

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Eliška Misárková

Fenotypová plasticita cévních hladkosvalových buněk

Phenotypic plasticity of smooth muscle cells

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Josef Zicha, DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce MUDr. Josefu Zichovi, DrSc. za cenné rady při zpracování práce. Poděkování si zaslouží všichni zaměstnanci oddělení experimentální hypertenze ve Fyziologickém ústavu AVČR, zejména pak Mgr. Michal Bencze za trpělivost při zasvěcování do problematiky myografie a Mgr. Michal Behuliak, PhD. za sdílení komplexního pohledu na problematiku fenotypové plasticity. Současně bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc., který svolil být garantem mé práce v rámci Přírodovědecké fakulty.

Abstrakt

Cévní hladkosvalové buňky vykazují jistou míru fenotypové plasticity. Za určitých podmínek jsou plně diferencované buňky schopné projít procesem dediferenciace a „restartovat“ tím program růstu a proliferace. Pro studium dediferenciace buněk hladkého svalu cév je vhodná metoda orgánové kultury, která umožňuje studovat změny fenotypu buněk. Cílem práce bylo objasnit základní charakteristiky kontraktility potkaních femorálních artérií kultivovaných v médiu po různou dobu (jeden až tři dny). Dále byl studován účinek fetálního hovězího séra obsahujícího množství růstových faktorů a jiných biologicky aktivních molekul na kontraktilitu artérií. Vedle toho jsme se snažili oslabit proces dediferenciace omezením vstupu extracelulárního vápníku, který je důležitým druhým poslem dějů spojených mimo jiné s růstem a proliferací buněk. K tomu jsme využili kultivaci s nifedipinem, inhibitorem napětím ovládaných vápníkových kanálů. Kultivace v podmínkách bez fetálního hovězího séra jen mírně snižuje kontraktilitu artérií, naproti tomu kultivace se sérem kontraktilitu výrazně oslabuje. K hlavní změně kontraktility vyvolané kultivací se sérem dochází již po 24 hodinách kultivace. Kultivace s nifedipinem zlepšuje kontraktilitu femorálních artérií. V průběhu orgánové kultury dochází nejen ke snížení arteriální kontraktility, ale i ke kvalitativním změnám na vápníku závislých složek arteriální kontrakce.

Klíčová slova: cévní hladkosvalové buňky; fenotypová plasticita, orgánová kultura

Abstract

Vascular smooth muscle cells display a certain level of phenotype plasticity. Under specific conditions fully differentiated cells are able to undergo dedifferentiation and to restart growth and proliferation. An organ culture method is a useful technique for the analysis of dedifferentiation of vascular smooth muscle cells, because it provides an opportunity for studying the changes in cell phenotype. The aim of this study was to investigate the basic contractile characteristics in rat femoral arteries cultured for different time periods (from one to three days). In addition, the effects of fetal bovine serum (FBS), that contains various growth factors and other biological active molecules, on contractile function were studied. We also tried to attenuate cell dedifferentiation by lowering the calcium influx, because calcium is an important second messenger participating in cell growth and proliferation. To achieve this goal we used cultivation with nifedipine, a voltage-dependent calcium channel inhibitor. The cultivation without FBS slightly decreased arterial contractility, whereas the cultivation with FBS decreased arterial contractility considerably. The major change in contractility of arteries cultivated with FBS occurred approximately within 24 hours of cultivation. The cultivation with nifedipine improved the contractility of femoral arteries. Apart from a lower arterial contractility, there are also important changes in the contribution of different components of calcium-dependent arterial contraction in the course of the organ culture.

Keywords: vascular smooth muscle cells; phenotype plasticity, organ culture

Obsah

Seznam zkratk	2
1 Úvod	4
2 Spřažení excitace a kontrakce	5
2.1 Vápníková signalizace.....	5
2.1.1 Vápníkové kanály.....	6
2.2 Vápníková senzitivace	8
2.3 Vybrané typy vazokonstrikce	10
2.3.1 K ⁺ -indukovaná kontrakce	10
2.3.2 Fenylefrinová kontrakce	10
2.3.3 Tromboxanová kontrakce	11
2.3.4 Serotoninová kontrakce	12
3 Spřažení excitace a transkripce	14
3.1 Faktor odpovídající na sérum (SRF)	14
3.2 Protein vázající se na cAMP-odpovídající element promoteru (CREB)	15
3.3 Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (NFAT)	16
4 Modulace fenotypu	18
5 Orgánová kultura	19
Cíle diplomové práce	20
Metodika	21
Výsledky	24
Diskuze	40
Závěr	46
Literatura	47

Seznam zkratek

- [Ca²⁺]_i – intracelulární koncentrace vápníku (intracellular calcium concentration)
- 2-APB - 2-aminoethoxydifenyl borát (2-Aminoethoxydiphenyl borate)
- 5-HT_{2A}R – serotoninový receptor (5-hydroxytryptamine receptors _{2A})
- AR – adrenergní receptor (adrenergic receptor)
- BK_{Ca} – vysokovodivostní na vápníku závislý draslíkový kanál (big conductance potassium channel)
- CaM – kalmodulin (calmodulin)
- CaMK – kalcium/kalmodulin dependentní proteinkináza (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase)
- cAMP – cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
- cGMP – cyklický guanosinmonofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
- CRE - cAMP-odpovídající element promoteru (cAMP response element)
- CREB - protein vázající se na cAMP-odpovídající element promoteru (cAMP response element-binding protein)
- CPI-17 - hladkosvalově-specifický inhibiční protein fosfatázy lehkého řetězce myosinu (C-kinase potentiated Protein phosphatase-1 Inhibitor)
- DAG – 1,2-diacylglycerol (1,2-diacylglycerol)
- DMEM - Dulbeccem modifikované Eagleho minimální esenciální médiu (Dulbecco's modified Eagle's medium)
- FBS – fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
- GPCR – receptor spřažený s G-proteinem (G protein-coupled receptors)
- IP₃ – inositol-1,4,5- trisfosfát (inositol-1,4,5- trisphosphate)
- IP₃R – inositoltrisfosfátový receptor (inositol trisphosphate receptor)
- KPSS – roztok o vysoké koncentraci K⁺ (high potassium physiological salt solution)
- L-VDCC - napěťově ovládané vápníkové kanály typu L (L-type voltage-dependent calcium channels)
- MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen-activated protein kinase)
- MEF2 – zesilující faktor myocytů 2 (myocyte-specific enhancer factor 2)
- MLCK – kináza lehkého řetězce myosinu (myosin light-chain kinase)
- MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myosinu (myosin light-chain phosphatase)
- MRTF – transkripční faktory příbuzné myokardinu (myocardin-related transcription factor)
- NFAT – jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (nuclear factor of activated T-cells)
- Orai – pór formující molekula (calcium release-activated calcium channel protein)
- PDGF – destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
- PKC – proteinkináza C (protein kinase C)
- PLC – fosfolipáza C (phospholipase C)
- PSS – fyziologický roztok (physiological saline solution)
- ROC – receptorem aktivované kanály (receptor-operated channel)
- ROK – Rho-kináza (Rho-associated protein kinase)
- RyR – Ryanidonové receptory (ryanodine receptor)

SERCA – váníková ATPáza sarkoplazmatického retikula
siRNA – malá interferující RNA (short interfering RNA)
SOC – kanály závislé na depleci vnitřních zásobáren (store-operated channel)
SRF – faktor odpovídající na sérum (serum response factor)
STIM – stromální interagující molekula (stromal interaction molecule 1)
TRP – neselektivní kationtové kanály (transient receptor potential channels)
T-VDCC – napět'ově ovládané vápníkové kanály typu T (T-type voltage-dependent calcium channels)
TxA₂R – tromboxanový receptor (thromboxane receptor A₂)
VSMC – cévní hladkosvalové buňky (vascular smooth muscle cell)

1 Úvod

Cévní hladkosvalové buňky (VSMC) se významně podílejí na kontrakci cév a regulaci krevního tlaku. Abnormality v kontraktálním aparátu VSMC jsou zapojeny do patogeneze mnoha kardiovaskulárních nemocí. Na rozdíl od kardiomyocytů a buněk kosterních svalů, které procházejí terminální diferenciací, VSMC dospělých jedinců si udržují plasticitu a plynule přecházejí z diferencovaného (kontraktálního) do dediferencovaného (proliferujícího) fenotypu a opačně. V případě potřeby jsou VSMC schopné přizpůsobit se novým podmínkám. Mezi takové případy patří angiogeneze, remodelace cév po poranění, cévní nemoci jako například ateroskleróza a další, jejichž součástí mohou být změny koncentrace růstových faktorů, cytokinů nebo proteinů extracelulární matrix. Součástí adaptace VSMC je změna genové exprese a celková změna fenotypu buňky. V minulosti se uvažovalo, že cesty vedoucí ke kontrakci nebo k proliferaci, jsou striktně odděleny, ale nyní existují důkazy, že tyto cesty jsou velmi úzce propojené. Běžně se používá termín „spřažení excitace a kontrakce“ a „spřažení excitace a transkripce“, které v jednoduchosti vyjadřují spojení excitace buňky s její kontrakcí a/nebo s transkripcí genů.

2 Spřažení excitace a kontrakce

Stimulace VSMC vazokonstrikčním agonistou vede k fosforylaci 20 kDa regulační podjednotky lehkého řetězce myosinu, která zvyšuje myosinovou ATPázovou aktivitu a zesiluje kontrakci (Somlyo a Somlyo, 2003). Na regulaci fosforylovaného/defosforylovaného stavu lehkého řetězce myosinu se podílí dva protichůdně pracující proteiny: kináza lehkého řetězce myosinu (MLCK) a fosfatáza lehkého řetězce myosinu (MLCP). Souhrnné schéma je možné vidět na obrázku 1 Spřažení excitace a kontrakce na straně 9.

2.1 Vápníková signalizace

Podstatou vápníkové signalizace je zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ a aktivace MLCK kalmodulem (CaM) s navázaným vápníkem (Isotani et al., 2004). Následná fosforylace lehkého řetězce myosinu je součástí kontrakce VSMC. Vstup Ca^{2+} do buňky je asociován obecně s aktivací $G_{q/11}$ podjednotky trimerního G proteinu. $G_{q/11}$ aktivuje fosfolipázu C_β (PLC_β), která štěpí fosfatidylinositolu na druhé posly: inositoltrisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG) (Wu et al., 1992). IP_3 se váže na své receptory v sarkoplazmatickém retikulu a uvolňuje do cytosolu Ca^{2+} z vnitřních zásob (Berridge, 1993). DAG může aktivovat receptorem aktivované kanály (ROC), které jsou pravděpodobně součástí rodiny neselektivních kationtových kanálů (TRP) (Albert a Large, 2002) (viz kapitola 2.1.1.2 Neselektivní kationtové kanály). Tyto dva děje vedou k depolarizaci buňky, otevření na napětí závislých Ca^{2+} kanálů typu L (L-VDCC) a masivnímu vstupu Ca^{2+} do buňky. Ca^{2+} se váže na CaM a společně aktivují MLCK (viz obr. 1 Spřažení excitace a kontrakce; strana 9). Uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula otevírá kanály závislé na vnitřních zásobách (SOC), pravděpodobně také TRP, což způsobí pomalý nárůst $[Ca^{2+}]_i$ (Smani et al., 2004). Mezitím dochází k aktivaci vysokovodivostního na Ca^{2+} závislého kanálu pro draslík (BK_{Ca}), hyperpolarizaci membrány a zavření L-VDCC (Nelson et al., 1995). $[Ca^{2+}]_i$ je dále ovlivněna Ca^{2+} ATPázami sarkoplazmatického retikula (SERCA) respektive plazmatické membrány a Ca^{2+} výměníky (Na/Ca výměník), které ji výrazně snižují (Berra-Romani et al., 2008).

2.1.1 Vápníkové kanály

Ve VSMC existují dva důležité typy kanálů umožňující vstup Ca^{2+} do buňky. Kanály na napětí závislé a na napětí nezávislé přinášejí do buňky odlišný Ca^{2+} signál, který odlišně reguluje expresi genů a syntézu proteinů.

2.1.1.1 Vysokovodivostní napětově ovládané Ca^{2+} kanály

Vysokovodivostní napětově ovládané Ca^{2+} kanály (L-VDCC) představují primární cestu vstupu Ca^{2+} do buňky u diferencovaných VSMC. L-VDCC jsou aktivovány depolarizací, mají vysokou vodivost a pomalou inaktivaci (Catterall, 2000). Vstup Ca^{2+} přes L-VDCC je esenciální pro spřažení excitace a kontrakce a tudíž i pro regulaci krevního tlaku. Vedle toho může L-VDCC ovlivňovat i genovou expresi aktivací na Ca^{2+} závislých transkripčních faktorů (spřažení excitace a transkripce). Během dediferenciace se snižuje množství funkčních L-VDCC na povrchu buňky (Gollasch et al., 1998). To, že funkční L-VDCC úzce souvisí s diferencovaným stavem VSMC, naznačují i další studie. U proliferujících VSMC vedlo zablokování mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) k zvýšenému množství α_{1C} pór formující podjednotky L-VDCC a funkčních L-VDCC (Ihara et al., 2002). MAPK je obecně spojována s růstem, migrací a proliferací VSMC (Pulver-Kaste et al., 2006, Tokunou et al., 2001, Xi et al., 1999). Zablokování L-VDCC u diferencovaných mesenterických artérií pomocí transfekce siRNA vedlo k zvýšení bazální $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a snížení exprese markerových genů VSMC (Kudryavtseva et al., 2014). U dediferencovaných buněk byl nalezen další typ VDCC, T-VDCC (Kuga et al., 1996), který je aktivován při nízkém napětí, má malou vodivost a je rychle inaktivovatelný (Perez-Reyes, 2003). Zdá se, že se jedná o kompenzační mechanismus, který vedle TRP hraje u dediferencovaných buněk důležitou roli při vstupu Ca^{2+} do buňky.

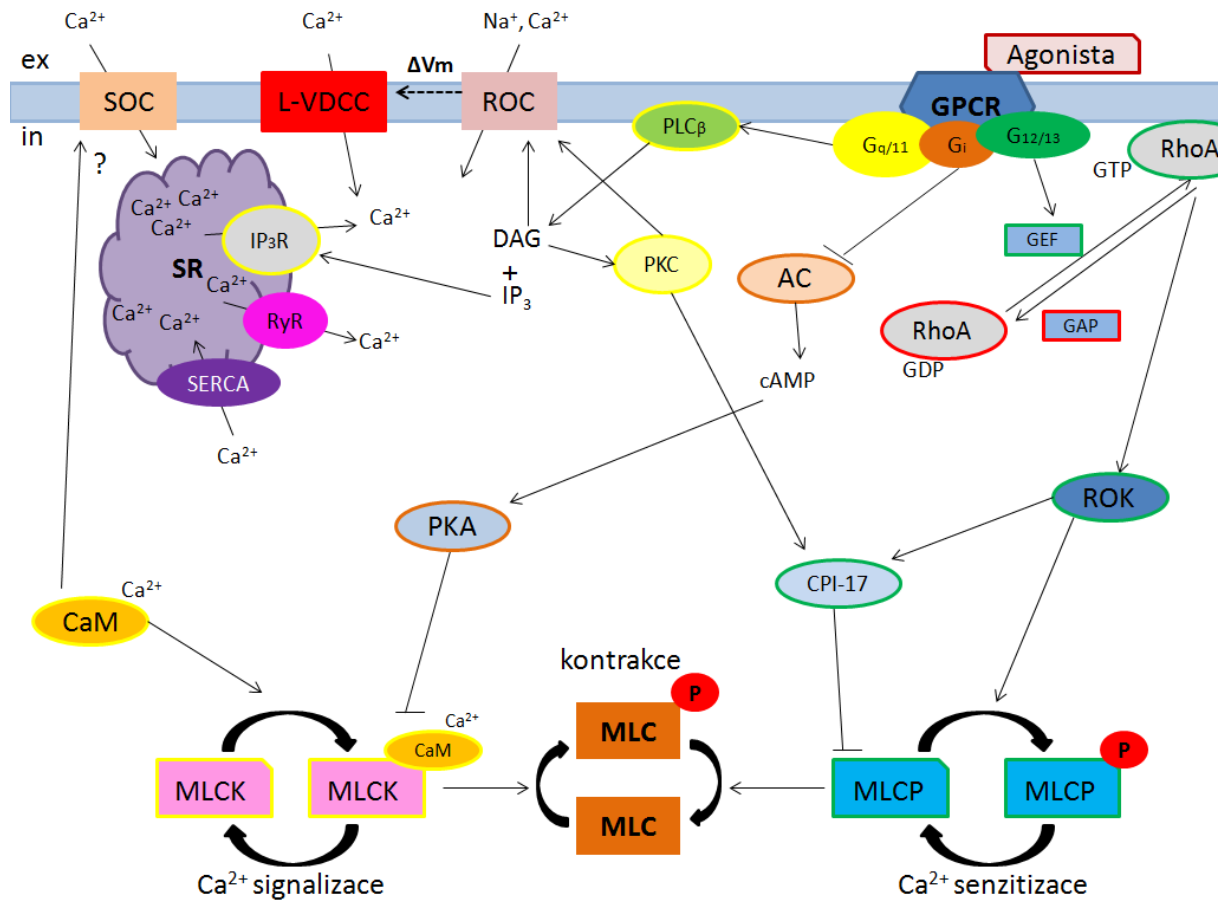
2.1.1.2 Neselektivní kationtové kanály

TRP (transient receptor potential channels) vytvářejí v membráně VSMC heterotetramerní kationtové kanály permeabilní pro Ca^{2+} . Do rodiny TRP se řadí i kanály v plazmatické membráně, jejichž aktivace souvisí s vyprázdněním vnitřních zásob (SOC) a kanály aktivované agonisty prostřednictvím intracelulárních ligandů (ROC). Komponenty SOC jsou proteiny rodiny TRPC1 (Bergdahl et al., 2005), respektive dalších TRP (Saleh et al., 2006) a pravděpodobně Orai a STIM, které slouží jako zesilovače aktivity SOC (Liao et al., 2007). Molekulárními kandidáty pro ROC jsou hlavně TRPC3 a TRPC6 (Berra-Romani et al., 2008).

