

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Oxidační stres a stav endotelu v myokardu myší
s vysokými plazmatickými hladinami solubilního
endoglinu**

Iveta Dusílková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Poděkování

„Ráda bych poděkovala PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za odborné vedení, milou spolupráci a trpělivost při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu po celou dobu mého studia.“

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

V Hradci Králové dne

OBSAH

1.	ABSTRAKT.....	7
2.	ABSTRACT.....	8
3.	ÚVOD	9
4.	CÍL PRÁCE	10
5.	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
5.1	Srdce.....	11
5.1.1	Stavba srdce	11
5.1.1.1	Srdeční stěna.....	11
5.1.1.2	Cévy a nervy srdce	13
5.1.2	Patologická fyziologie srdce	13
5.1.2.1	Hyperlipoproteinémie.....	14
5.1.2.2	Ateroskleróza a její vztah k poškození srdce	15
5.1.2.3	Ischemická choroba srdeční	15
5.1.2.4	Srdeční selhání.....	17
5.1.2.5	Kardiomyopatie	17
5.1.2.6	Oxidační stres	18
5.2	Vybrané markery protekce endotelu, zánětu a oxidačního stresu	19
5.2.1	eNOS.....	19
5.2.2	peNOS	23
5.2.3	VCAM-1	25
5.2.4	HO-1.....	27
5.2.5	SOD-3.....	29
5.2.6	Kataláza.....	31
5.3	Endoglin	32
5.3.1	Tkáňový endoglin.....	33
5.3.2	Solubilní endoglin	34
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36

6.1	Použitá zvířata	36
6.2	ELISA analýza hladin solubilního endoglinu	36
6.3	Biochemická analýza	37
6.4	Pracovní postup pro Western blot analýzu	37
6.4.1	Příprava vzorků	38
6.4.2	Určení koncentrace proteinů	38
6.4.3	Gelová elektroforéza	38
6.4.4	Blotování	40
6.4.5	Imunodetekce	41
6.4.6	Chemiluminiscenční detekce	42
6.5	Vyhodnocení	43
7.	VÝSLEDKY	44
7.1	ELISA analýza	44
7.2	Biochemická analýza	44
7.3	Western blot analýza	45
7.3.1	Expres molekuly eNOS	46
7.3.2	Expres molekuly peNOS	47
7.3.3	Expres molekuly VCAM-1	48
7.3.4	Expres molekuly HO-1	49
7.3.5	Expres molekuly SOD-3	50
7.3.6	Expres molekuly kataláza	51
8.	DISKUSE	52
9.	ZÁVĚR	55
10.	POUŽITÉ ZKRATKY	56
11.	SEZNAM TABULEK	59
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ	59

13.	SEZNAM GRAFŮ.....	59
14.	POUŽITÁ LITERATURA.....	60

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Oxidační stres a stav endotelu v myokardu myší s vysokými plazmatickými hladinami solubilního endoglinu

Autor diplomové práce: Iveta Dusílková

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

Cíl práce: V současné době je solubilní endoglin mimo jiné považován za marker endotelové dysfunkce a hraje významnou roli v mnoha kardiovaskulárních onemocněních. Cílem této práce bylo zhodnotit expresi vybraných markerů protekce endotelu, zánětu a oxidačního stresu v srdeční stěně transgenního modelu myší s vysokými plazmatickými hladinami lidského solubilního endoglinu, které byly krmeny vysokotukovou dietou.

Metody: Pro tuto práci byly použity samice transgenního myšího kmene CBAx57BL/6J vykazující vysoké plazmatické hladiny lidského solubilního endoglinu krmené dietou s vysokým obsahem tuku (40 %) a cholesterolu (1,25 %). Jako kontrolní skupina byly použity sourozenské samice vykazující nedetekovatelné hladiny lidského solubilního endoglinu. Hodnocena byla exprese vybraných molekul eNOS, peNOS, VCAM-1, HO-1, SOD-3 a kataláza pomocí metody Western blot. Hladiny celkového cholesterolu byly zjišťovány biochemickou analýzou. Dále byly hodnoceny hladiny lidského solubilního endoglinu pomocí ELISA analýzy.

