiber, A., Mulsch, A. (2005). Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *CIRCULATION RESEARCH*, 97 (7), stránky 618-628.
- Nachtigal, P., Zemankova, L., Rathouska, J., Strasky, Z. (2012). The role of endoglin in atherosclerosis. *ATHEROSCLEROSIS*, 224 (1), stránky 4-11.

- Naoum, J. J., Zhang, S., Woodside, K. J., Song, W., Guo, Q., Belalcazar, L. M., a další. (2004). Aortic eNOS expression and phosphorylation in Apo-E knockout mice: Differing effects of rapamycin and simvastatin. *SURGERY*, 136 (2), stránky 323-328.
- Ohta, K., Yachie, A. (2004). Development of vascular biology over the past 10 years: Heme oxygenase-1 in cardiovascular homeostasis. *JOURNAL OF ENDOVASCULAR THERAPY*, 11 (2), stránky 140-150.
- Pae, H.-O., Kim, E.-C., Chung, H.-T. (2008). Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites. *JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION*, 42 (3), stránky 197-203.
- Pae, H.-O., Son, Y., Kim, N.-H., Jeong, H. J., Chang, K. C., Chung, H.-T. (2010). Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. *NITRIC OXIDE-BIOLOGY AND CHEMISTRY*, 23 (4), stránky 251-257.
- Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E., Epstein, S. E. (1990). ABNORMAL ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASCULAR RELAXATION IN PATIENTS WITH ESSENTIAL-HYPERTENSION. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 323 (1), stránky 22-27.
- Pravenec, M., Kajiya, T., Zidek, V., Landa, V., Mlejnek, P., Simakova, M., a další. (2011). Effects of Human C-Reactive Protein on Pathogenesis of Features of the Metabolic Syndrome. *HYPERTENSION*, 57 (4), stránky 731-+.
- Reifenberg, K., Lehr, H. A., Baskal, D., Wiese, E., Schaefer, S. C., Black, S., a další. (2005). Role of C-reactive protein in atherogenesis - Can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY*, 25 (8), stránky 1641-1646.
- Rodriguez-Pascual, F., Busnadiego, O., Lagares, D., Lamas, S. (2011). Role of endothelin in the cardiovascular system. *PHARMACOLOGICAL RESEARCH*, 63 (6), stránky 463-472.
- Ryter, S. W., Alam, J., Choi, A. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 86 (2), stránky 583-650.
- Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C., a další. (2007). Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, 210 (2), stránky 456-468.
- Santibanez, J. F., Quintanilla, M., Bernabeu, C. (2011). TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *CLINICAL SCIENCE*, 121 (5-6), stránky 233-251.

- Singh, U., Sridevi, D., Vasquez-Vivar, J., Ishwarlal, J. (2007). C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY*, 43 (6), stránky 780-791.
- Tang, E., Vanhoutte, P. M. (2010). Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY*, 459 (6), stránky 995-1004.
- Tennent, G. A., Hutchinson, W. L., Kahan, M. C., Hirschfield, G. M., Gallimore, J. R., Lewin, J., a další. (2008). Transgenic human CRP is not pro-atherogenic, pro-atherothrombotic or pro-inflammatory in apoE(-/-) mice. *ATHEROSCLEROSIS*, 196 (1), stránky 248-255.
- Thony, B., Auerbach, G., Blau, N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *BIOCHEMICAL JOURNAL*, 347 (1), stránky 1-16.
- Thorin, E., Webb, D. J. (2010). Endothelium-derived endothelin-1. *PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY*, 459 (6), stránky 951-958.
- Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., a další. (2005). A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *CIRCULATION RESEARCH*, 96 (6), stránky 684-692.
- Torsney, E., Charlton, R., Parums, D., Collis, M., Arthur, H. M. (2002). Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *INFLAMMATION RESEARCH*, 51 (9), stránky 464-470.
- Touyz, R. M., Yan, G., Viel, E., Amiri, F., Schiffrin, E. L. (2004). Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *JOURNAL OF HYPERTENSION*, 22 (6), stránky 1141-1149.
- Turkseven, S., Kruger, A., Mingone, C. J., Kaminski, P., Inaba, M., Rodella, L. F., a další. (2005). Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY*, 289 (2), stránky H701-H707.
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E., Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *ACTA PHYSIOLOGICA*, 196 (2), stránky 193-222.
- Venugopal, S. K., Devaraj, S., Yuhanna, I., Shaul, P., Jialal, I. (2002). Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *CIRCULATION*, 106 (12), stránky 1439-1441.

Wang, X., Wang, Y., Kim, H. P., Nakahira, K., Ryter, S. W., Choi, A. (2007). Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 282 (3), stránky 1718-1726.

Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T. (1990). CLONING OF A CDNA-ENCODING A NON-ISYPEPTIDE-SELECTIVE SUBTYPE OF THE ENDOTHELIN RECEPTOR. *NATURE*, 348 (6303), stránky 732-735.

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E., McGeer, P. (2001). Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 158 (3), stránky 1039-1051.