K otevření ROC dochází cestou nezávislou na intracelulárních zásobách Ca^{2+} . Aktivace GPCR agonistou vede k vytvoření DAG (viz kapitola 2.1 Vápníková signalizace), který stimuluje aktivaci ROC cestou nezávislou na proteinkináze C (PKC) (Helliwell a Large, 1997) nebo pomocí navázání se na PKC (Albert a Large, 2002). Cesta aktivace SOC je závislá na vnitřních zásobách Ca^{2+} a zahrnuje produkci IP_3 , který se váže na IP_3R a uvolňuje Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula a následné zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimuluje CaM k aktivaci SOC (Smani et al., 2004). Pro studium účinku SOC kanálů na kontrakci se často používá permeabilní inhibitor IP_3R , 2-aminoethoxydifenyl borát (2-APB), který blokuje IP_3R a tím nepřímě i SOC (inhibuje vyprázdňené sarkoplasmatického retikula cestou IP_3R) (Flemming et al., 2003). 2-APB také účinně blokuje přímo SOC, pravděpodobně interakcí s kanálem z extracelulární strany (Bakowski et al., 2001). Během kultivace dochází k zvýšení exprese určitých izoforem TRP a nárůstu vstupu Ca^{2+} přes SOC (Bergdahl et al., 2005, Yu et al., 2003). Kultivované cévy však reagují na 2-APB méně než cévy diferencované (Ren et al., 2010). Možné vysvětlení je, že se zde významně uplatňují stromální interagující molekuly 1 (STIM1) a pór formující podjednotky (Orai) (Potier et al., 2009), které se v diferencovaných VSMC téměř nevyskytují (Berra-Romani et al., 2008, Potier et al., 2009). STIM1 a Orai navíc nemusí na inhibiční účinek 2-APB reagovat. STIM1 funguje jako Ca^{2+} senzor sarkoplasmatického retikula. Po depleci vnitřních zásob dochází v sarkoplasmatickém retikulu k relokaci STIM1 blízko k cytoplasmatické membráně (Wu et al., 2006). Orai je pór formující molekula, která vytváří kationtový kanál v plazmatické membráně. Snížená exprese těchto molekul vede k snížené aktivaci SOC (Potier et al., 2009). Kultivace VSMC zvyšuje expresi STIM1 i Orai (Berra-Romani et al., 2008, Potier et al., 2009). Během kultivace také dochází k změně aktivace SOC. Zatímco diferencované buňky stimuluje SOC více přes ryanodinové receptory (RyR) sarkoplasmatického retikula, dediferencované buňky snižují podíl RyR a zároveň zvyšují podíl IP_3R na aktivaci SOC (Berra-Romani et al., 2008). To je pravděpodobně dáno sníženou expresí RyR u proliferujících VSMC (Vallot et al., 2000). Přechod z kontraktálního do proliferativního fenotypu také výrazně zvyšuje aktivitu ROC (měřeno jako vstup Ba^{2+} po podání permeabilního analogu DAG) (Berra-Romani et al., 2008). Dediferencované VSMC vykazují sníženou expresi L-VDCC (Gollasch et al., 1998), takže ROC a SOC mohou sloužit jako kompenzační mechanismus vstupu Ca^{2+} do buňky.

2.2 Vápníková senzitivace

Vápníková senzitivace je do značné míry nezávislá na Ca^{2+} a vede cestou fosforylace a inhibice MLCP (viz obr. 1 Spřažení excitace a kontrakce; strana 9). Existují dvě základní složky inhibice MLCP vedoucí k vápníkové senzitivaci: fosforylace regulační podjednotky MLCP (MYPT1) a fosforylace hladkosvalově-specifického MLCP inhibičního proteinu CPI-17, který se ve svém fosforylovaném stavu váže na MLCP a tím ji inhibuje (Eto et al., 2004). Rho-kináza (ROK) je zodpovědná za fosforylaci obou proteinů: MYPT1 i CPI-17 (Feng et al., 1999, Kureishi et al., 1997). CPI-17 může být fosforylován i dalšími kinázami (Dimopoulos et al., 2007). Proti inhibičnímu účinku ROK na MLCP působí aktivace MLCP pomocí cGMP (Bolz et al., 2003). ROK se vedle inhibice MLCP podílí na nárůstu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nezávislé na L-VDCC a vnitřních zásobách, pravděpodobně ovlivněním kanálů aktivovaných agonisty prostřednictvím intracelulárních ligandů (ROC) (Ghisal et al., 2003, Kureishi et al., 1997). Ca^{2+} signalizace VSMC je zpravidla spojená s aktivací $G_{q/11}$ α podjednotky heterotrimerického G-proteinu (Wu et al., 1992), kdežto aktivace malé GTPázy RhoA a Ca^{2+} senzitivace je asociována se stimulací $G_{12/13}$ α podjednotky (Suzuki et al., 2003). U některých vazokonstriktorů (např. angiotenzin, endotelin) byla prokázána stimulace nejen receptorů spřažených s G_q , ale také receptorů spřažených s $G_{12/13}$ (Gohla et al., 2000) nebo G_i (noradrenalin) (Bylund, 1992) napovídající kooperaci Ca^{2+} signalizace a Ca^{2+} senzitivace. Fosforylace lehkého řetězce myosinu je potřebná také k lokomoci, migraci a cytokinezi dediferencovaných VSMC (Fukata et al., 2001). Během kultivace VSMC z aorty dochází k relativnímu snížení úrovně exprese některých proteinů specifických pro kontraktilní fenotyp (α -aktin, těžký řetězec myosinu, h-kaldesmon, h1-kalponin), a naopak exprese jiných proteinů se zvyšuje (RhoA, ROK a MYPT1) (Woodsome et al., 2006). U dediferencovaných buněk je ROK využívána k procesům souvisejícím s proliferací buněk (Yamakawa et al., 2000).



Obrázek 1 Spřažení excitace a kontrakce

Vasokonstriktory (např. noradrenalin, endothelin, angiotenzin) působí přes receptory spřažené s G-proteiny. Stimulace receptoru vede k aktivaci heterotrimerických G-proteinů, které následně předávají signál dalším členům kaskády a v konečném důsledku vedou ke kontrakci buněk. Na obrázku jsou vyznačeny tři typy α podjednotek G proteinů: 1) $G_{q/11}$ – žlutý kroužek; 2) G_i – oranžový kroužek; 3) $G_{12/13}$ – zelený kroužek. Cesta od $G_{q/11}$ je obecně považována za Ca^{2+} signalizaci a cesta vedoucí od $G_{12/13}$ je považována za Ca^{2+} senzitivaci.

1) $G_{q/11}$ podjednotka aktivuje fosfolipázu C_{β} , která štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trisfosfát, který se váže na inositoltrisfosfátové receptory (IP_3R) na sarkoplazmatickém retikulu a způsobuje tak zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i. Diacylglycerol aktivuje receptorem aktivované kanály (ROC) a proteinkinázu C, která také může aktivovat ROC. ROC umožní Na^+ iontům vstup do buňky a tím depolarizuje plasmatickou membránu. Depolarizace otevírá napětově závislé Ca^{2+} kanály. Ca^{2+} se váže na kalmodulin, který poté aktivuje kinázu lehkého řetězce myosinu. Fosforylace lehkého řetězce myosinu vede ke kontrakci cévních hladkosvalových buněk. Kalmodulin také aktivuje Ca^{2+} kanály závislé na vnitřních zásobách Ca^{2+} (SOC), které zpětně naplňují vyprázdněné sarkoplazmatické retikulum. V membráně sarkoplazmatického retikula se vedle IP_3R nacházejí také ryanodinové receptory, které jsou aktivovány zvýšením [Ca^{2+}]_i a jejich aktivace vede k vyprázdnění Ca^{2+} zásob sarkoplazmatického retikula a Ca^{2+} ATPázy sarkoplazmatického retikula, které naopak aktivně přečerpávají Ca^{2+} z cytoplazmy dovnitř sarkoplazmatického retikula.

2) **G_i podjednotka** vede ke kontrakci buněk pomocí inhibice adenylylcyklázy. cAMP se za normálních podmínek váže na proteinkinázu A, která desenzitizuje kinázu lehkého řetězce myosinu.

3) **G_{12/13} podjednotka** aktivuje protein GEF, který disociuje GDP z G-proteinu RhoA a umožní tak navázání GTP na místo, kde byl GDP navázaný. RhoA-GTP aktivuje Rho-kinázu, která fosforyluje a inaktivuje fosfatázu lehkého řetězce myosinu. Rho-kináza také fosforyluje CPI-17, který se ve svém fosforylovaném stavu váže na katalytickou podjednotku fosfatázy lehkého řetězce myosinu.

Vysvětlivky: ΔV_m – změna membránového potenciálu; CaM – kalmodulin; cAMP – cyklický adenosinmonofosfát; CPI-17 - hladkosvalově-specifický inhibiční protein fosfatázy lehkého řetězce myosinu; DAG – diacylglycerol; ex – extracelulární prostředí; GAP – protein aktivující GTPázu „GTPase-Activating Protein“; GDP – guanosindifosfát; GEF – „guanine nucleotide exchange factor“; GPCR – receptory spřažené s G proteiny; GTP – guanosintrifosfát; G_x – G_a podjednotka s navázaným GTP; in – intracelulární prostředí; IP₃ - inositol-1,4,5-trisfosfát; IP₃R - inositol-1, 4, 5-trisfosfátový receptor; L-VDCC – vysokovodivostní napěťově ovládané Ca²⁺ kanály; MLC – lehký řetězec myosinu; MLCK – kináza lehkého řetězce myosinu; MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myosinu; P – fosfátová skupina; PKC – proteinkináza C; PLC_β – fosfolipáza C_β; RhoA – GTPáza genové rodiny Ras; ROC – receptorem aktivované kanály; ROK – Rho-asociovaná proteinkináza; RyR – ryanodinové receptory; SERCA - Ca²⁺ ATPáza sarkoplazmatického retikula; SOC - Ca²⁺ kanály závislé na vnitřních zásobách Ca²⁺; SR – sarkoplazmatické retikulum.

2.3 Vybrané typy vazokonstrikce

Ačkoli signální cesty vedoucí ke kontrakci VSMC sdílí některé obecné charakteristiky, např. zvýšení [Ca²⁺]_i nebo fosforylace lehkého řetězce myosinu, různí agonisté mají svá specifika. Pro jednodušší pochopení průběhu mých experimentů je vhodné se podívat na signální dráhy vybraných typů kontrakce (viz obr. 2 Vybrané typy vazokonstrikce; str. 13).

2.3.1 K⁺-indukovaná kontrakce

Roztok o vysoké koncentraci K⁺ (KPSS) způsobuje u diferencovaných myocytů depolarizaci membrány následovanou otevřením L-VDCC a vstupem Ca²⁺ do buňky. Nárůst [Ca²⁺]_i aktivuje CaM a ten poté aktivuje MLCK, která fosforyluje lehký řetězec myosinu a tím umožňuje kontrakci. K⁺-indukovaná kontrakce je u diferencovaných VSMC plně závislá na L-VDCC, neboť blokátory L-VDCC nebo odstranění extracelulárního Ca²⁺, stejně tak jako inhibitory MLCK zcela inhibují K⁺-indukovanou kontrakci (Woodsome et al., 2006).

2.3.2 Fenylefrinová kontrakce

Sympatický nervový systém hraje důležitou roli v regulaci cévní kontraktility a kontroly krevního tlaku. Katecholaminy způsobují kontrakci VSMC především díky aktivaci α₁ adrenergických receptorů (AR) a částečně také α₂AR (přes G_i proteiny a inhibici adenylyl

cyklázy (Bylund, 1992)). Fenylefrin je specifický agonista α_1 AR, které jsou GPCR spojené s G_q α podjednotkou. Signalizace jde tudíž cestou PLC, DAG a IP_3 (Wu et al., 1992) (viz kapitola 2.1 Vápníková signalizace). Mobilizace těchto druhých posílů určuje i zapojení ROC a SOC do fenylefrinem indukované kontrakce (viz kapitola 2.1.1.2 Neselektivní kationtové kanály). Fenylefrinem indukovaná kontrakce je dvoufázová. První část je indukovaná zvýšením $[Ca^{2+}]_i$ po navázání IP_3 na IP_3R a uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula. To je samo o sobě schopné vytvořit v bezvápníkovém médiu transientní vazokonstrikci. Vedle toho se v důsledku depolarizace způsobené vstupem Na^+ iontů do cytosolu buňky otevírají L-VDCC a Ca^{2+} vstupuje ve velkém měřítku do buňky. Tato druhá složka zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ vede k dlouhotrvající kontrakci a je do velké míry blokovatelná nifedipinem, specifickým blokátorem L-VDCC. Fenylefrinem indukovaná kontrakce je velmi závislá na přítomnosti extracelulárního vápníku (Gisbert et al., 2003). V signální dráze noradrenalinem indukované kontrakce zastává významnou roli i Ca^{2+} senzitivace (Ghisal et al., 2003). Hlavním subtypem α_1 AR zodpovědným za α_1 adrenergní regulaci kontrakce myocytů je α_{1D} AR (Fan et al., 2009). Myši s vyřazeným genem pro α_{1D} AR vykazují snížené presorické odpovědi na stimulaci α_1 AR a výrazně snížené kontraktilní odpovědi aorty a mesenterických artérií. α_{1D} AR jsou důležité v přímé regulaci periferního cévního odporu a krevního tlaku (Tanoue et al., 2002).

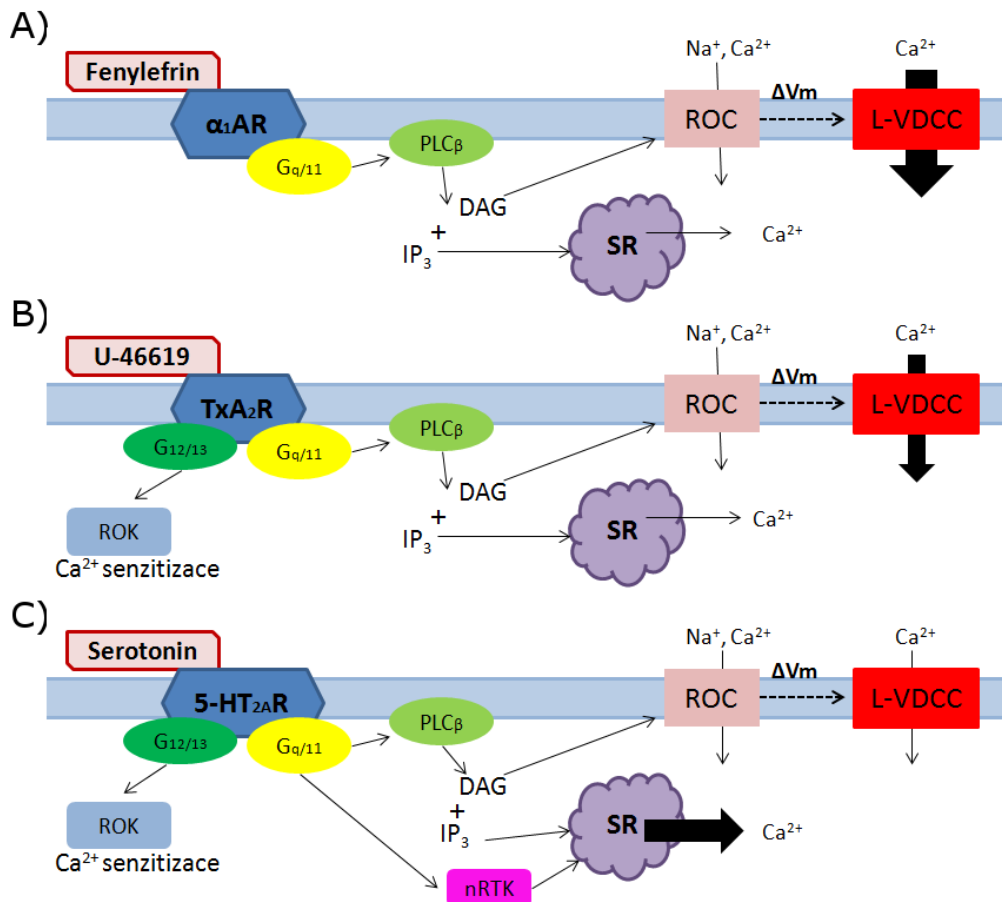
2.3.3 Tromboxanová kontrakce

Tromboxan A_2 je nestabilní metabolit kyseliny arachidonové produkovaný převážně trombocyty. Prostaglandin H_2 je v reakci na různé fyziologické a patologické stimuly isomerizován tromboxan-A syntázou na tromboxan A_2 (Wang a Kulmacz, 2002). Stabilní analog tromboxanu A_2 , U-46619 (Wilson et al., 2005), indukuje kontrakci a proliferaci VSMC (Pakala et al., 1997). Tromboxanový receptor (TxA_2R) je součástí GPCR rodiny spojené typicky s $G_{q/11}$, který aktivuje PLC_β a dochází k akumulaci IP_3 v cytosolu buňky a následnou kaskádou dějů ke kontrakci VSMC (Dorn et al., 1992). TxA_2R je vedle toho také spojený s $G_{12/13}$ (Coleman et al., 1994), což naznačuje zapojení ROK a Ca^{2+} senzitivace do U-46619 vyvolané kontrakce. Zapojení Ca^{2+} senzitivace podporují i výsledky dalších laboratoří (Himpens et al., 1990, Tosun et al., 1998), které ukazují, že schopnost zvýšené koncentrace U-46619 indukovat větší kontrakci není doprovázená nárůstem $[Ca^{2+}]_i$. Tromboxanová kontrakce závisí na vstupu vápníku z extracelulárního prostředí (Wilson et al., 2005) a to jak přes L-VDCC (Leung et al., 2010), tak i jiné kanály (Tosun et al., 1998).

Pravděpodobně se jedná o ROC kanály, po jejichž aktivaci dojde k depolarizaci membrány a otevření L-VDCC (Suzuki et al., 2012). U-46619 zprostředkovává několik různých cest regulace kontraktility VSMC v závislosti na typu artérie (plicní, ocasní, atd.) (Wilson et al., 2005). Některé z těchto rozdílů mohou být způsobeny například odlišnou lokalizací tromboxanových receptorů a jejich asociací s různými proteiny v signálních komplexech nebo relativním zastoupením tromboxanových receptorů asociovaných s $G_{q/11}$ a $G_{12/13}$. 2-APB je permeabilní nízkoafinitní nekompetitivní inhibitor IP_3R a SOC (Bilmen a Michelangeli, 2002). 2-APB částečně inhibuje reziduální kontrakci U-46619 po zablokování L-VDCC (Suzuki et al., 2012). Z výše uvedených studií lze vyvodit závěr, že U-46619 indukovaná kontrakce je závislá na několika signalizačních cestách. Aktivace TxA_2R vede k otevření ROC, depolarizaci membrány, otevření L-VDCC, zvýšení $[Ca^{2+}]_i$, aktivaci SOC a fosforylaci lehkého řetězce myosinu. Do tohoto procesu se také z velké části zapojuje cesta Ca^{2+} senzitivace.

2.3.4 Serotoninová kontrakce

Serotonin je neuropřenašeč, který má mimo jiné vazokonstrikční účinky (Watts et al., 2012). Odpověď VSMC na serotonin vede hlavně přes serotoninový receptor $5-HT_{2A}R$. $5-HT_{2A}R$ je GPCR spojený s $G_{q/11}$ a aktivací PLC a tyrosinkináz (Florian a Watts, 1998). Klasické fosforylační cesty vedoucí od $HT_{2A}R$ jsou PKC, ROK (Kandabashi et al., 2002) a tyrosinkinázy. Src tyrosinkinázová aktivita je pravděpodobně hlavní signalizační dráhou od $HT_{2A}R$. Mechanismus Src regulace $[Ca^{2+}]_i$ je složitý, ale zdá se, že vede převážně cestou mobilizace vnitřních zásob Ca^{2+} , a to ať už cestou mobilizace IP_3 , nebo přímým ovlivněním IP_3R (Jayaraman et al., 1996).



Obrázek 2 Vybrané typy vazokonstrikce

Na schématu jsou znázorněny tři různé signální dráhy vedoucí od odlišných receptorů spřažených s G-proteiny ke kontrakci cévních hladkosvalových buněk (VSMC). **A)** Fenylefrin je specifickým agonistou α_1 adrenergních receptorů (α_1AR) v membráně VSMC. α_1AR je spojený s aktivací $G_{q/11}$ α podjednotky, která vede cestou Ca^{2+} signalizace. Zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ následované kontrakcí VSMC je dáno hlavně otevřením napětově závislých Ca^{2+} kanálů (L-VDCC); **B)** U-46619 způsobuje u VSMC kontrakci hlavně cestou vedoucí od tromboxanového receptoru typu A_2 , který je spojený s aktivací $G_{q/11}$ α podjednotky, ale také $G_{12/13}$ α podjednotky trimerního G-proteinu. Díky zapojení $G_{12/13}$ α podjednotky se do procesu fosforylace lehkého řetězce myosinu zapojuje do značné míry i Ca^{2+} senzitivace; **C)** Odpověď VSMC na serotonin vede hlavně přes serotoninový receptor 5-HT $_{2A}R$, který je spojený s aktivací $G_{q/11}$ a $G_{12/13}$ α podjednotky trimerního G-proteinu. Účast L-VDCC na kontrakci je v tomto typu kontrakce výrazně menší než u fenylefrinem nebo U-46619 indukované kontrakce. Ve velké míře se zde uplatňuje Ca^{2+} senzitivace a mobilizace vnitřních zásob vápníku ze sarkoplazmatického retikula, která je zesílena účastí nerekceptorových tyrosinkináz.