Výsledky: Biochemická analýza neukázala signifikantní rozdíl v hladinách celkového cholesterolu mezi oběma skupinami myší. Western blot analýza také neprokázala signifikantní rozdíl v expresi vybraných proteinů v srdeční stěně mezi skupinou myší s vysokými hladinami solubilního endoglinu a skupinou kontrolní.

Závěr: Z uvedených výsledků lze usuzovat, že vysoké hladiny solubilního endoglinu v kombinaci s vysokotukovou dietou nemají vliv na expresi markerů protekce endotelu, zánětu a oxidačního stresu v srdeční stěně transgenního myšího kmene. Finální závěry však budou předmětem dalších navazujících studií.

Klíčová slova: solubilní endoglin, endotelová NO syntáza, fosforylovaná endotelová NO syntáza, cévní adhezní molekula 1, hemoxygenáza 1, superoxiddismutáza 3, kataláza, vysokotuková dieta, Western blot, oxidační stres, srdce

2. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Oxidative stress and endothelial condition in myocardium of mice expressing high levels of soluble endoglin in plasma

Author of diploma thesis: Iveta Dusílková

Supervisor: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Background: In recent years, soluble endoglin is among others considered as a marker of endothelial dysfunction and plays a crucial role in many cardiovascular diseases. This study aimed to evaluate the expression of specific markers of endothelium protection, inflammation and oxidative stress in cardiac wall of transgenic model of mice with high plasma levels of human soluble endoglin, which was fed a high fat diet.

Methods: For this work, we used a female transgenic mouse model on a CBAxC57BL/6J background with high plasma levels of human soluble endoglin, fed a high fat (40%) and high cholesterol (1.25%) diet. As a control group, we used their female littermates showing undetectable levels of human soluble endoglin. The expression of the selected molecules eNOS, peNOS, VCAM-1, HO-1, SOD-3 and catalase was evaluated by Western blot analysis. Total cholesterol levels were detected by biochemical analysis. The levels of human soluble endoglin were detected by ELISA analysis.

Results: Biochemical analysis didn't show any significant difference in total cholesterol levels between both groups of mice. Western blot analysis also failed to demonstrate significant difference in the expression of selected proteins in the cardiac wall between the group of mice with high soluble endoglin levels and the control group.

Conclusion: From these results, there is possible to suggest that high levels of soluble endoglin in combination with high fat diet do not affect the expression of markers of endothelium protection, inflammation and oxidative stress in cardiac wall of transgenic mouse strain. However, final conclusions are the subject of ongoing studies.

Keywords: soluble endoglin, endothelial NO synthase, phosphorylated endothelial NO synthase, vascular cell adhesion molecule 1, heme oxygenase 1, superoxide dismutase 3, catalase, high fat diet, Western blot, oxidative stress, heart

3. ÚVOD

Onemocnění srdce a cév, při kterých hraje významnou roli i oxidační stres, jsou nejčastější příčinou úmrtí v rozvinutých zemích. Srdce je orgán, který je pro své energetické nároky, vysokou spotřebu kyslíku a velký počet mitochondrií náchylný k oxidačnímu stresu. Oxidační stres je společně s hypertenzí nebo hyperlipidemií rizikovým faktorem, který může vést k endotelové dysfunkci. Buňky srdečního endotelu se podílejí na metabolismu, růstu, stažitelnosti i rytmicitě srdce, díky čemuž se může dysfunkce endotelu podílet na remodelaci srdce i srdečním selhání (Brutsaert, 2003).