Vysvětlivky: ΔV_m – změna membránového potenciálu; 5-HT $_{2A}R$ – serotoninový receptor; α_1AR – α_1 adrenergní receptor; DAG – diacylglycerol; Gx – Ga podjednotka s navázaným GTP; IP $_3$ – inositol-1,4,5-trisfosfát; L-VDCC – vysokovodivostní napětově ovládané Ca^{2+} kanály; nRTK – nerekceptorové tyrosinkinázy; PLC $_{\beta}$ – fosfolipáza C $_{\beta}$; ROC – receptorem aktivované kanály; ROK – Rho-asociovaná proteinkináza; SR – sarkoplazmatické retikulum; TxA $_2R$ – tromboxanový receptor

3 Spřažení excitace a transkripce

Spřažení excitace a transkripce je proces vysoce závislý na $[Ca^{2+}]_i$. Specifické excitační signály mohou aktivovat různé transkripční faktory v závislosti na extracelulárních a intracelulárních podmínkách, ve kterých se buňky nacházejí. Jeden agonista může za různých podmínek vyvolat různé transkripční odpovědi, stejně tak mohou odlišní agonisté vyvolat stejnou odpověď (divergence a konvergence spřažení excitace a transkripce). Souhrnné schéma je na obrázku 3 Spřažení excitace a transkripce na straně 17.

3.1 Faktor odpovídající na sérum (SRF)

Transkripce většiny markerových genů diferencovaného fenotypu (hladkosvalový α -aktin, těžký řetězec myosinu, SM22 α , telokin, desmin a h1-calponin) je závislá minimálně na jednom CArG elementu lokalizovaném v promoteru genů. CArG element znamená 10-bp element o sekvenci CC(A/T)₆GG, na který se váže faktor odpovídající na sérum (serum response factor, SRF) (Miano, 2003). Základní odpověď diferencovaných buněk na stimulaci fetálním boviním sérem (FBS) je aktivace c-Fos (aktivace časných genů). Proximální segment c-Fos promoteru je velmi senzitivní k stimulaci sérem. Tento element má stejný motiv jako CArG a také váže protein SRF (Treisman, 1992). SRF tedy stimuluje dva protichůdné děje: diferenciaci a proliferaci VSMC. Existuje několik možných vysvětlení tohoto paradoxu. Markerové geny diferencovaných VSMC typicky obsahují dva CArG boxy, zatímco c-Fos pouze jeden (Spencer a Misra, 1996). U některých markerových genů VSMC byly objeveny C/G substituce v A/T bohaté oblasti, které snižují vazebnou afinitu SRF (Hendrix et al., 2005). Zajímavou roli zde může hrát myokardin, vysoce potentní SRF koaktivátor, jehož exprese se zvyšuje po navození depolarizace a vstupu Ca^{2+} do cytosolu, tedy stavu buňky, který odpovídá stavu diferencovaných VSMC (Wamhoff et al., 2004). Myokardin stimuluje CArG závislou expresi markerových genů diferencovaného fenotypu, ale nikoli expresi c-Fos. Hladina mRNA pro myokardin se během kultivace postupně snižuje a stejně tak se snižuje exprese markerových genů diferencovaného fenotypu. Hladina SRF naopak zůstává nezměněná (Chen et al., 2002). Po poškození cév (Hendrix et al., 2005) nebo po aplikaci růstového faktoru (PDGF) (Yoshida et al., 2007) dochází ke snížení exprese myokardinu a současně ke snížení exprese genů diferencovaného fenotypu. Dalším zajímavým členem se zdá být ROK. Zvýšená exprese aktivní formy RhoA stimuluje transkripci hladkosvalového α -aktinu, SM22 α a těžkého řetězce myosinu (Wamhoff et al., 2004). To se pravděpodobně

děje pomocí stimulace translokace myokardinu příbuzných transkripčních faktorů (MRTF) do jádra (Miralles et al., 2003). MRTF a myokardin jsou asociovány s MADS-boxem SRF a podílejí se na zesílení transkripce cílových genů (Pipes et al., 2006). Transkripce myokardinu je kontrolována transkripčním faktorem MEF2 (myocyte-specific enhancer factor 2) (Creemers et al., 2006). Exprese MEF2 a markerových genů VSMC je závislá na aktivaci ROK související s otevřením L-VDCC (Ren et al., 2010). ROK fosforyluje CPI-17, který se váže na katalytickou podjednotku MLCP a tím ukončuje její represivní působení na aktivitu proteinu MEF2 (Pagiatakis et al., 2012). ROK cesta je spojena i s indukcí proliferace, ale nikoli přes stimulaci myokardinu a MRTF (Yamakawa et al., 2000).

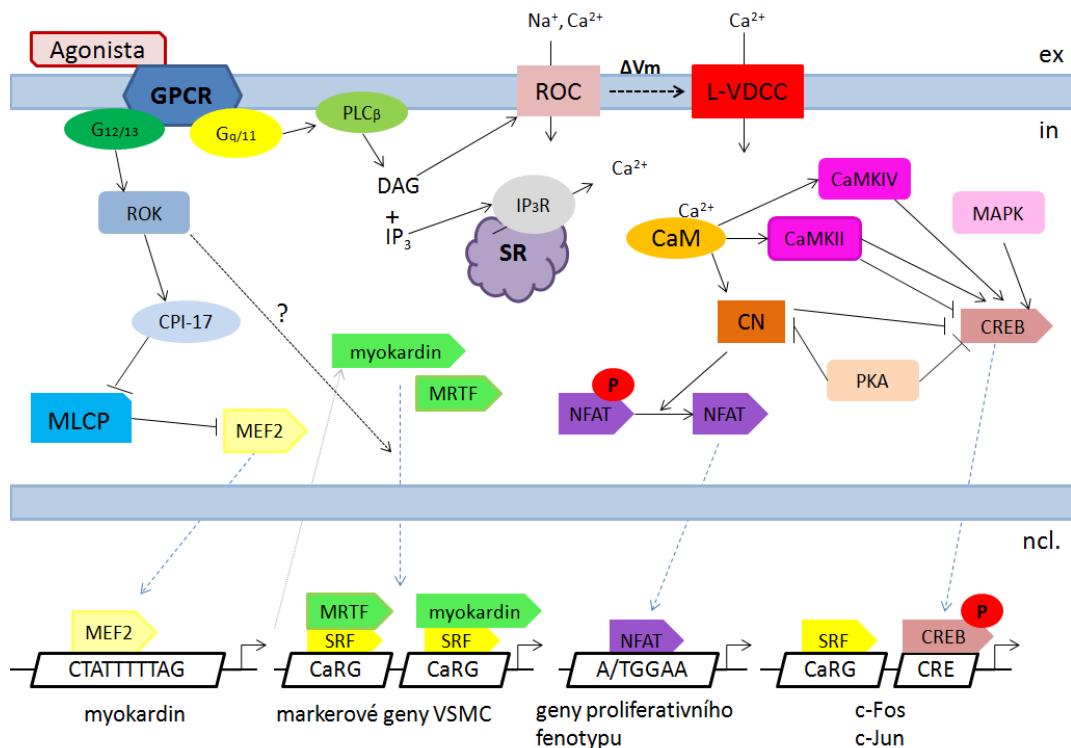
3.2 Protein vázající se na cAMP-odpovídající element promoteru (CREB)

Ca^{2+} -CaM dependentní enzymy jsou spojeny s oběma procesy probíhajícími ve VSMC: kontrakcí (viz kapitola 2.1 Vápníková signalizace) a aktivací transkripčních faktorů. Fosforylace proteinu vázajícího se na cAMP-odpovídající element promoteru (CREB) je závislá na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Pulver et al., 2004). Ca^{2+} -CaM reguluje Ca^{2+} -CaM dependentní proteinkinázu IV (CaMKIV), která fosforylací aktivuje transkripční faktor CREB. Fosforylovaný CREB se váže na CRE element v oblasti promoteru regulující transkripci genů diferencovaných VSMC (Najwer a Lilly, 2005) i proliferujícího fenotypu (Cartin et al., 2000). CREB může být fosforylován několika kinázami na různých místech a umožňuje tak konvergenci řady signálů. K fosforylaci CREB dochází na serinu 133 nebo 142. CaMKIV fosforyluje CREB na serinu 133, kdežto CaMKII fosforyluje serin 133 a 142. Fosforylace serinu 142 pozitivně koreluje s exportem CREB z jádra (Liu et al., 2013) a funguje tak jako negativní regulace aktivace CREB. Aktivita CaMK je závislá na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a její změny mohou vést jak k posílení, tak i k zeslabení schopnosti cAMP stimulovat transkripci v závislosti na specifické formě CaMK (Sun et al., 1994). Fosforylace serinu 133 může být nadále zprostředkována MAPK (Xing et al., 1996), cAMP-dependentní proteinkinázou (PKA) (Dash et al., 1991) a dalšími kinázami. Fosforylace prostřednictvím MAPK vede v cerebrálních arteriích k expresi c-Fos (Pulver-Kaste et al., 2006) a zvyšuje proliferaci a růst aortálních VSMC (Tokunou et al., 2001). Celý proces je inhibovatelný blokátorem L-VDCC. Naopak otevření RyR v membráně sarkoplazmatického retikula snižuje fosforylaci CREB. Ca^{2+} jiskry vyvolané otevřením RyR vedou k aktivaci BK_{Ca} a následné hyperpolarizaci membrány a inaktivaci L-VDCC (Cartin et al., 2000). Aplikace CaMK inhibitoru KN-62 vede k snížení

exprese c-Jun, který tvoří společně s c-Fos komplex fungující jako transkripční faktor časných genů (Pagiatakis et al., 2012). Aktivace CREB pomocí PKA vede k snížení proliferace a migrace plicních VSMC (Klemm et al., 2001). Stimulace PKA vede k vytvoření represivního komplexu proteinů zahrnující histon deacetylázy v jádře a snížení exprese c-Jun (Gordon et al., 2009). Cévy z hypertenzních potkanů mají zvýšenou bazální $[Ca^{2+}]_i$, aktivovaný CREB a vyšší expresi c-Fos (Wellman et al., 2001). Zvýšená $[Ca^{2+}]_i$ může vést také k inaktivaci CREB pomocí kalcineurinu (Ca^{2+} -CaM závislá serin/treonin specifická fosfatáza 2B) (Alberts et al., 1994). Existuje odlišný popis signalizačních cest vedoucích k expresi genů u VSMC diferencovaného i proliferativního fenotypu. Pravděpodobně záleží na konkrétní charakteristice změny $[Ca^{2+}]_i$ a na ní závislé aktivaci různých intracelulárních kináz a fosfatáz.

3.3 Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (NFAT)

Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (nuclear factor of activated T-cells NFAT) je na Ca^{2+} závislý transkripční faktor, který je nepřetržitě exprimován v VSMC. V cytosolu buněk se vyskytuje jako transkripčně neaktivní fosfoprotein. NFAT je aktivován kalcineurinem, k jehož aktivaci dochází po excitaci buněk a zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Defosforylace změní konformaci NFAT a „odkryje“ jaderný lokalizační signál (Okamura et al., 2000). Aktivaci NFAT negativně regulují jaderné (Beals et al., 1997) a cytosolické kinázy (Chow a Davis, 2000, Zhu et al., 1998). Ve VSMC je hlavní izoformou NFAT4. $G_{q/11}$ α podjednotka trimerního G-proteinu aktivuje NFAT4 pomocí zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ přes IP_3R a L-VDCC (viz kapitola 2.1 Vápníková signalizace). Aktivace BK_{Ca} naopak snižuje defosforylaci cytosolického NFAT4 v důsledku hyperpolarizace membrány, zavření L-VDCC a snížení $[Ca^{2+}]_i$ (Stevenson et al., 2001). NFAT4 kontroluje i excitabilitu VSMC pomocí regulace genové exprese. Konkrétně se jedná o snížení exprese napětově ovládaného draslíkového kanálu $K_v2.1$ v důsledku aktivace NFAT4 (Amberg et al., 2004). Chronický účinek fenylefrinu (aplikace do kultivačního média) má pozitivní vliv na proliferaci VSMC. Tohoto procesu se účastní aktivace NFAT2 kalcineurinem v důsledku zvýšené $[Ca^{2+}]_i$ (Pang a Sun, 2009). Nepřetržitá aktivita SERCA2a vede k snížení $[Ca^{2+}]_i$ a k inhibici proliferace VSMC vyvolané NFAT (Lipskaia et al., 2005). Aktivace NFAT je převážně spojena s expresí genů proliferativního fenotypu (Nilsson et al., 2007).



Obrázek 3 Spřažení excitace a transkripce

Vasokonstriktory (např. noradrenalin, endothelin, angiotenzin) působí přes receptor spřažený s G-proteiny. Stimulace receptoru vede k aktivaci heterotrimerických G-proteinů, které následně předávají signál dalším členům kaskády a v konečném důsledku vedou k transkripci genů. 1) Rho-kináza fosforyluje CPI-17, který inhibuje fosfatázu lehkého řetězce myosinu a ukončuje tak její represivní působení na transkripční faktor MEF2. MEF2 může být následně translokován do jádra, kde aktivuje transkripci myokardinu; 2) Myokardin a myokardinu příbuzné transkripční faktory (MRTF) jsou v důsledku působení Rho-kinázy translokovány do jádra, kde se váží na SRF a potencují transkripci genů diferencovaného fenotypu; 3) Zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ vede k aktivaci kalmodulinu, který aktivuje kalcineurin. Kalcineurin defosforyluje transkripční faktor NFAT, který je poté translokován do jádra a aktivuje expresi genů proliferativního fenotypu; 4) Transkripční faktor CREB může být fosforylován různými kinázami s různým účinkem na aktivitu CREB. Aktivovaný CREB se váže na CRE element promotoru a společně s navázaným SRF na CaRG elementu aktivují transkripci c-Fos a c-Jun genů.

Vysvětlivky: ΔV_m – změna membránového potenciálu; CaM – kalmodulin; CaMK – Ca^{2+} -kalmodulin dependentní proteinkináza; CN – kalcineurin; CPI-17 - hladkosvalově-specifický inhibiční protein fosfatázy lehkého řetězce myosinu; DAG – diacylglycerol; ex – extracelulární prostředí; GPCR – receptory spřažené s G proteiny; Gx – Ga podjednotka s navázaným GTP; in – intracelulární prostředí; IP_3 - inositol-1,4,5-trisfosfát; IP_3R - inositol-1, 4, 5-trisfosfátový receptor; L-VDCC – vysokovodivostní napětově ovládané Ca^{2+} kanály; MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza; MEF2 - zesilující faktor myocytů; MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myosinu; MRTF – myokardinu příbuzné transkripční faktory; ncl. – jádro; NFAT - jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů; P – fosfátová skupina; PKA – proteinkináza A; PLC_β – fosfolipáza C_β ; ROC – receptorem aktivované kanály; ROK – Rho-asociovaná proteinkináza; SR – sarkoplazmatické retikulum; SRF – transkripční faktor odpovídající na stimulaci sérem

4 Modulace fenotypu

Modulace fenotypu VSMC je spojena se změnou exprese iontových kanálů, transportérů, receptorů a kontraktilních proteinů. Tyto změny v expresi genů vedou ke změně Ca^{2+} signalizace a změně kontraktility cév (Vallot et al., 2000). Dediferenciace je spojená s nárůstem bazální $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a koncentrace Ca^{2+} ve vnitřních zásobárnách. Proliferace VSMC je také asociovaná s nárůstem IP_3R (Berra-Romani et al., 2008). Více IP_3R může vést nejen k zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ale také k větší aktivaci SOC cestou závislou na Ca^{2+} (Smani et al., 2004) a k dalšímu zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Navození proliferace fetálním hovězím sérem (FBS) nebo PDGF vede naopak k snížení exprese RyR (Vallot et al., 2000), které jsou důležité pro aktivaci BK_{Ca} a zavření L-VDCC v důsledku hyperpolarizace (Nelson et al., 1995). Je možné, že snížená exprese RyR souvisí se sníženou expresí L-VDCC u dediferencovaných VSMC (Gollasch et al., 1998). Během dediferenciace obecně dochází k přechodu od napěťově závislého vstupu Ca^{2+} do buňky k napěťově nezávislému vstupu Ca^{2+} do buňky (Bergdahl et al., 2005, Tai et al., 2009, Yu et al., 2003). Změny v $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jsou u proliferujících VSMC pomalého, dlouhotrvajícího charakteru na rozdíl od diferencovaných VSMC, kde se spíše uplatňují velké, místně a časově omezené výkyvy v $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Tyto dva rozdílné typy Ca^{2+} signalizace mohou vést společně s různými signály z extracelulárního prostředí k aktivaci odlišných transkripčních faktorů a expresi různých genů potřebných pro daný stav buňky.

5 Orgánová kultura

Metoda orgánové kultury je vhodná pro studium dlouhodobých účinků farmak. Je možné pozorovat postupné změny v kontraktilitě cév. Na rozdíl od tkáňové kultury udržují lépe diferencovaný fenotyp (Morita et al., 2010) a současně nedochází k dalšímu ovlivňování účinků testované látky např. humorálním systémem v *in vivo* podmínkách. V orgánové kultuře je lépe uchovaná struktura orgánu zahrnující neporušené buněčné interakce a interakce buněk s extracelulární matrix, které jsou charakteristické pro diferencovaný fenotyp.

Orgánová kultura bez přidaného fetálního hovězího séra (FBS) zachovává kontraktilitu cév po dobu až jednoho týdne (Yamawaki et al., 2000). FBS je velmi komplexní směs biomolekul o různé molekulové hmotnosti s různými fyziologickými účinky. Přidání FBS do bazálního kultivačního média má mitogenní efekt, je důležité pro růst buněk a stimuluje jejich proliferaci. Efekt FBS na kontraktilitu cév se liší v závislosti na agonistovi a přítomnosti, či nepřítomnosti endotelu v kultuře. Přítomnost endotelu v cévách zachovává lepší kontraktilitu (Morita et al., 2010). Endotel je v cévách důležitý pro produkci vazokonstrikčních a vazorelaxačních látek (Furchgott a Vanhoutte, 1989). Kultivace s FBS neovlivňuje vazodilatační odpověď VSMC, ale snižuje vazodilatační účinek endotelu na VSMC (Jimenez-Altayo et al., 2006, Morita et al., 2011). Během kultivace tedy pravděpodobně dochází k poškození endotelu cév nebo ke změně v jeho funkci. Modulace fenotypu kultivovaných VSMC je možné rozdělit na dvě fáze. Počáteční fáze začíná po třech hodinách v kultuře a vrcholu dosahuje během 12 hodin. Tato fáze není na rozdíl od pozdní fáze signifikantně ovlivněna FBS nebo mitogeny, ale je ovlivněna ztrátou tlaku působícího v *in vivo* podmínkách na stěnu cévy. Již velmi brzy po začátku orgánové kultury je patrné snížení exprese markerových genů VSMC (Guo et al., 2008). Hemodynamické síly působící v *in vivo* podmínkách na stěnu cév ovlivňují strukturu stěny a také ovlivňují expresi genů pro cytoskeletální proteiny a proteiny účastníci se kontrakce VSMC. Zachování fyziologických hemodynamických parametrů v *in vitro* podmínkách je důležité pro zachování diferencovaného fenotypu VSMC (Birukov et al., 1998).

Cíle diplomové práce

- 1) Zjistit základní kontraktilní vlastnosti femorálních artérií potkana držených v orgánové kultuře po různě dlouhou dobu v porovnání s čerstvě izolovanými artériemi.
- 2) Objasnit účinek samotného média a fetálního hovězího séra (FBS), které obsahuje množství růstových faktorů, na kontraktilitu femorálních artérií.
- 3) Objasnit dlouhodobý účinek zablokování L-VDCC na kontraktilitu kultivovaných cév, respektive na fenotyp VSMC.

Metodika

Izolace femorálních artérií potkana

Zvířata byla chována v standardních laboratorních podmínkách (střídání světla a tmy v pravidelných intervalech 12 hodin). Dospělí potkani kmene Wistar (stáří 3 až 5 měsíců, samci) byli anestetizováni pomocí inhalace dietyléteru a usmrceni exsanguinací. Poté byla provedena disekce femorálních artérií a odstranění tuku a tunica adventicia ve vychlazeném (4 °C) fyziologickém roztoku (PSS). Očištěné femorální artérie byly rozstříhány na segmenty o délce cca 1,4 mm. Tyto segmenty byly použity pro měření síly kontrakce čerstvě izolovaných artérií nebo pro kultivaci v orgánové kultuře. Zacházení se zvířaty bylo schváleno Etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky.

Kultivace femorálních artérií

Použili jsme dva typy kultivace cév. Při standardní kultivaci v inkubátoru o stálé teplotě 37 °C, relativní vlhkosti (>80%) a vnitřní atmosféře (95% O₂ a 5% CO₂ - karbogen) byly cévy kultivovány v Petriho miskách pro tkáňovou kulturu (dále jen Metoda 1). Při druhém typu kultivace byly cévy umístěny do uzavíratelné skleněné nádoby (15 ml) vložené do suché lázně, jejíž teplota byla vytemperovaná tak, aby teplota média uvnitř nádoby byla 37 °C. Do nádoby byla přes víko zavedena hadička napojená na karbogenovou bombu tak, aby optimálně okysličovala a promíchávala médium. Nádoby byly zakryty alobalem, aby se předešlo kontaktu obsahu nádoby se světlem (dále jen Metoda 2).

Očištěné segmenty cév byly navlečeny na drátky a umístěny do kultivačních nádob s 2 ml nebo 5 ml média vytemperovaného na 37 °C. V Metodě 1 byly cévy pouze položeny do Petriho misek a v Metodě 2 byly cévy zafixovány drátky tak, aby se nedotýkaly kultivační nádoby a aby byly v bezpečné vzdálenosti od hadičky s karbogenem. V Metodě 2 docházelo po přidání 10% FBS do média k hustému pění. Ačkoli přidání Antifoamu A (0,5 μM) do média vedlo k snížení pění, nebyli jsme schopni ho zcela odstranit.

Cévy byly inkubovány v Dulbeccem modifikovaném Eagleho minimálním esenciálním médiu (DMEM) obohaceném o Gentamicin (50 μg/ml). V experimentálních skupinách se sérem byl do média přidán 10% FBS. V experimentálních skupinách se zablokovanými

L-VDCC byl do média přidán nifedipin (2 μM). Cévy byly každých 24 hodin přemístěny do nové kultivační nádoby s čerstvým kultivačním roztokem.

Bylo vytvořeno 6 časových úseků podle doby, po kterou byla céva kultivována. 0 hodin (čerstvě izolovaná céva, která nebyla vystavena kultivačnímu médiu), 1 hodina, 5 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin.

Měření síly kontrakce a experimentální protokol

Segmenty cév byly umístěny do fyziologického roztoku (PSS), který obsahuje (v mM): NaCl 119; KCl 4,7; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,17; NaHCO_3 25; KH_2PO_4 1,18; EDTA 0,027; glukóza 5,5. CaCl_2 , EDTA a glukóza byly do roztoku přidány až po probublání roztoku karbogenem. Roztok byl před použitím probubláván karbogenem pro ustálení pH 7,4. Roztok o vysoké koncentraci K^+ (KPSS) byl připraven stejným způsobem, ale NaCl bylo nahrazeno ekvimolární koncentrací KCl.

Cévy byly vloženy do vaniček a navázány na Mulvanyho drátkový myograf. Vaničky byly vyhřívány na 37 °C a probublávány karbogenem. Po normalizaci byl jemným třením drátku odstraněn endotel a cévy pak byly 30 minut ponechány v klidu pro ustálení stavu. Poté byl dvakrát za sebou aplikován KPSS a dalších 30 minut se počkalo do ustálení stavu (Mulvany a Halpern, 1977). V dalším kroku již bylo možné přejít k podání agonistů ve zvyšujících dávkách (serotonin 1 nM – 1 μM ; U-46619 1 nM – 1 μM ; fenylefrin 10 nM - 30 μM). Po podání poslední dávky agonisty byl aplikován nifedipin (1 μM) a počkalo se do maximální nifedipinové relaxace. V některých pokusech (viz kapitola Výsledky) byl v tomto stavu podán ještě 2-APB (100 μM) a opět zjištěna maximální relaxace. V pokusech, ve kterých bylo nutné zablokovat L-VDCC před vyvoláním kontrakce, byl podán nifedipin (1 μM) těsně před aplikací agonistů.

Odstranění nifedipinu opakovaným vymytím

V kultivaci s nifedipinem bylo vhodné ověřit, zda je nifedipin vymývatelný. Pro ověření jsme vytvořili následný experimentální protokol. Po odstranění endotelu byl nifedipin (2 μM) přidán do roztoku a ponechán zde 30 minut. Poté došlo 4x k výměně PSS a dvěma K^+ -indukovaným kontrakcím. Dohromady se roztok vyměnil 12x. Následovala fenylefrinová dávkově závislá kontrakce a v maximu fenylefrinové kontrakce byl podán nifedipin (1 μM).

Relaxace cév bez nifedipinu podaného na začátku experimentu byla $56,73 \pm 4,10$ % z maximální fenylefrinové kontrakce $10,64 \pm 0,14$ mN.mm⁻¹. Relaxace cév s nifedipinem byla $63,62 \pm 1,70$ % z maximální fenylefrinové kontrakce $12,89 \pm 2,81$ mN.mm⁻¹. Nifedipin je možné odstranit opakovaným vymýváním. Při kultivaci s nifedipinem byl poté použit stejný postup vymývání nifedipinu.

Chemikálie

Fenylefrin, Serotonin, U-46619, 2-APB, Nifedipin, PSS, KPSS, DMEM, FBS, Gentamicin, Antifoam A. Všechny chemikálie byly dodány společností Sigma (St. Louis, MO, USA) kromě U-46619, který byl dodán společností Enzo Life Sciences. Nifedipin, U-46619 a 2-APB byly ředěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). Maximální koncentrace DMSO v roztoku (0,1%) neměla žádný efekt na kontrakci cév. Všechny ostatní chemikálie byly ředěny v destilované vodě.

Statistika

Výsledky experimentů jsou vyneseny jako průměr \pm S.E.M. Pro statistické vyhodnocení dat byl použit t-test pro srovnání dvou skupin nebo ANOVA test následovaný Bonferroniho post-hoc testem pro srovnání tří a více skupin. Při nesplnění podmínky normality jsem použila Mann-Whitney-Wilcoxonův test pro srovnání dvou skupin nebo Kruskal-Wallisův test pro srovnání tří a více skupin. Výsledky všech testů byly považovány za statisticky významné, pokud byla hladina významnosti $P < 0,05$. K výpočtu statistiky jsem použila program SigmaPlot 11.0. Koncentrace agonisty potřebná pro vyvolání poloviční maximální kontrakce (EC₅₀) byla určena pomocí proložení bodů sigmoidální křivkou provedenou v softwaru SigmaPlot 11.0.

Výsledky

Vliv typu kultivace na kontraktilitu femorálních artérií

V první části experimentu jsme museli vybrat vhodnou metodu kultivace cév. Na základě dostupné literatury a dosavadních zkušeností jsme se rozhodli pro dva přístupy (viz kapitola Metodika). Metoda 1 (kultivace v inkubátoru) lépe zachovala kontraktilitu cév při kultivaci bez fetálního hovězího séra (FBS) než Metoda 2 (promíchávání média), rozdíl ale nebyl signifikantní (Tab. 1). Nejdůležitějším problémem Metody 2 byla nemožnost kultivace s FBS. Z tohoto důvodu nebyla Metoda 2 vhodná pro testování vybraných hypotéz, a proto jsme od kultivace pomocí Metody 2 ustoupili a věnovali se jen Metodě 1.

Tabulka 1 Porovnání dvou metod kultivace

Data v tabulce jsou prezentována jako průměry hodnot \pm S.E.M. N (počet měření), MAX (maximální kontrakce v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$), $\log EC_{50}$ (koncentrace agonisty v $\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nutná k vyvolání poloviční maximální kontrakce). Agonisté: Horní panel: Serotonin, Střední panel: U-46619, Dolní panel: Fenylefrin. #: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. odpovídající M1.

Serotonin		N	MAX ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$)	$\log EC_{50}$ ($\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
FRESH		4	$14,14 \pm 3,15$	$-7,44 \pm 0,20$
M1	24H	5	$13,67 \pm 1,09$	$-7,23 \pm 0,09$
	48H	5	$11,31 \pm 2,51$	$-7,12 \pm 0,15$
	72H	2	$9,52 \pm 2,71$	$-6,70 \pm 0,28$
M2	24H	7	$9,74 \pm 0,77\#$	$-7,42 \pm 0,12$
	48H	7	$10,11 \pm 1,47$	$-7,34 \pm 0,05$
	72H	7	$8,85 \pm 1,58$	$-7,26 \pm 0,09\#$

U-46619		N	MAX ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$)	$\log EC_{50}$ ($\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
FRESH		12	$11,85 \pm 0,92$	$-8,33 \pm 0,37$
M1	24H	6	$15,11 \pm 1,42$	$-7,12 \pm 0,17$
	48H	6	$13,07 \pm 1,82$	$-7,29 \pm 0,21$
	72H	7	$10,57 \pm 1,30$	$-7,28 \pm 0,10$
M2	24H	5	$10,84 \pm 1,21$	$-7,25 \pm 0,23$
	48H	5	$9,70 \pm 1,23$	$-8,02 \pm 0,42$
	72H	6	$7,61 \pm 0,79$	$-7,28 \pm 0,17$

Fenylefrin		N	MAX ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$)	$\log EC_{50}$ ($\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
FRESH		9	$11,53 \pm 0,86$	$-6,99 \pm 0,09$
M1	24H	5	$8,56 \pm 1,15$	$-5,79 \pm 0,31$
	48H	6	$6,22 \pm 1,93$	$-5,92 \pm 0,12$
	72H	3	$4,52 \pm 1,43$	$-6,19 \pm 0,28$
M2	24H	2	$9,85 \pm 1,08$	$-5,92 \pm 0,05$
	48H	2	$4,70 \pm 1,93$	$-5,51 \pm 0,41$
	72H	2	$2,19 \pm 1,18$	$-5,89 \pm 0,04$

Vliv kultivace s FBS na kontraktilitu femorálních artérií

V další části bylo důležité zvolit vhodného agonistu, na kterém by bylo možné studovat změnu fenotypu indukovanou kultivací s FBS. Na základě odborné literatury jsme vybrali tři různé typy agonistů (viz kapitola 2.3 Vybrané typy vazokonstrikce) a kontrakci indukovanou roztokem o vysoké koncentraci K^+ (123,7 mM; viz kapitola Metodika). Dediferenciace je děj probíhající ve VSMC, který může ovlivňovat různé receptory a signální dráhy odlišným způsobem. Abychom se vyvarovali zavádějící interpretaci výsledků, zvolili jsme tři co možná nejvíce odlišné agonisty (fenylefrin, serotonin a tromboxanový analog U-46619). Premisou naší práce bylo, že VSMC budou po přidání FBS do média dediferencovat rychleji než VSMC v médiu bez růstových faktorů. Po kultivaci s FBS by mělo při prodlužování doby kultivace docházet k postupnému snižování kontraktilní odpovědi. Z metodického hlediska i pro jednoduchost interpretace je pro nás důležité vidět postupné snižování odpovědi na agonistu. Myografickou metodou jsme schopni měřit pouze výstup (sílu kontrakce) v závislosti na vstupu (podaná koncentrace agonisty). Nad reálnými vnitřními procesy tak můžeme pouze spekulovat.

- **K^+ -indukovaná kontrakce u femorálních artérií**

Kontrakce indukovaná roztokem o vysoké koncentraci K^+ se v myografii běžně používá pro zjištění maximální kontrakce cév na začátku každého měření. V průběhu kultivace došlo k snížení maximální K^+ -indukované kontrakce (z $9,55 \pm 0,35 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ u čerstvě izolovaných artérií na $3,85 \pm 0,39 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ po 72 hodinách kultivace bez FBS). Kultivace s FBS urychlila tento proces. Již po 24 hodinách kultivace s FBS poklesla maximální K^+ -indukovaná kontrakce na $5,34 \pm 0,51 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$, tato hodnota se poté výrazně neměnila ($4,66 \pm 0,46 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ po 72 hodinách kultivace s FBS) (Obr. 4).

- **Serotoninem indukovaná kontrakce u femorálních artérií**

Serotonin je agonista 5-HT_{2A} receptoru a jím vyvolaná kontrakce by měla být závislá především na vnitřních zásobách Ca^{2+} v sarkoplazmatickém retikulu. U čerstvě izolovaných femorálních artérií serotonin indukoval koncentračně závislou kontrakci s maximální silou $14,14 \pm 3,15 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ (Tab. 3 Horní panel). Během kultivace s FBS i bez FBS došlo k mírnému, statisticky nevýznamnému snižování maximální kontrakce cév ($13,20 \pm 1,37 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ u cév kultivovaných 72 hodin s FBS respektive $9,52 \pm 2,71 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$

u cév kultivovaných 72 hodin bez FBS). Kultivace s FBS se neliší od kultivace bez FBS (Obr. 5). Koncentrační křivka se při kultivaci s FBS posouvá doprava oproti čerstvě izolovaným cévám – k vyvolání stejné kontrakční odpovědi je nutné aplikovat vyšší koncentraci agonisty (Tab. 3 Horní panel).

- **U-46619 indukovaná kontrakce u femorálních artérií**

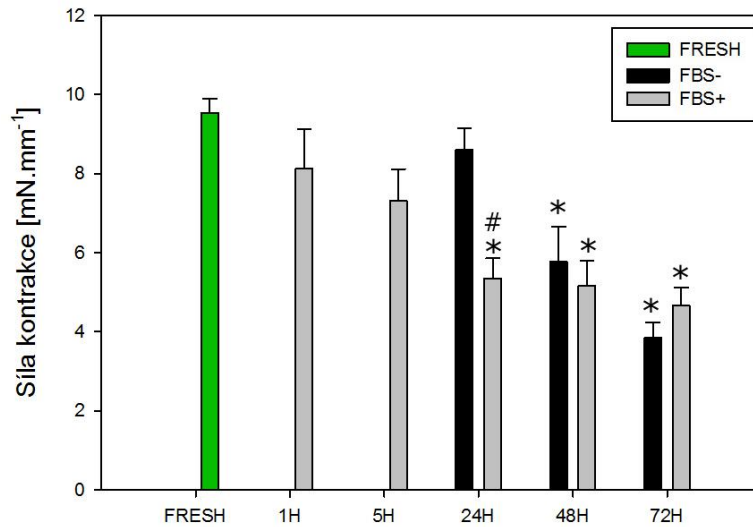
U-46619 je agonistou tromboxanového receptoru TxA_2R . U-46619 indukoval u čerstvě izolovaných artérií maximální kontrakci o síle $11,85 \pm 0,92 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ (Tab. 3 Střední panel). V průběhu 72 hodinové kultivace bez FBS došlo k významnému posunu křivky doprava. Během kultivace s FBS došlo k signifikantnímu posunutí křivky doprava již po 24 hodinách a ke snížení maximální kontrakce po 72 hodinách ($7,31 \pm 1,11 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$). Rozdíl mezi kultivací s FBS a bez FBS nebyl statisticky významný (Obr. 6; Tab. 3 Střední panel).

- **Fenylefrinem indukovaná kontrakce u femorálních artérií**

Katecholaminy jsou za fyziologických podmínek typickými vazokonstriktory VSMC, ačkoli mají také jisté vazodilatační účinky. Abychom se vyvarovali dilatačním účinkům stimulace β -adrenergických receptorů v membráně VSMC, vybrali jsme si namísto noradrenalinu specifického agonistu α_1 -adrenergických receptorů fenylefrin. Fenylefrin vyvolal u čerstvě izolovaných artérií maximální kontrakci $11,53 \pm 0,86 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ (Tab. 3 Dolní panel). V průběhu kultivace bez FBS došlo k signifikantnímu poklesu maximální kontrakce (na $4,52 \pm 1,43 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ po 72 hodinách kultivace bez FBS). Nastal také signifikantní posun křivky doprava. Kultivace s FBS kompletně potlačila fenylefrinem indukovanou kontrakci už po 24 hodinách kultivace (Obr. 7).

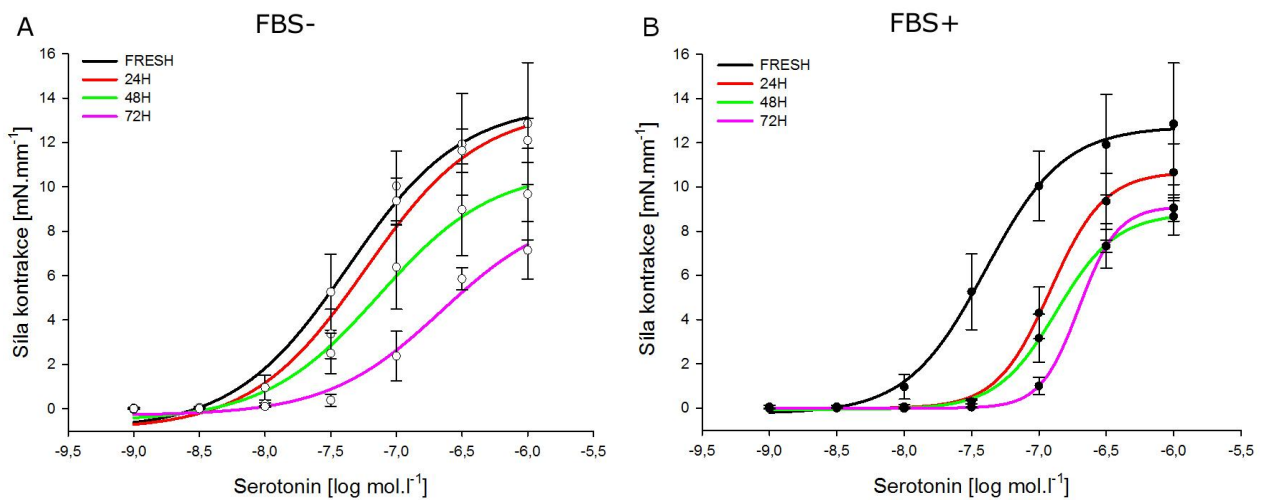
- **Krátkodobý účinek FBS na fenylefrinem indukovanou kontrakci**

Protože po 24 hodinách kultivace s FBS nevyvolal fenylefrin žádnou kontraktální odpověď, pokusili jsme se zjistit, zda účinek FBS je, či není okamžitý, zvolili jsme proto kratší intervaly kultivace (1 hodinu, 5 hodin). Zkrácením doby, po kterou působí FBS na izolovanou femorální artérii, jsme docílili postupného, časově závislého snižování fenylefrinem indukované kontrakce a signifikantního posunu křivky doprava (Obr. 8; Tab. 2).