Endoglin je transmembránový glykoprotein, který slouží jako koreceptor pro členy nadrodiny proteinů transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β). Endoglin je spojený s různými fyziologickými a patofyziologickými procesy, které souvisejí s kardiovaskulárním vývojem (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2010), aterosklerózou (Nachtigal et al., 2012), ischemickou chorobou srdeční (Ikemoto et al., 2012) nebo preeklampsií (Venkatesha et al., 2006). Ve vztahu k srdci se ukázalo, že endoglin reguluje srdeční remodelaci při srdečním selhání (Kapur et al., 2012) a po infarktu myokardu (van Laake et al., 2006).

Solubilní forma endoglinu (sEng) je tvořena odštěpením extracelulární domény membránově vázaného endoglinu, která je poté uvolněna do extracelulární tekutiny a plazmy (Hawinkels et al., 2010). Zvýšené hladiny cirkulujícího sEng byly nalezeny za různých patologických podmínek spojených s kardiovaskulárním systémem, včetně preeklampsie, hypertenze (Venkatesha et al., 2006), aterosklerózy (Blann et al., 1996), hypercholesterolémie (Bláha et al., 2008) a srdečního selhání (Kapur et al., 2012). Předpokládá se, že by zvýšené hladiny sEng mohly být považovány za biomarker související s endotelovou dysfunkcí (Nachtigal et al., 2012).

Pro studium solubilního endoglinu byl speciálně vytvořen transgenní myší model exprimující lidský solubilní endoglin. V našem případě byla zvířatům navíc podávána dieta s vysokým obsahem tuku a cholesterolu.

Tato práce se věnuje posouzení vlivu kombinace vysokých hladin solubilního endoglinu a vysokotukové diety na stav myšího myokardu. Stav myokardu byl hodnocen sledováním exprese markerů protekce endotelu, zánětu a oxidačního stresu.

4. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo porovnat expresi vybraných molekul v srdeční stěně dvou skupin myší pomocí metody Western blot. Pro porovnání byla použita skupina geneticky modifikovaných myší s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu a jejich sourozenecká skupina s nízkými hladinami lidského solubilního endoglinu. Obě skupiny byly krmeny dietou s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Hodnocenými molekulami byly markery protekce endotelu, zánětu a oxidačního stresu.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Srdce

5.1.1 Stavba srdce

Srdce je dutý svalový orgán tvaru nepravidelného kužele uložený v mediastinu za sternem. Je uloženo v obalu zvaném pericardium – osrdečník, prostřednictvím kterého nasedá na bránici (Čihák et al., 2004). Obsahuje čtyři dutiny – pravou a levou předsíň a pravou a levou komoru. Svalovina předsíní je od svaloviny komor oddělena vazivovým srdečním skeletem (Trojan et al., 2003), který slouží jako východisko chlopní a místo začátku a úponu kardiomyocytů (Junqueira et al., 1999).

5.1.1.1 Srdeční stěna

Srdeční stěna se skládá ze tří vrstev: endokard, myokard a epikard (Čihák et al., 2004).

Endokard

Endokard je hladká, lesklá a průsvitná membrána, která vystýlá srdeční dutiny. Spojení se svalovinou je pevné, endokard není posunlivý (Čihák et al., 2004). Je homologní s *tunica intima* velkých cév. Je složený z jediné vrstvy plochých endotelových buněk a tenké subendotelové vrstvy řídkého vaziva. Ta obsahuje kolagenní a elastická vlákna a buňky hladkého svalstva. Mezi endokardem a myokardem se nachází vrstva subendokardového vaziva, kterým procházejí cévy, nervy a Purkyňova vlákna převodního systému srdečního (Junqueira et al., 1999).