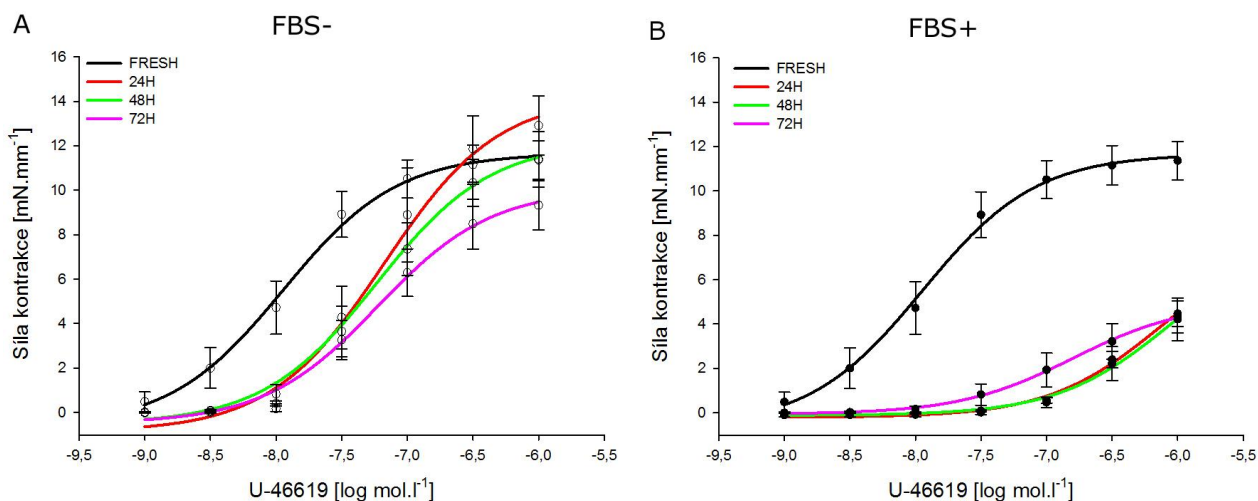
Obrázek 4 K⁺-indukovaná kontrakce

Graf ukazuje vliv kultivace bez séra (FBS-) a se sérem (FBS+) na K⁺-indukovanou kontrakci. Vždy se jednalo o v pořadí druhou K⁺-indukovanou kontrakci. Zelený sloupec (FRESH) označuje kontrakci čerstvě izolovaných arterií. Sloupce reprezentují průměr ± S.E.M. Počet měření: FRESH (42), 1H (8), 5H (8), 24H (17), 48H (18), 72H FBS- (15), 72H FBS+ (21). *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti P<0,05 vs. FRESH. #: signifikantní rozdíl na hladině významnosti P<0,05 vs. odpovídající kontrola ve FBS-.



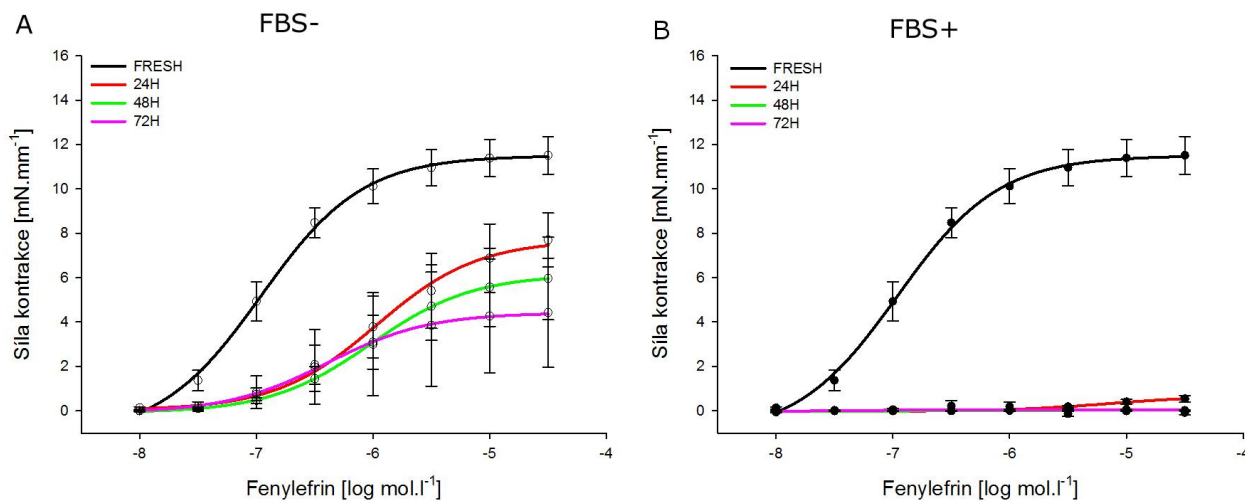
Obrázek 5 Serotoninem indukovaná kontrakce

Graf ukazuje vliv kultivace bez FBS (A) a s FBS (B) na serotoninem indukovanou dávkově závislou kontrakci. Kontrakce byla vynesena jako absolutní hodnota v mN.mm⁻¹. Serotonin byl podán ve zvyšujících se koncentracích (1 nM – 1 μM). Výsledky ukazují průměr hodnot ± S.E.M. (N= 2 – 6; viz tab. 3 Horní panel)



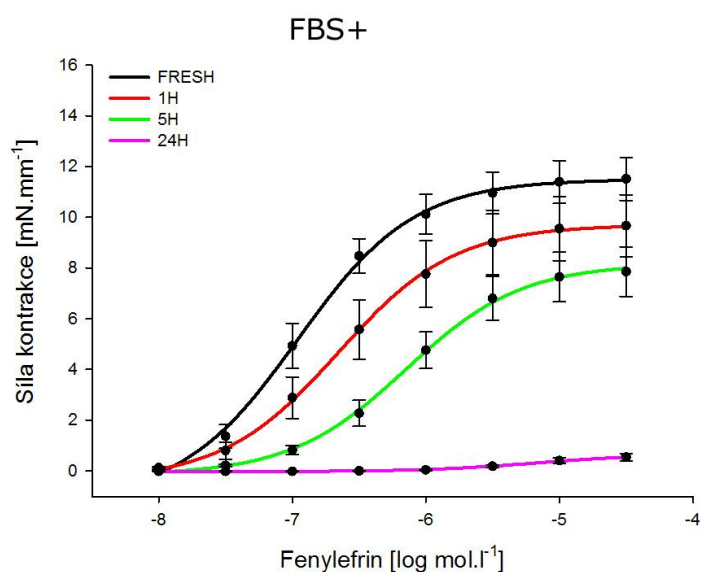
Obrázek 6 U-46619 indukovaná kontrakce

Graf ukazuje vliv kultivace bez FBS (A) a s FBS (B) na U-46619 indukovanou dávkově závislou kontrakci. Kontrakce byla vynesena jako absolutní hodnota v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$. U-46619 byl podán ve zvyšujících se koncentracích (1 nM – 1 μM). Výsledky ukazují průměr hodnot \pm S.E.M. ($N=5-12$; viz tab. 3 Střední panel)



Obrázek 7 Fenylefrinem indukovaná kontrakce

Graf ukazuje vliv kultivace bez FBS (A) a s FBS (B) na fenylefrinem indukovanou dávkově závislou kontrakci. Kontrakce byla vynesena jako absolutní hodnota v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$. Fenylefrin byl podán ve zvyšujících se koncentracích (10 nM – 30 μM). Výsledky ukazují průměr hodnot \pm S.E.M. ($N=2-9$; viz tab. 3 Dolní panel)



Obrázek 8 Krátkodobý účinek FBS na fenylefrinem indukovanou kontrakci

Graf ukazuje vliv krátkodobé kultivace s FBS na fenylefrinem indukovanou dávkově závislou kontrakci. Kontrakce byla vynesena jako absolutní hodnota v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$. Fenylefrin byl podán ve zvyšujících se koncentracích (10 nM – 30 μM). Výsledky ukazují průměr hodnot \pm S.E.M. ($N=7-9$; viz tab. 2)

Tabulka 2 Krátkodobý účinek FBS na fenylefrinem indukovanou kontrakci

Data v tabulce jsou prezentována jako průměr hodnot \pm S.E.M. N (počet měření), MAX (maximální kontrakce v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$), $\log EC_{50}$ (koncentrace agonisty v $\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nutná k vyvolání poloviční maximální kontrakce). *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P<0,05$ vs. FRESH.

Fenylefrin	N	MAX ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$)	$\log EC_{50}$ ($\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
FRESH	9	$11,53 \pm 0,86$	$-6,99 \pm 0,09$
FBS+	1H	$9,82 \pm 1,22$	$-6,59 \pm 0,16^*$
	5H	$8,21 \pm 0,99$	$-6,13 \pm 0,07^*$
	24H	$0,68 \pm 0,18^*$	$-5,16 \pm 0,05^*$

Tabulka 3 Vliv kultivace bez FBS a s FBS na kontrakci

Data v tabulce jsou prezentovány jako průměr hodnot \pm S.E.M. N (počet měření), MAX (maximální kontrakce v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$), $\log EC_{50}$ (koncentrace agonisty v $\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nutná k vyvolání poloviční maximální kontrakce). Agonisté: Horní panel: Serotonin, Střední panel: U-46619, Dolní panel: Fenylefrin. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. FRESH. #: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. odpovídající kontrola ve FBS-.

Serotonin		N	MAX ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$)	$\log EC_{50}$ ($\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
FRESH		4	$14,14 \pm 3,15$	$-7,44 \pm 0,20$
FBS-	24H	5	$13,67 \pm 1,09$	$-7,23 \pm 0,09$
	48H	5	$11,31 \pm 2,51$	$-7,12 \pm 0,15$
	72H	2	$9,52 \pm 2,71$	$-6,70 \pm 0,28$
FBS+	24H	5	$13,56 \pm 1,62$	$-6,72 \pm 0,07^{*}\#$
	48H	6	$11,33 \pm 0,97$	$-6,66 \pm 0,11$
	72H	2	$13,20 \pm 1,37$	$-6,44 \pm 0,06$

U-46619		N	MAX ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$)	$\log EC_{50}$ ($\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
FRESH		12	$11,85 \pm 0,92$	$-8,33 \pm 0,37$
FBS-	24H	6	$15,11 \pm 1,42$	$-7,12 \pm 0,17^{*}$
	48H	6	$13,07 \pm 1,82$	$-7,29 \pm 0,21$
	72H	8	$10,57 \pm 1,30$	$-7,28 \pm 0,10^{*}$
FBS+	24H	5	$8,60 \pm 1,35\#$	$-6,11 \pm 0,10^{*}\#$
	48H	7	$8,12 \pm 3,64$	$-6,05 \pm 0,37^{*}\#$
	72H	10	$7,31 \pm 1,11^{*}$	$-6,50 \pm 0,27^{*}\#$

Fenylefrin		N	MAX ($\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$)	$\log EC_{50}$ ($\log \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
FRESH		9	$11,53 \pm 0,86$	$-6,99 \pm 0,09$
FBS-	24H	5	$8,56 \pm 1,15$	$-5,79 \pm 0,31^{*}$
	48H	6	$6,22 \pm 1,93^{*}$	$-5,92 \pm 0,12^{*}$
	72H	3	$4,52 \pm 1,43^{*}$	$-6,19 \pm 0,28$
FBS+	24H	7	$0,68 \pm 0,18^{*}\#$	-
	48H	6	$0,05 \pm 0,03^{*}\#$	-
	72H	2	$0,02 \pm 0,01^{*}$	-

Vliv kultivace artérií na úlohu L-VDCC u agonisty vyvolaných kontrakcí

Podíl L-VDCC na indukované kontrakci jsme zjišťovali pomocí přidání specifického blokátoru L-VDCC nifedipinu v maximu vyvolané kontrakce a zjištění absolutní a relativní nifedipinové relaxace.

• Podíl L-VDCC na serotoninem indukované kontrakci

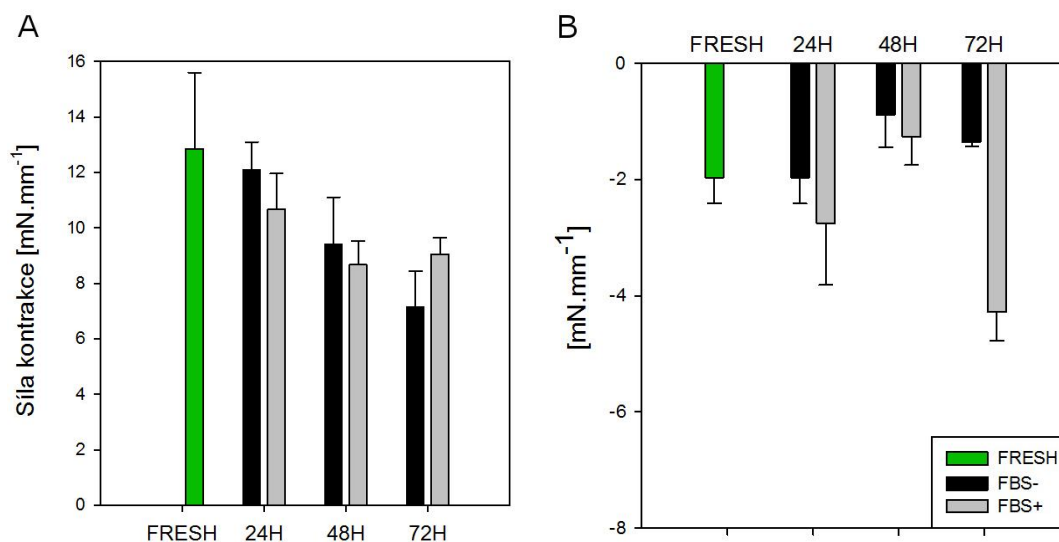
Aplikace nifedipinu při maximální serotoninové kontrakci čerstvě izolované artérie vyvolala relaxaci svalu o $16,22 \pm 4,10$ %. V průběhu kultivace bez FBS se zastoupení L-VDCC v serotoninem indukované kontrakci neměnilo ($19,55 \pm 3,42$ % po 72 hodinách ve FBS-). Kultivace s FBS významně ovlivnila podíl L-VDCC na serotoninem indukované kontrakci až po 72 hodinách ($26,05 \pm 11,53$ % po 24 hodinách v FBS+; $15,22 \pm 6,93$ % po 48 hodinách ve FBS+; $47,16 \pm 2,33$ % po 72 hodinách ve FBS+) (Obr. 9). Během kultivace bez FBS i s FBS došlo k hraničnímu snížení na L-VDCC nezávislé složky kontrakce (reziduální kontrakce $10,89 \pm 2,62$ mN.mm⁻¹ u čerstvě izolovaná artérie, $5,79 \pm 1,29$ mN.mm⁻¹ po 72 hodinové kultivaci bez FBS a $4,77 \pm 0,11$ mN.mm⁻¹ po 72 hodinové kultivaci s FBS).

• Podíl L-VDCC na U-46619 indukované kontrakci

U čerstvě izolovaných artérií vyvolala aplikace nifedipinu při maximální tromboxanové kontrakci relaxaci o $42,78 \pm 2,94$ %. V průběhu kultivace bez FBS se zastoupení L-VDCC na kontrakci indukované U-46619 snižovalo ($23,14 \pm 5,29$ % po 72 hodinách kultivace FBS-). Během kultivace s FBS se absolutní nifedipinová relaxace signifikantně snížila, ačkoli se relativní zastoupení L-VDCC na kontrakci neměnilo ($44,88 \pm 12,12$ % po 72 hodinách kultivace FBS+). Jak je patrné na Obr. 10 A, maximální kontrakce se již po 24 hodinách kultivace s FBS signifikantně snížila oproti čerstvě izolované artérii, i proti kontrole bez FBS. Nifedipin-rezistentní složka kontrakce se během kultivace bez FBS nezměnila (čerstvě izolované artérie $6,47 \pm 0,55$ mN.mm⁻¹ a po 72 hodinové kultivaci bez FBS $7,39 \pm 1,08$ mN.mm⁻¹). Během kultivace s FBS se nifedipin-rezistentní složka kontrakce snížila (po 72 hodinách kultivace s FBS $3,66 \pm 0,71$ mN.mm⁻¹). Signifikantní snížení nastalo už po 24 hodinách kultivace s FBS, poté se výrazně neměnilo (po 24 hodinách kultivace s FBS $3,16 \pm 0,45$ mN.mm⁻¹).

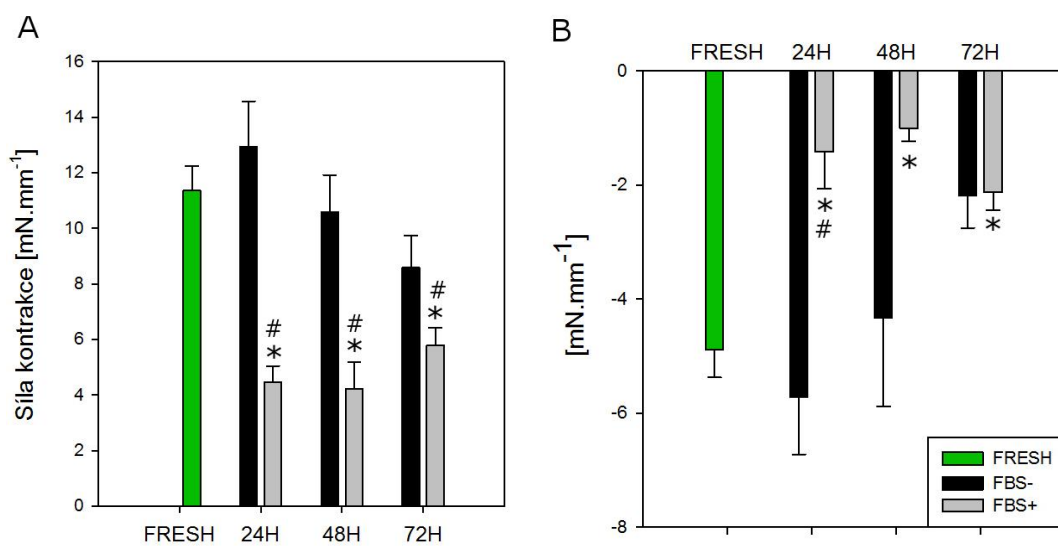
- **Podíl L-VDCC na fenylefrinem indukované kontrakci**

L-VDCC hraje důležitou roli u fenylefrinem indukované kontrakce čerstvě izolovaných artérií. Zablokování L-VDCC vedlo k relaxaci o $58,86 \pm 4,22$ %. Podíl L-VDCC se snižuje v průběhu kultivace bez FBS ($28,83 \pm 4,96$ % po 72 hodinách FBS-). Významně se snižuje i maximální kontrakce vyvolaná fenylefrinem. Nifedipin-rezistentní složka kontrakce se naproti tomu během kultivace bez FBS nemění (čerstvě izolovaná artérie $4,84 \pm 0,77$ mN.mm⁻¹ a kultivace 72 hodin $3,36 \pm 2,13$ mN.mm⁻¹). Podíl L-VDCC na fenylefrinem indukované kontrakci v průběhu kultivace s FBS nebylo možné zjistit, protože aplikace fenylefrinu nevyvolala ani v maximální dávce zaznamenanou kontrakci (Obr. 11).



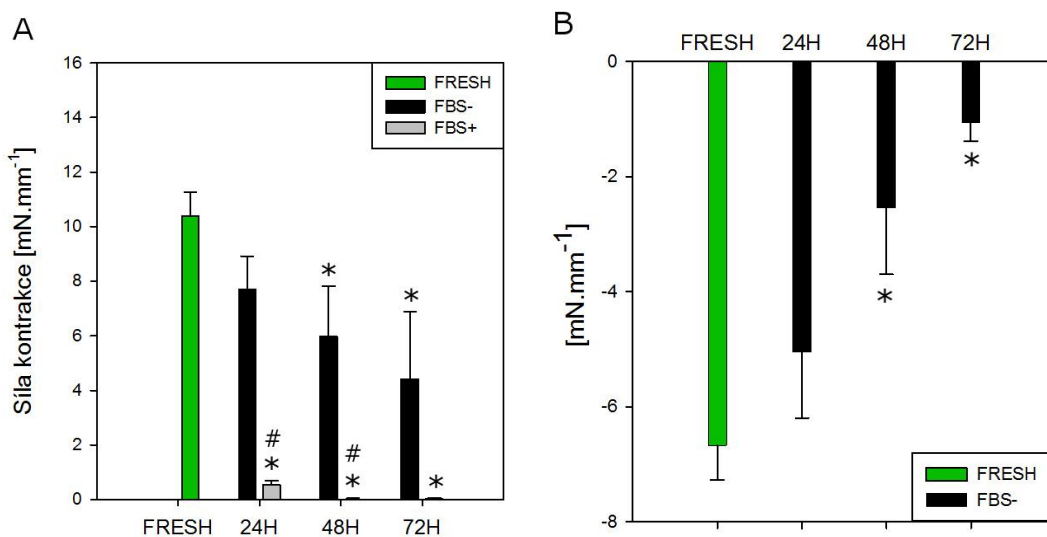
Obrázek 9 Podíl L-VDCC na serotoninem indukované kontrakci

Vliv kultivace na účast L-VDCC na serotoninem indukované kontrakci. V grafu je vyjádřena maximální serotoninová kontrakce (A) a následná absolutní nifedipinová relaxace. Sloupce reprezentují průměr \pm S.E.M. ($N=2-6$; viz tab. 3 Horní panel).



Obrázek 10 Podíl L-VDCC na U-46619 indukované kontrakci

Vliv kultivace na účast L-VDCC na U-46619 indukované kontrakci. V grafu je vyjádřena maximální U-46619 kontrakce (A) a následná absolutní nifedipinová relaxace. Sloupce reprezentují průměr \pm S.E.M. (N= 5 – 12; viz tab 3 Střední panel). *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. FRESH. #: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. odpovídající kontrola ve FBS-.



Obrázek 11 Podíl L-VDCC na fenylefrinem indukované kontrakci

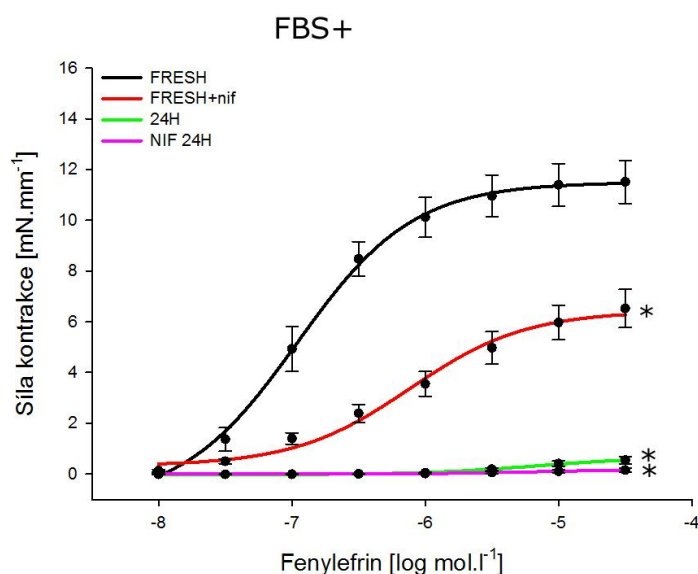
Vliv kultivace na účast L-VDCC na fenylefrinem indukované kontrakci. V grafu je vyjádřena maximální fenylefrinová kontrakce (A) a následná absolutní nifedipinová relaxace. Sloupce reprezentují průměr \pm S.E.M. (N= 2 – 9; viz tab. 3 Dolní panel). *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. FRESH. #: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. odpovídající kontrola ve FBS-.

Vliv kultivace artérií s nifedipinem na kontraktilitu femorálních artérií

Předpokládali jsme, že kultivace s nifedipinem zabrání dediferenciaci VSMC díky snížení dostupnosti intracelulárního Ca^{2+} (viz kapitola 3 Spřažení excitace a transkripce). K pokusům jsme zvolili dva agonisty: fenylefrin a U-46619, protože vykazovaly rozdíl mezi kultivací bez FBS a s FBS (Obr. 6 a 7) a bylo by na nich možné nejlépe pozorovat chronický účinek zablokování L-VDCC na kontraktilitu, potažmo fenotyp cév kultivovaných v médiu s FBS.

• Vliv kultivace s nifedipinem s FBS na fenylefrinem indukovanou kontrakci

Aplikace nifedipinu před fenylefrinovou kontrakcí vyvolala u čerstvě izolovaných artérií snížení maximální kontrakce z $11,53 \pm 0,86 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ na $6,44 \pm 0,73 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ a signifikantní posun křivky doprava ($\log \text{EC}_{50}$ fenylefrinové kontrakce čerstvě izolované cévy je $-6,99 \pm 0,09$ a $\log \text{EC}_{50}$ kontrakce se zablokovanými L-VDCC je $-6,11 \pm 0,05$). Přidání nifedipinu ($2 \mu\text{M}$) do kultivačního roztoku s FBS (chronický účinek) nevyvolalo po 24 hodinách žádnou změnu v maximální kontrakci vyvolané fenylefrinem (Obr. 12).



Obrázek 12 Vliv kultivace s nifedipinem na fenylefrinem indukovanou kontrakci

Vliv kultivace 24 hodin s FBS a s nifedipinem na fenylefrinem indukovanou kontrakci. Kontrakce byla vynesena jako absolutní hodnota v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$. Fenylefrin byl podán ve zvyšujících se koncentracích (10 nM – 30 μM). Výsledky ukazují průměr hodnot \pm S.E.M. Vysvětlivky a počet měření: FRESH (čerstvě izolovaná arterie; 9), FRESH+nif (čerstvě izolovaná arterie, zablokování L-VDCC nifedipinem před kontrakcí; 5), 24H (kultivace 24 hodin s FBS; 7), NIF 24H (kultivace 24 hodin s FBS a s nifedipinem; 4). *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ vs. FRESH.

- **Vliv kultivace s nifedipinem s FBS na U-46619 indukovanou kontrakci**

Zablokování L-VDCC nifedipinem před U-46619 indukovanou kontrakcí u čerstvě izolovaných artérií vedlo k signifikantnímu snížení maximální kontrakce z $11,85 \pm 0,92 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ na $9,23 \pm 0,48 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ a posunu křivky doprava (Tab. 4). Přidání nifedipinu před kontrakci u artérií vystavených 72 hodinové kultivaci s FBS neovlivnilo signifikantně U-46619 indukovanou kontrakci ($7,31 \pm 1,11 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ kultivace 72 hodin s FBS a $5,72 \pm 0,73 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ kultivace 72 hodin s FBS se zablokovaným L-VDCC před kontrakcí). Během kultivace došlo ve všech případech k posunutí křivky doprava oproti čerstvě izolovaným cévám (Tab. 4 Horní panel). Kultivace 72 hodin s nifedipinem zvýšila maximální kontrakci ($9,11 \pm 0,95 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$) oproti kontrole bez přidaného nifedipinu ($7,31 \pm 1,11 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$). Podobně tomu je i u kultivace s nifedipinem, kde byl podán nifedipin ještě před kontrakcí ve srovnání se svou kontrolou ($8,43 \pm 0,49 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ 72 hodin kultivace s FBS, $5,72 \pm 0,73 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ L-VDCC zablokováno před kontrakcí) (Obr. 13 B).

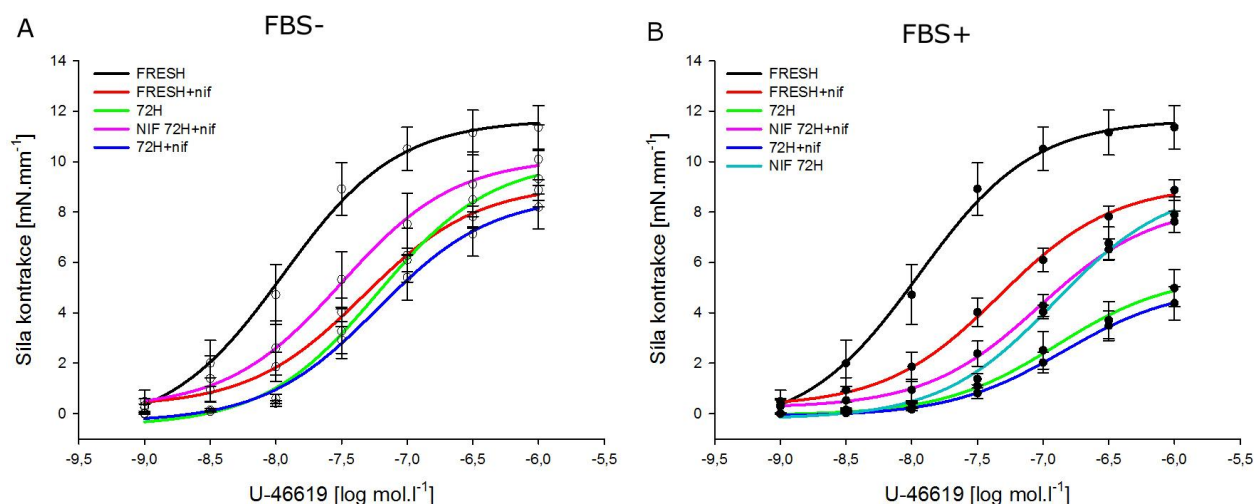
- **Vliv kultivace s nifedipinem bez FBS na U-46619 indukovanou kontrakci**

Po 72 hodinové kultivaci bez FBS nevede aplikace nifedipinu před U-46619 indukovanou kontrakci k signifikantní změně maximální kontrakce ($10,58 \pm 1,30 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ maximální kontrakce po 72 hodinách kultivace bez FBS a $8,93 \pm 0,86 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ maximální kontrakce po 72 hodinách se zablokovaným L-VDCC). Kultivace s nifedipinem nepatrně zvýšila maximální U-46619 indukovanou kontrakci ($10,30 \pm 1,22 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ maximální kontrakce po kultivaci 72 hodin bez FBS s nifedipinem a zablokovaným L-VDCC před kontrakcí proti $8,93 \pm 0,86 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$ maximální kontrakce po 72 hodinách bez FBS se zablokovaným L-VDCC) aniž by ovlivnila EC_{50} (Obr. 13 A).

Složky U-46619 indukované kontrakce u artérií kultivovaných s FBS s nifedipinem

Kultivace 72 hodin s nifedipinem v roztoku s FBS zvýšila maximální U-46619 indukovanou kontrakci oproti kontrakci bez nifedipinu (Obr. 14 A). Během kultivace 72 hodin s přidaným nifedipinem se absolutní podíl L-VDCC na U-46619 indukované kontrakci signifikantně snížil oproti čerstvě izolovaným artériím (Obr. 14 B). Relativní úloha L-VDCC se signifikantně nelišila (Tab. 5). 2-APB senzitivní složka kontrakce se během kultivace rovněž

snížila (Obr. 14 C), ale signifikantně jen při kultivaci s nifedipinem (Tab. 5). Během kultivace s nifedipinem signifikantně narostla na nifedipinu a 2-APB nezávislá složka kontrakce ($2,59 \pm 0,29 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$) oproti čerstvě izolované artérii ($0,63 \pm 0,06 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$) (Obr. 14 D).



Obrázek 13 Vliv kultivace s nifedipinem na U-46619 indukovanou kontrakci

Graf ukazuje vliv kultivace bez FBS (A) a s FBS (B) na U-46619 indukovanou dávkově závislou kontrakci. Kontrakce byla vynesena jako absolutní hodnota v $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-1}$. U-46619 byl podán ve zvyšujících se koncentracích ($1 \text{ nM} - 1 \mu\text{M}$). Výsledky ukazují průměr hodnot \pm S.E.M. Vysvětlivky: FRESH (čerstvě izolovaná arterie), FRESH+nif (čerstvě izolovaná arterie, nifedipin podán před kontrakcí), 72H (kultivace 72 hodin), NIF 72H+nif (kultivace 72 hodin s nifedipinem, nifedipin podán před kontrakcí), 72H+nif (kultivace 72 hodin, nifedipin podán před kontrakcí), NIF 72H (kultivace 72 hodin s nifedipinem). ($N= 8 - 13$; viz tab. 4)

Tabulka 4 Vliv kultivace s nifedipinem na U-46619 indukovanou kontrakci

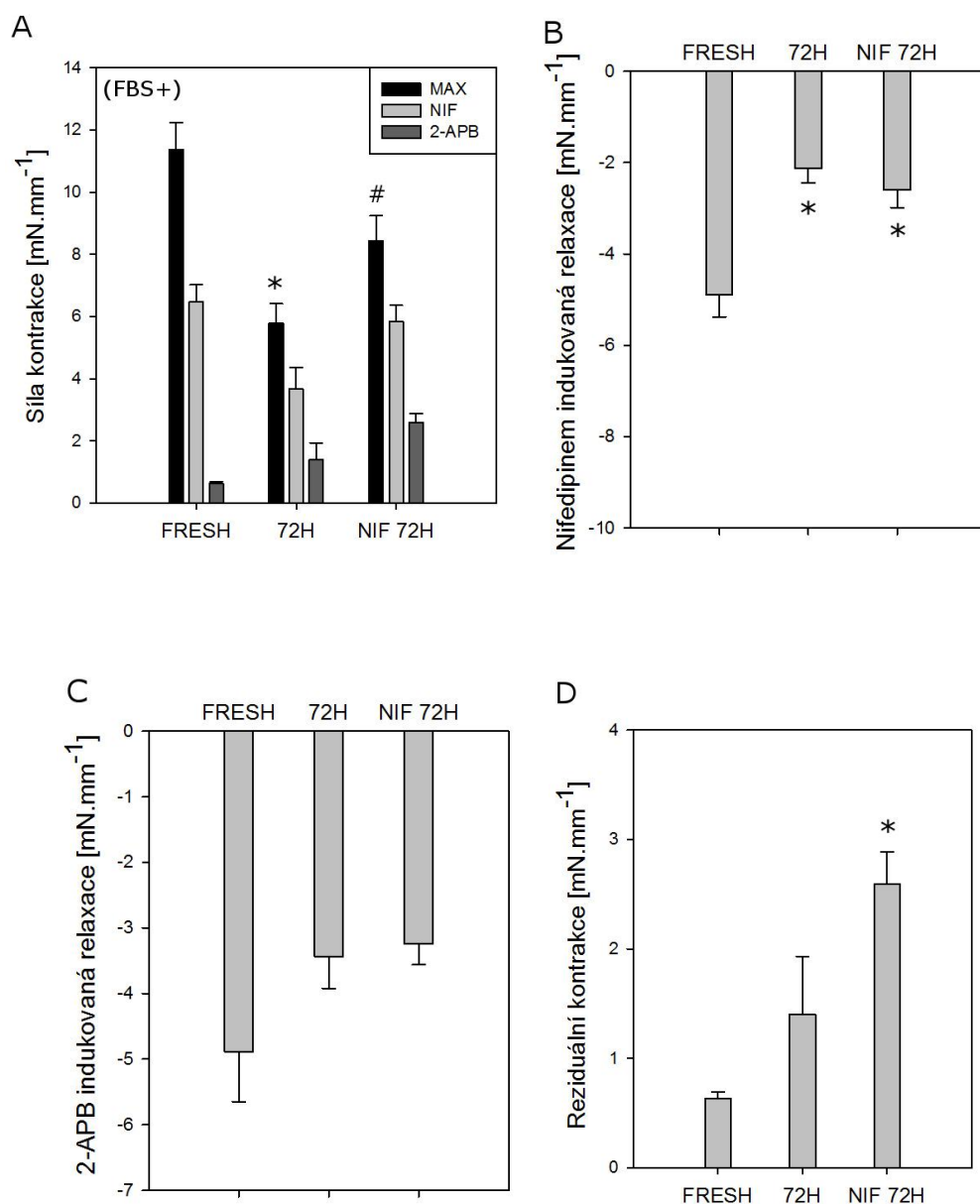
Tabulka s maximální kontrakcí a log EC₅₀ jednotlivých měření. Data v tabulce jsou prezentována jako průměr hodnot ± S.E.M. N (počet měření), MAX (maximální kontrakce v mN·mm⁻¹), log EC₅₀ (koncentrace agonisty v log mol·l⁻¹ nutná k vyvolání poloviční maximální kontrakce). Vysvětlivky: FRESH (čerstvě izolovaná arterie), FRESH+nif (čerstvě izolovaná arterie, nifedipin podán před kontrakcí), 72H (kultivace 72 hodin), NIF 72H+nif (kultivace 72 hodin s nifedipinem, nifedipin podán před kontrakcí), 72H+nif (kultivace 72 hodin, nifedipin podán před kontrakcí), NIF 72H (kultivace 72 hodin s nifedipinem). *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti P<0,05 vs. FRESH.

U-46619		N	MAX (mN·mm ⁻¹)	log EC ₅₀ (log mol·l ⁻¹)
FRESH		12	11,85 ± 0,92	-8,33 ± 0,37
FRESH+nif		10	9,23 ± 0,48*	-7,39 ± 0,10*
FBS-	72H	8	10,58 ± 1,30	-7,28 ± 0,16
	72H+nif	8	8,93 ± 0,86	-7,19 ± 0,13
	NIF 72H+nif	9	10,30 ± 1,22	-7,23 ± 0,22
FBS+	72H	10	7,31 ± 1,11*	-6,89 ± 0,21*
	72H+nif	11	5,72 ± 0,73	-6,85 ± 0,17
	NIF 72H	8	9,11 ± 0,95	-6,91 ± 0,10*
	NIF 72H+nif	13	8,43 ± 0,49	-7,03 ± 0,11

Tabulka 5 Relativní nifedipinová a 2-APB relaxace na U-46619 indukované kontrakci

Data v tabulce jsou prezentována jako průměr hodnot ± S.E.M. N (počet měření), MAX (maximální kontrakce v mN·mm⁻¹), Relativní relaxace (relativní nifedipinová nebo 2-APB relaxace, 100 % reprezentuje MAX).

U-46619		N	MAX (mN·mm ⁻¹)	Relativní relaxace v %
Nifedipin	FRESH	12	11,36 ± 0,87	-42,78 ± 2,94
	72H	10	5,79 ± 0,63	-41,04 ± 9,05
	NIF 72H	8	8,44 ± 0,81	-30,04 ± 2,83
2-APB	FRESH	4	5,52 ± 0,81	-87,96 ± 1,58
	72H	6	4,83 ± 0,46	-72,97 ± 9,36
	NIF 72H	8	5,84 ± 0,52	-55,83 ± 2,91



Obrázek 14 Složky U-46619 indukované kontrakce

Na obrázku je možné pozorovat maximální U-46619 indukovanou kontrakci a následnou relaxaci vyvolanou nifedipinem a 2-aminoethyl difenylborinatem (2-APB) (A). Na grafu (B) je vynesena absolutní nifedipinová relaxace vypočítaná z maximální U-46619 indukované kontrakce. Graf (C) ukazuje absolutní 2-APB indukovanou relaxaci vypočítanou z reziduální kontrakce po nifedipinu. Na grafu (D) je vynesena absolutní reziduální kontrakce. Složka kontrakce na nifedipinu a 2-APB nezávislá. Sloupce reprezentují průměr hodnot \pm S.E.M. ($N=4-12$; viz tab. 5). *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P<0,05$ vs. FRESH. #: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P<0,05$ vs. 72H.

Diskuze

Orgánová kultura

Během kultivace dochází k charakteristickým změnám v kontraktilitě cév. Kontraktilita se i bez přidání FBS do kultivačního roztoku snižuje. Dochází k snížení maximální kontrakce a posunu koncentrační křivky doprava, tzn. je nutné podat vyšší koncentraci agonisty k vyvolání stejné kontrakční odpovědi. Orgánová kultura bez FBS zachovává kontraktilitu cév a neměla by stimulovat proliferaci VSMC. Kultivace bez FBS je asociována s pozměněnou Ca^{2+} signalizací, naznačující mírný posun ve fenotypu VSMC (Lindqvist et al., 1999). Už po 24 hodinách orgánové kultury bez FBS se mírně zvýšila míra apoptózy buněk (Guo et al., 2008) a snížila exprese SRF a myokardinu a současně dramaticky poklesla exprese markerových genů VSMC (Zheng et al., 2010). Celkové snížení kontraktility může být dáno sníženou expresí markerových proteinů VSMC během kultivace, např. těžkého řetězce myosinu (Ishibashi a Bukoski, 1997) nebo katabolismem kontraktálních proteinů. Diferencované VSMC exprimují hlavně proteiny důležité pro kontrakci, oproti tomu proliferující VSMC potřebují ke své funkci výrazně odlišné proteiny. Přidání FBS do média urychluje změny, které se dějí v důsledku samotné kultivace. Hlavní změny v kontraktilitě cév spojené s kultivací ve FBS jsou patrné po již 24 hodinách. Disekce cév a kultivace v médiu znamená pro buňky změnu, na kterou musí nějakým způsobem reagovat. V důsledku zapojení odlišných mechanismů vedoucích ke kontrakci, které jsou růstovými faktory ovlivněny, případně díky různé míře zapojení jednotlivých cest, se setkáváme s odlišnou schopností jednotlivých agonistů kontrahovat cévy po kultivaci s FBS.

Porovnání vlivu metod kultivace na kontraktilitu cév

V historii bylo navrženo mnoho typů metod orgánové kultury. Nejběžněji používaným typem je kultivace v inkubátoru za standardních podmínek 37 °C v atmosféře složené z 95% O_2 a 5% CO_2 (karbogen) (Dreja et al., 2001, Guo et al., 2008, Morita et al., 2010). Vedle toho je snaha tuto metodu vylepšit, aby co nejvíce odpovídala *in vivo* podmínkám. Jedná se převážně o aplikaci intraluminálního tlaku a proudění média v inkubované cévě (Bolz et al., 2000). V naší metodě šlo převážně o dostatečné okysličení a promíchání média, které bylo zajištěné probubláváním roztoku karbogenem. Během třídní kultivace bez FBS byly všechny hodnoty kontrakce snižené, ačkoli statistické testování neprokázalo signifikantní rozdíl mezi

jednotlivými metodami. V metodě s promícháváním média však nebylo možné zajistit v kultivační nádobě dostatečnou relativní vlhkost, a proto docházelo k odpaření určitého procenta roztoku a změně složení roztoku. Přidání FBS do média bylo příčinou intenzivního pění, které bylo možné částečně zeslabit přidáním Antifoamu A do roztoku. Antifoam A ale může negativně ovlivňovat buňky v kultuře (Frye a Berg, 1989). Husté pění FBS vedlo k intenzivnějšímu odpařování vody z roztoku. Žádný z uvedených agonistů nevyvolal ani minimální kontrakci již po 24 hodinách kultivace s FBS. Tento typ kultivace má po přidání FBS do média výrazně negativní účinky na kontraktilitu VSMC, a proto nebyl pro naše pokusy použitelný.

Kontrakce indukovaná roztokem o vysoké koncentraci K^+ (KPSS)

Roztok o vysoké koncentraci K^+ (KPSS) vede u diferencovaných VSMC k depolarizaci membrány následované otevřením L-VDCC a vstupem Ca^{2+} do buňky. Během kultivace bez FBS došlo k postupnému snižování K^+ -indukované kontrakce. Přidání FBS do média tento proces urychlilo. Již po 24 hodinách kultivace s FBS poklesla maximální K^+ -indukovaná kontrakce o 44 % oproti čerstvě izolované artérii, tato hodnota se poté výrazně neměnila. Po 72 hodinové kultivaci s FBS se maximální kontrakce snížila o 51 %. Během kultivace bez FBS docházelo k postupnému snižování maximální K^+ -indukované kontrakce (24 hodin o 10 %, 48 hodin o 40 % a 72 hodin o 60 %). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky studie, která byla provedená na kultivovaných mesenterických artériích (Yamawaki et al., 2000). V jiných studiích se ale K^+ -indukovaná kontrakce během kultivace bez FBS nezměnila (Dreja et al., 2001, Tai et al., 2009), ačkoli byl zaznamenán snížený tok Ca^{2+} přes L-VDCC. U kultivovaných VSMC se výrazně snižuje zastoupení L-VDCC na K^+ -indukované kontrakci. Například u kultivovaných aortálních myocytů nebyla K^+ -indukovaná kontrakce nijak ovlivněna blokátory Ca^{2+} kanálů, ani chelátorem Ca^{2+} , ale naprosto vymizela po podání inhibitoru MLCK (Woodsome et al., 2006). To naznačuje, že depolarizací indukovaná kontrakce kultivovaných VSMC nezávisí plně na vstupu Ca^{2+} přes plasmatickou membránu. Zatímco u diferencovaných myocytů nemá 2-APB (inhibitor membránových kanálů závislých na vnitřních zásobách Ca^{2+} a inhibitor IP_3R) významný efekt, u VSMC v kultuře je 2-APB schopen zabránit K^+ -indukované kontrakci (Park et al., 2008). U kultivovaných buněk je K^+ -indukovaná kontrakce nesena nárůstem $[Ca^{2+}]_i$ částečně z vnitřních zásobáren (Woodsome et al., 2006). Toto snížení depolarizací indukovaného vstupu Ca^{2+} do buňky z extracelulárního

prostoru může být způsobeno dvěma faktory: z důvodu zvýšené bazální $[Ca^{2+}]_i$ je klidový membránový potenciál kultivovaných VSMC již v značně depolarizovaném stavu a Ca^{2+} kanály se nacházejí v inaktivovaném stavu a nemohou být depolarizací otevřené (Platoshyn et al., 2000) nebo je u kultivovaných VSMC snižena exprese L-VDCC (Gollasch et al., 1998). Signifikantní snížení účasti L-VDCC na kontrakci kultivovaných artérií oproti čerstvě izolované artérii se nám podařilo prokázat pouze ve dvou případech: U-46619 a fenylefrinem indukovaná kontrakce po 72 hodinové kultivaci bez FBS (počítáno z relativní nifedipinové relaxace).

Serotoninová kontrakce

Serotoninová kontrakce je u VSMC zprostředkována navázáním serotoninu na $5-HT_{2A}R$ a převážně mobilizací vnitřních zásob Ca^{2+} (Jayaraman et al., 1996). Je tedy méně závislá na L-VDCC než ostatní použité vazokonstriktory. Naše výsledky toto tvrzení podporují, jelikož podíl nifedipin-senzitivní složky v serotoninem indukované kontrakci u čerstvě izolovaných artérií je 16 % z maximální kontrakce (pro srovnání U-46619 indukovaná kontrakce 43 % a fenylefrinová kontrakce 59 %). Zdá se, že serotonin má naopak velkou účast Src kináz, které se podílejí na mobilizaci vnitřních zásob Ca^{2+} , na kontrakci. Inhibiční účinek na Src kinázovou aktivitu byl největší u serotoninové kontrakce a nejmenší u fenylefrinové kontrakce (Lu et al., 2008). Během kultivace bez FBS dochází k zvýšení exprese $5-HT_{2A}R$. Tohoto procesu se z velké míry účastní PKC (Luo et al., 2004) a ERK1/2, které byly nalezeny v brzkých (1-3 hodiny), nikoli však pozdních (24 hodin a víc) fázích kultivace, a proto by mohly hrát úlohu v počátečních fázích transkripce (Cao et al., 2005). V našich výsledcích nedochází ani k nárůstu maximální kontrakce a ani k posunutí serotoninem indukované koncentrační křivky doleva. Nic tedy nenaznačuje tomu, že by docházelo k zvýšené expresi $5-HT_{2A}R$. Zajímavé je, že se maximální serotoninová kontrakce cévy kultivované ve FBS neliší od kontroly (cévy inkubované bez FBS nebo čerstvě izolované cévy) (Obr. 9), protože u ostatních vazokonstriktorů vede kultivace s přidaným FBS k signifikantnímu snížení maximální kontrakce oproti kontrole (Obr. 10 a 11).

Fenylefrinová kontrakce

Fenylefrinem indukovaná kontrakce má u čerstvě izolovaných artérií největší účast L-VDCC na kontrakci (viz výše). V průběhu kultivace bez FBS se tento podíl snižuje (čerstvě izolovaná

artérie 59 % z maximální kontrakce a po 72 hodinové kultivaci 29 % z maximální kontrakce). Absolutní hodnoty reziduální kontrakce po zablokování L-VDCC se nemění. Kultivace bez FBS snižuje nifedipin-senzitivní složku kontrakce, ale neovlivňuje nifedipin-rezistentní složku fenylefrinové kontrakce. Kultivace s FBS vedla k vymizení odpovědi na fenylefrin již po 24 hodinách. Při použití noradrenalinu namísto specifického α_1 adrenergního agonisty fenylefrinu vyšly podobné výsledky. Týdenní kultivace bez FBS vedla k snížení noradrenalinem indukované kontrakce a po přidání 10% FBS do média odpověď na noradrenalin téměř vymizela (Yamawaki et al., 2000). U noradrenalinem vyvolané kontrakce se v průběhu kultivace bez FBS zvyšuje podíl TRP kanálů a Src kináz na indukci kontrakce (Tai et al., 2009). Během kultivace VSMC dochází k vymizení odpovědi na fenylefrin, nikoli však na jiné vazokonstriktory. Dochází k dramatickému snížení exprese a počtu α_{1D} AR na povrchu buňky, které jsou hlavním subtypem zodpovědným za α_1 adrenergní regulaci kontrakce myocytů z aorty (Fan et al., 2009). Snížení exprese α_{1D} AR společně se snížením podílu L-VDCC na kontrakci by mohlo být příčinou radikálního snížení fenylefrinem indukované kontrakce při kultivaci s FBS.

Tromboxanová kontrakce

Z měření vyplývá, že je U-46619 indukovaná kontrakce u čerstvě izolovaných artérií méně závislá na L-VDCC než fenylefrinem indukovaná kontrakce (viz výše). Během kultivace bez FBS se snižuje podíl L-VDCC na kontrakci (čerstvě izolované artérie 43 % z maxima a po 72 hodinové kultivaci 23 % z maxima), ale absolutní hodnoty reziduální kontrakce po zablokování L-VDCC se nemění. Naopak v průběhu kultivace s FBS se nemění podíl L-VDCC na kontrakci (po 72 hodinové kultivaci s FBS 45 % z maxima), ale již po 24 hodinách se výrazně snížila reziduální kontrakce, která se pak nezměnila ani po 72 hodinách kultivace. Kultivace je příčinou snížené exprese tromboxanového receptoru na povrchu VSMC (Zhang et al., 2009). Významnou roli v U-46619 indukované kontrakci hraje Rho-kináza (Pang et al., 2005) a velkou částí se podílejí i SOC (Suzuki et al., 2012). Exprese SOC (Bergdahl et al., 2005, Yu et al., 2003) a komponent Rho-kinázové cesty se v průběhu kultivace pravděpodobně zvyšují (Woodsome et al., 2006). Účast těchto změn však nemůžeme posoudit.

Kultivace s nifedipinem

Růst VSMC je částečně kontrolován $[Ca^{2+}]_i$. L-VDCC hrají důležitou roli v homeostáze intracelulárního Ca^{2+} (Short et al., 1993). Uvažuje se, že nifedipin a jiné dihydropyridinové deriváty zpomalují proliferaci VSMC snížením dostupnosti intracelulárního Ca^{2+} (viz kapitola 3 Spřažení excitace a transkripce). Zablokování L-VDCC vede k snížení proliferace a růstu VSMC (Cartin et al., 2000). Přidání FBS k čerstvě izolovaným artériím vyvolá nárůst $[Ca^{2+}]_i$ a kontrakci cévy (Ishibashi a Bukoski, 1997). Po několikadenní kultivaci cév s FBS je reakce na akutní podání FBS zachována. Kultivace s FBS konstantně zvyšuje $[Ca^{2+}]_i$ ve VSMC (Dreja a Hellstrand, 1999). Přidání verapamilu (blokátor L-VDCC) do kultivačního roztoku s FBS pomáhá zachovat kontraktilitu cév (Lindqvist et al., 1999). V *in vitro* pokusech s lidskými aortálními VSMC byl prokázán inhibiční efekt nifedipinu na dediferenciaci VSMC. Během 72 hodin kultivace s nifedipinem signifikantně narostla relativní exprese markerových genů diferencovaného fenotypu a poklesla exprese genů proliferujícího fenotypu. Nifedipin snižuje expresi fosforylovaného Akt, jejíž zvýšení souvisí s VSMC dediferenciací (Kaimoto et al., 2010). Další L-VDCC blokátory, amlodipin a benidipin, fungují obdobně (Arakawa a Hasegawa, 2006). Amlodipin signifikantně snižuje syntézu DNA u VSMC z aorty SHR. Ošetření amlodipinem snižuje expresi růstových faktorů, které jsou u SHR v nadprodukci (Lai et al., 2002). Tyto výsledky byly potvrzeny *in vivo* na modelu „mechanického poškození cévy“ (Kaimoto et al., 2010). Zablokování L-VDCC během kultivace vede k několika změnám oproti cévám s funkčním L-VDCC: nedochází k nárůstu $[Ca^{2+}]_i$ v průběhu kultivace a odlišná $[Ca^{2+}]_i$ aktivuje odlišné mechanismy transkripce, což má za následek snížení exprese růstových faktorů a genů proliferativního fenotypu. Existují však studie, které naopak tvrdí, že funkční L-VDCC jsou důležité k potlačení dediferenciace VSMC (Kudryavtseva et al., 2014). Kultivace ve FBS s nifedipinem 24 hodin nijak neovlivnila fenylefrinovou kontrakci (fenylefrin nevyvolal po 24 hodinách s nifedipinem a FBS žádnou kontraktilní odpověď cévy). Jestliže došlo k masivnímu snížení α_1AR (Fan et al., 2009), pak nezáleží na tom, jestli se změnil mechanismy kontrakce, protože se fenylefrin nebude mít na co navázat na povrchu VSMC, a nebude mít tak prostředek, pomocí něhož by signál dovnitř buňky předal. V experimentech s tromboxanovým analogem U-46619 zvýšila kultivace s nifedipinem maximální indukovanou kontrakci. Zablokování L-VDCC by mohlo vést v rámci kompenzace k zvýšené expresi L-VDCC, která by mohla být vysvětlením nárůstu maximální U-46619 indukované kontrakce. Výsledky

našich experimentů tuto hypotézu nepotvrdily. Z výsledů je zřejmé, že se změnil podíl jednotlivých složek kontrakce, protože účast 2-APB senzitivní složky a L-VDCC senzitivní složky na kontrakci se během kultivace s nifedipinem snížila oproti čerstvě izolovaným cévám i oproti kontrolám 72 hodin s FBS. Nifedipin-rezistentní složka kontrakce se naopak zvýšila na hodnotu, která byla naměřená u čerstvě izolovaných artérií a nifedipin- a 2-APB-rezistentní složka U-46619 indukované kontrakce signifikantně narostla oproti čerstvě izolovaným artériím. Zvýšení maximální tromboxanové kontrakce v průběhu kultivace s nifedipinem je indukováno zvýšením právě této, na 2-APB a nifedipinu nezávislé složky. Mohlo by se jednat o zvýšenou Ca^{2+} senzitivizaci v důsledku zvýšení exprese komponent Rho-kinázové cesty (Woodsome et al., 2006), to však nebylo možné na základě našich pokusů posoudit. Kultivace s nifedipinem vede k zvýšení maximální U-46619 indukované kontrakce a potlačuje negativní efekt kultivace s FBS na kontraktilitu cév, a to díky změně zastoupení jednotlivých složek kontrakce. Zda se jedná o zpomalení proliferace VSMC pomocí snížení dostupnosti intracelulárního Ca^{2+} v důsledku chronického zablokování L-VDCC nejsme na základě současných výsledků schopni posoudit.

Závěr

V diplomové práci se mi podařilo objasnit základní charakteristiky kontraktility cév v médiu bez fetálního hovězího séra (FBS) a s přidaným FBS v různých časových úsecích kultivace. Kultivace s přidaným FBS zvětšuje změny, které se dějí v důsledku samotné kultivace, konkrétně snížení kontraktility femorálních artérií. Při dlouhodobém zablokování L-VDCC se zvýšila maximální kontrakce kultivovaných cév proti cévám kultivovaným bez zablokovaných L-VDCC. Jestli se jedná o snížení dediferenciace VSMC v důsledku zablokování L-VDCC bohužel nelze touto metodou s jistotou určit. Bylo by potřeba připojit i jiné, převážně molekulární metody.

Literatura

- Albert, A. P. & Large, W. A. 2002. Activation of store-operated channels by noradrenaline via protein kinase C in rabbit portal vein myocytes. *Journal of Physiology-London*, 544, 113-125.
- Alberts, A. S., Montminy, M., Shenolikar, S. & Feramisco, J. R. 1994. Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase-1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 4398-4407.
- Amberg, G. C., Rossow, C. F., Navedo, M. F. & Santana, L. F. 2004. NFATc3 regulates Kv2.1 expression in arterial smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 47326-47334.
- Arakawa, E. & Hasegawa, K. 2006. Benidipine, a calcium channel blocker, regulates proliferation and phenotype of vascular smooth muscle cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100, 149-156.
- Bakowski, D., Glitsch, M. D. & Parekh, A. B. 2001. An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current I-CRAC in RBL-1 cells. *Journal of Physiology-London*, 532, 55-71.
- Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P. & Crabtree, G. R. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, 275, 1930-1933.
- Bergdahl, A., Gomez, M. F., Wihlborg, A. K., Erlinge, D., Eyjolfson, A., Xu, S. Z., Beech, D. J., Dreja, K. & Hellstrand, P. 2005. Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca²⁺ entry. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288, C872-C880.
- Berra-Romani, R., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M. V. & Golovina, V. A. 2008. Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295, C779-C790.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, 361, 315-325.
- Bilmen, J. G. & Michelangeli, F. 2002. Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by 2-aminoethoxydiphenylborate. *Cellular Signalling*, 14, 955-960.
- Birukov, K. G., Bardy, N., Lehoux, S., Merval, R., Shirinsky, V. P. & Tedgui, A. 1998. Intraluminal pressure is essential for the maintenance of smooth muscle caldesmon and filamin content in aortic organ culture. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 18, 922-927.
- Bolz, S. S., Pieperhoff, S., De Wit, C. & Pohl, U. 2000. Intact endothelial and smooth muscle function in small resistance arteries after 48 h in vessel culture. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 279, H1434-H1439.
- Bolz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., de Wit, C., Loirand, G. & Pohl, U. 2003. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation

- of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation*, 107, 3081-3087.
- Bylund, D. B. 1992. Subtypes of alpha-1-adrenergic and alpha-2-adrenergic receptors. *FASEB Journal*, 6, 832-839.
- Cao, Y. X., He, L. C., Xu, C. B., Luo, G. G. & Edvinsson, L. 2005. Enhanced transcription of contractile 5-hydroxytryptamine 2A receptors via extracellular signal-regulated kinase 1/2 after organ culture of rat mesenteric artery. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96, 282-288.
- Cartin, L., Lounsbury, K. M. & Nelson, M. T. 2000. Coupling of Ca^{2+} to CREB activation and gene expression in intact cerebral arteries from mouse - Roles of ryanodine receptors and voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Circulation Research*, 86, 760-767.
- Catterall, W. A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 521-555.
- Chen, J. Y., Kitchen, C. M., Streb, J. W. & Miano, J. M. 2002. Myocardin: A component of a molecular switch for smooth muscle differentiation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 1345-1356.
- Chow, C. W. & Davis, R. J. 2000. Integration of calcium and cyclic AMP signaling pathways by 14-3-3. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 702-712.
- Coleman, R. A., Smith, W. L. & Narumiya, S. 1994. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors - properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological Reviews*, 46, 205-229.
- Creemers, E. E., Sutherland, L. B., McAnally, J., Richardson, J. A. & Olson, E. N. 2006. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development. *Development*, 133, 4245-4256.
- Dash, P. K., Karl, K. A., Colicos, M. A., Prywes, R. & Kandel, E. R. 1991. cAMP response element-binding protein is activated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent as well as camp-dependent protein-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 5061-5065.
- Dimopoulos, G. J., Semba, S., Kitazawa, K., Eto, M. & Kitazawa, T. 2007. Ca^{2+} dependent rapid Ca^{2+} sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circulation Research*, 100, 121-129.
- Dorn, G. W., Becker, M. W. & Davis, M. G. 1992. Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth-muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 24897-24905.
- Dreja, K., Bergdahl, A. & Hellstrand, P. 2001. Increased store-operated Ca^{2+} entry into contractile vascular smooth muscle following organ culture. *Journal of Vascular Research*, 38, 324-331.

- Dreja, K. & Hellstrand, P. 1999. Differential modulation of caffeine- and IP₃-induced calcium release in cultured arterial tissue. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276, C1115-C1120.
- Eto, M., Kitazawa, T. & Brautigan, D. L. 2004. Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 8888-8893.
- Fan, L.-l., Ren, S., Zhou, H., Wang, Y., Xu, P.-x., He, J.-q. & Luo, D.-l. 2009. α_{1D} -adrenergic receptor insensitivity is associated with alterations in its expression and distribution in cultured vascular myocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 1585-1593.
- Feng, J. H., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D. J. & Nakano, T. 1999. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 37385-37390.
- Flemming, R., Xu, S. Z. & Beech, D. J. 2003. Pharmacological profile of store-operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, 139, 955-965.
- Florian, J. A. & Watts, S. W. 1998. Integration of mitogen-activated protein kinase activation in vascular 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor signal transduction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284, 346-355.
- Frye, G. C. & Berg, J. C. 1989. Antifoam action by solid particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 127, 222-238.
- Fukata, Y., Amano, M. & Kaibuchi, K. 2001. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 32-39.
- Furchgott, R. F. & Vanhoutte, P. M. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB Journal*, 3, 2007-2018.
- Ghisal, P., Vandenberg, G. & Morel, N. 2003. Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries. *Journal of Physiology-London*, 551, 855-867.
- Gisbert, R., Perez-Vizcaino, F., Cogolludo, A. L., Noguera, M. A., Ivorra, M. D., Tamargo, J. & D'Ocon, P. 2003. Cytosolic Ca²⁺ and phosphoinositide hydrolysis linked to constitutively active α_{1D} -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305, 1006-1014.
- Gohla, A., Schultz, G. & Offermanns, S. 2000. Role for G₁₂/G₁₃ in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circulation Research*, 87, 221-227.
- Gollasch, M., Haase, H., Ried, C., Lindschau, C., Morano, I., Luft, F. C. & Haller, H. 1998. L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB Journal*, 12, 593-601.

- Gordon, J. W., Pagiatakis, C., Salma, J., Du, M., Andreucci, J. J., Zhao, J. Z., Hou, G. P., Perry, R. L., Dan, Q. H., Courtman, D., Bendeck, M. P. & McDermott, J. C. 2009. Protein kinase A-regulated assembly of a MEF2.HDAC4 repressor complex controls c-Jun expression in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 19027-19042.
- Guo, H. Z., Makarova, N., Cheng, Y. H., E, S. Y., Ji, R. R., Zhang, C. X., Farrar, P. & Tigyi, G. 2008. The early- and late stages in phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: Differential roles for lysophosphatidic acid. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781, 571-581.
- Helliwell, R. M. & Large, W. A. 1997. α_1 -adrenoceptor activation of a non-selective cation current in rabbit portal vein by 1,2-diacyl-sn-glycerol. *Journal of Physiology-London*, 499, 417-428.
- Hendrix, J. A., Wamhoff, B. R., McDonald, O. G., Sinha, S., Yoshida, T. & Owens, G. K. 2005. 5'CArG degeneracy in smooth muscle α -actin is required for injury-induced gene suppression in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 418-427.
- Himpens, B., Kitazawa, T. & Somlyo, A. P. 1990. Agonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 417, 21-28.
- Ihara, E., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J., Nawata, H. & Kanaide, H. 2002. Mechanism of down-regulation of L-type Ca^{2+} channel in the proliferating smooth muscle cells of rat aorta. *Journal of Cellular Biochemistry*, 87, 242-251.
- Ishibashi, K. & Bukoski, R. D. 1997. Myosin isoform expression and force generation in cultured resistance arteries. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 272, C1144-C1150.
- Isotani, E., Zhi, G., Lau, K. S., Huang, J., Mizuno, Y., Persechini, A., Geguchadze, R., Kamm, K. E. & Stull, J. T. 2004. Real-time evaluation of myosin light chain kinase activation in smooth muscle tissues from a transgenic calmodulin-biosensor mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 6279-6284.
- Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondriasova, E. & Marks, A. R. 1996. Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science*, 272, 1492-1494.
- Jimenez-Altayo, F., Briones, A. M., Giraldo, J., Planas, A. M., Salaces, M. & Vila, E. 2006. Increased superoxide anion production by interleukin-1 beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316, 42-52.
- Kaimoto, T., Yasuda, O., Ohishi, M., Mogi, M., Takemura, Y., Suhara, T., Ogihara, T., Fukuo, K. & Rakugi, H. 2010. Nifedipine inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation via downregulation of Akt signaling. *Hypertension*, 56, 247-U133.
- Kandabashi, T., Shimokawa, H., Mukai, Y., Matoba, T., Kunihiro, I., Morikawa, K., Ito, M., Takahashi, S., Kaibuchi, K. & Takeshita, A. 2002. Involvement of Rho-kinase in agonists-

- induced contractions of arteriosclerotic human arteries. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 22, 243-248.
- Klemm, D. J., Watson, P. A., Frid, M. G., Dempsey, E. C., Schaack, J., Colton, L. A., Nesterova, A., Stenmark, K. R. & Reusch, J. E. B. 2001. cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 46132-46141.
- Kudryavtseva, O., Herum, K. M., Dam, V. S., Straarup, M. S., Kamaev, D., Boedtkjer, D. M. B., Matchkov, V. V. & Aalkjaer, C. 2014. Downregulation of L-type Ca^{2+} channel in rat mesenteric arteries leads to loss of smooth muscle contractile phenotype and inward hypertrophic remodeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 306, H1287-H1301.
- Kuga, T., Kobayashi, S., Hirakawa, Y., Kanaide, H. & Takeshita, A. 1996. Cell cycle-dependent expression of L- and T-Type Ca^{2+} currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circulation Research*, 79, 14-19.
- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K. & Ito, M. 1997. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 12257-12260.
- Lai, Y. M., Fukuda, N., Su, J. Z., Suzuki, R., Ikeda, Y., Takagi, H., Tahira, Y. & Kanmatsuse, K. 2002. Novel mechanisms of the antiproliferative effects of amlodipine in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25, 109-115.
- Leung, Y. K., Du, J. A., Huang, Y. & Yao, X. Q. 2010. Cyclic nucleotide-gated channels contribute to thromboxane A_2 -induced contraction of rat small mesenteric arteries. *PLoS One*, 5, 7.
- Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D. L. & Birnbaumer, L. 2007. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 4682-4687.
- Lindqvist, A., Nordstrom, I., Malmqvist, U., Nordenfelt, P. & Hellstrand, P. 1999. Long-term effects of Ca^{2+} on structure and contractility of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 277, C64-C73.
- Lipskaia, L., del Monte, F., Capiod, T., Yacoubi, S., Hadri, L., Hours, M., Hajjar, R. J. & Lompre, A. M. 2005. Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat. *Circulation Research*, 97, 488-495.

- Liu, Y. F., Sun, L. Y., Singer, D. V., Ginnan, R. & Singer, H. A. 2013. CaMKII delta-dependent inhibition of cAMP-response element-binding protein activity in vascular smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 33519-33529.
- Lu, R., Alioua, A., Kumar, Y., Kundu, P., Eghbali, M., Weisstaub, N. V., Gingrich, J. A., Stefani, E. & Toro, L. 2008. c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT_{2A} receptor-mediated contraction in rat aorta. *Journal of Physiology-London*, 586, 3855-3869.
- Luo, G. G., Xu, C. B., Cao, Y. X. & Edvinsson, L. 2004. Transcriptional up-regulation in expression of 5-hydroxytryptamine_{2A} and transcriptional down-regulation of angiotensin II type 1 receptors during organ culture of rat mesenteric artery. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 95, 280-287.
- Miano, J. M. 2003. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35, 577-593.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I. & Treisman, R. 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113, 329-342.
- Morita, T., Okada, M., Hara, Y. & Yamawaki, H. 2011. Mechanisms underlying impairment of endothelium-dependent relaxation by fetal bovine serum in organ-cultured rat mesenteric artery. *European Journal of Pharmacology*, 668, 401-406.
- Morita, T., Yamawaki, H., Okada, M. & Hara, Y. 2010. Contractile characteristics of rat mesenteric artery after organ culture. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72, 1621-1627.
- Mulvany, M. J. & Halpern, W. 1977. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*, 41, 19-26.
- Najwer, I. & Lilly, B. 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV activates cysteine-rich protein 1 through adjacent CRE and CArG elements. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289, C785-C793.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. & Lederer, W. J. 1995. Relaxation of arterial smooth-muscle by calcium sparks. *Science*, 270, 633-637.
- Nilsson, L. M., Sun, Z. W., Nilsson, J., Nordstrom, I., Chen, Y. W., Molkentin, J. D., Wide-Svensson, D., Hellstrand, P., Lydrup, M. L. & Gomez, M. F. 2007. Novel blocker of NFAT activation inhibits IL-6 production in human myometrial arteries and reduces vascular smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292, C1167-C1178.
- Okamura, H., Aramburu, J., Garcia-Rodriguez, C., Viola, J. P. B., Raghavan, A., Tahliliani, M., Zhan, X. L., Qin, J., Hogan, P. G. & Rao, A. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular Cell*, 6, 539-550.

- Pagiatakis, C., Gordon, J. W., Ehyai, S. & McDermott, J. C. 2012. A Novel RhoA/ROCK-CPI-17-MEF2C Signaling Pathway Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 8361-8370.
- Pakala, R., Willerson, J. T. & Benedict, C. R. 1997. Effect of serotonin, thromboxane A₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 96, 2280-2286.
- Pang, H. A., Guo, Z. H., Su, W., Xie, Z. W., Eto, M. & Gong, M. C. 2005. RhoA-Rho kinase pathway mediates thrombin- and U-46619-induced phosphorylation of a myosin phosphatase inhibitor, CPI-17, in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289, C352-C360.
- Pang, X. & Sun, N. L. 2009. Calcineurin-NFAT signaling is involved in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 537-544.
- Park, K. M., Trucillo, M., Serban, N., Cohen, R. A. & Bolotina, V. M. 2008. Role of iPLA₂ and store-operated channels in agonist-induced Ca²⁺ influx and constriction in cerebral, mesenteric, and carotid arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294, H1183-H1187.
- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83, 117-161.
- Pipes, G. C. T., Creemers, E. E. & Olson, E. N. 2006. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes & Development*, 20, 1545-1556.
- Platoshyn, O., Golovina, V. A., Bailey, C. L., Limsuwan, A., Krick, S., Juhaszova, M., Seiden, J. E., Rubin, L. J. & Yuan, J. X. J. 2000. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279, C1540-C1549.
- Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Singer, H. A. & Trebak, M. 2009. Evidence for STIM1-and Orai1-dependent store-operated calcium influx through I-CRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB Journal*, 23, 2425-2437.
- Pulver, R. A., Rose-Curtis, P., Roe, M. W., Wellman, G. C. & Lounsbury, K. M. 2004. Store-operated Ca²⁺ entry activates the CREB transcription factor in vascular smooth muscle. *Circulation Research*, 94, 1351-1358.
- Pulver-Kaste, R. A., Barlow, C. A., Bond, J., Watson, A., Penar, P. L., Tranmer, B. & Lounsbury, K. M. 2006. Ca²⁺ source-dependent transcription of CRE-containing genes in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291, H97-H105.

- Ren, J. L., Albinsson, S. & Hellstrand, P. 2010. Distinct effects of voltage- and store-dependent calcium influx on stretch-induced differentiation and growth in vascular smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 31829-31839.
- Saleh, S. N., Albert, A. P., Peppiatt, C. M. & Large, W. A. 2006. Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *Journal of Physiology-London*, 577, 479-495.
- Short, A. D., Bian, J. H., Ghosh, T. K., Waldron, R. T., Rybak, S. L. & Gill, D. L. 1993. Intracellular Ca^{2+} pool content is linked to control of cell-growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 4986-4990.
- Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S. & Bolotina, V. M. 2004. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nature Cell Biology*, 6, 113-+.
- Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. 2003. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews*, 83, 1325-1358.
- Spencer, J. A. & Misra, R. P. 1996. Expression of the serum response factor gene is regulated by serum response factor binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 16535-16543.
- Stevenson, A. S., Gomez, M. F., Hill-Eubanks, D. C. & Nelson, M. T. 2001. NFAT4 movement in native smooth muscle - A role for differential Ca^{2+} signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 15018-15024.
- Sun, P. Q., Enslin, H., Myung, P. S. & Maurer, R. A. 1994. Differential activation of CREB by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & Development*, 8, 2527-2539.
- Suzuki, K., Saito, S. Y. & Ishikawa, T. 2012. Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in thromboxane A_2 receptor-mediated extracellular Ca^{2+} influx in rat aorta. *European Journal of Pharmacology*, 677, 123-130.
- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H. & Kozasa, T. 2003. G alpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 733-738.
- Tai, K., Vandenberg, G., Hamaide, M. C., Wibo, M. & Morel, N. 2009. Effect of organ culture on noradrenaline-evoked contraction, calcium signalling and TRPC expression in rat mesenteric artery. *Journal of Vascular Research*, 46, 353-364.
- Tanoue, A., Nasa, Y., Koshimizu, T., Shinoura, H., Oshikawa, S., Kawai, T., Sunada, S., Takeo, S. & Tsujimoto, G. 2002. The α_{1D} adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 765-775.

- Tokunou, T., Ichiki, T., Takeda, K., Funakoshi, Y., Iino, N. & Takeshita, A. 2001. cAMP response element-binding protein mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 21, 1764-1769.
- Tosun, M., Paul, R. J. & Rapoport, R. M. 1998. Role of extracellular Ca^{++} influx via L-type and non-L-type Ca^{++} channels in thromboxane A_2 receptor mediated contraction in rat aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284, 921-928.
- Treisman, R. 1992. The serum response element. *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 423-426.
- Vallot, O., Combettes, L., Jourdon, P., Inamo, J., Marty, I., Claret, M. & Lompre, A. M. 2000. Intracellular Ca^{2+} handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 20, 1225-1235.
- Wamhoff, B. R., Bowles, D. K., McDonald, O. G., Sinha, S., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. & Owens, G. K. 2004. L-type voltage-gated Ca^{2+} channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a Rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circulation Research*, 95, 406-414.
- Wang, L. H. & Kulmacz, R. J. 2002. Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-9, 409-422.
- Watts, S. W., Morrison, S. F., Davis, R. P. & Barman, S. M. 2012. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacological Reviews*, 64, 359-388.
- Wellman, G. C., Cartin, L., Eckman, D. M., Stevenson, A. S., Saundry, C. M., Lederer, W. J. & Nelson, M. T. 2001. Membrane depolarization, elevated Ca^{2+} entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281, H2559-H2567.
- Wilson, D. P., Susnjar, M., Kiss, E., Sutherland, C. & Walsh, M. P. 2005. Thromboxane A_2 -induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochemical Journal*, 389, 763-774.
- Woodsome, T. P., Polzin, A., Kitazawa, K., Eto, M. & Kitazawa, T. 2006. Agonist- and depolarization-induced signals for myosin light chain phosphorylation and force generation of cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of Cell Science*, 119, 1769-1780.
- Wu, D. Q., Katz, A., Lee, C. H. & Simon, M. I. 1992. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha-subunits of G_q family. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 25798-25802.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M. & Lewis, R. S. 2006. Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 174, 803-813.

- Xi, X. P., Graf, K., Goetze, S., Fleck, E., Hsueh, W. A. & Law, R. E. 1999. Central role of the MAPK pathway in Ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19, 73-82.
- Xing, J., Ginty, D. D. & Greenberg, M. E. 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 273, 959-963.
- Yamakawa, T., Tanaka, S., Numaguchi, K., Yamakawa, Y., Motley, E. D., Ichihara, S. & Inagami, T. 2000. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 35, 313-318.
- Yamawaki, H., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Nakamura, S., Nakayama, H., Doi, K. & Karaki, H. 2000. Morphological and functional changes of rabbit mesenteric artery cultured with fetal bovine serum. *Life Sciences*, 67, 807-820.
- Yoshida, T., Gan, Q., Shang, Y. T. & Owens, G. K. 2007. Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292, C886-C895.
- Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A. & Yuan, J. X. J. 2003. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 284, C316-C330.
- Zhang, W., Zhang, Y. P., Edvinsson, L. & Xu, C. B. 2009. Transcriptional down-regulation of thromboxane A₂ receptor expression via activation of MAPK ERK1/2, p38/NF-kappa B pathways. *Journal of Vascular Research*, 46, 162-174.
- Zheng, J. P., Ju, D. H., Shen, J. B., Yang, M. Z. & Li, L. 2010. Disruption of actin cytoskeleton mediates loss of tensile stress induced early phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells in organ culture. *Experimental and Molecular Pathology*, 88, 52-57.
- Zhu, J. Y., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J. C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P. & McKeon, F. 1998. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell*, 93, 851-861.