Myokard

Myokard je nejsilnější složkou srdeční stěny a je tvořen srdeční svalovinou. Buňky srdečního svalu (kardiomyocyty) tvoří složitá spojení, která jsou uspořádána do těsně protkaných svazků, které umožňují vznik charakteristických kontrakčních vln. Kontrakční vlny jsou zajišťovány kontraktilními elementy a buňkami, které generují vzruchy a převádějí elektrické signály vyvolávající srdeční pulz. Buňky myokardu mají příčné pruhování, stejně jako buňky kosterního svalstva, ale obsahují pouze jedno až dvě ve středu umístěná jádra. Kardiomyocyty dále obsahují interkalární disky, což jsou spojovací komplexy mezi jednotlivými buňkami srdečního svalu. Četné mitochondrie zaujímají 40 % i více objemu cytoplazmy, což je odrazem potřeby nepřetržitého aerobního metabolismu. Mastné kyseliny, které jsou hlavním

srdečním zdrojem energie, jsou v srdečních buňkách skladovány jako triacylglyceroly v četných tukových kapénkách (Junqueira et al., 1999).

Myokard komor je výrazně silnější než myokard předsíní a je členěn na tři vrstvy – povrchovou, střední a hlubokou. Myokard předsíní je tenčí, mezi pruhy svaloviny obsahuje více vaziva a je členěn pouze na hlubokou a povrchovou vrstvu. Myokard je připojen k srdečnímu skeletu, který zcela odděluje myokard komor a předsíní. Jediné spojení obstarává atrioventrikulární svazek převodního systému srdečního (Čihák et al., 2004).

Epikard

Epikard je serosní povlak srdeční stěny a tvoří viscerální list perikardu. Směrem k myokardu se nachází subepikardová vrstva z řídkého vaziva, kterou procházejí cévy, nervy a nervová ganglia. K epikardu patří i tuková vrstva, která obaluje srdce (Junqueira et al., 1999).

Další struktury srdeční stěny:

Srdeční skelet

Srdeční skelet je složen z tuhého vaziva se silnými kolagenními vlákny. Slouží jako východisko chlopní a místo začátku a úponu kardiomyocytů (Junqueira et al., 1999).

Chlopně

Chlopně jsou ploché duplikatury endokardu vyztužené ploténkou vaziva (Čihák et al., 2004). Jsou tvořené tuhým fibrózním vazivem a po obou stranách jsou kryty vrstvou endotelu. Jsou upevněny k vazivovým prstencům srdečního skeletu (Junqueira et al., 1999). Nacházejí se mezi předsíněmi a komorami, a také mezi komorami a velkými tepny. Zajišťují směr toku krve, a to propouštěním pouze z předsíní do komor a dále z komor do velkých tepen (Trojan et al., 2003).

Převodní systém srdeční

Jedná se o soubor specializovaných částí myokardu, které vytvářejí vzruchy vedoucí ke kontrakcím myokardu a rozvádějí je srdeční svalovinou. Myokard tedy nepotřebuje ke své rytmické činnosti nervy, ty činnost srdce pouze zrychlují nebo zpomalují. Buňky převodního systému se strukturou příliš neliší od buněk pracovního myokardu.

Převodní systém tvoří tyto části:

- sinusový uzel – základní útvar udávající rytmus srdce, uložený ve stěně pravé předsíně

- atrioventrikulární síňokomorový uzel – uložený v předsíňovém septu
- spoje ze sinového uzlu k atrioventrikulárnímu uzlu a k atrioventrikulárnímu svazku
- atrioventrikulární svazek – kmen, který se v komorovém septu dělí na dvě raménka
- pravé a levé raménko
- Purkyňova vlákna – konečné větvení ramének, která se větví pod endokardem komor a vstupují do kontaktu s buňkami pracovního myokardu, do něhož se zanořují (Čihák et al., 2004).

5.1.1.2 Cévy a nervy srdce

Výživu stěn srdečních obstarávají levá a pravá věnčitá tepna. Obě vystupují ze samého začátku aorty. Probíhají po povrchu srdce v řídkém vazivu a tuku, a to vlnovitě, čímž jsou přizpůsobeny tepovým změnám objemu srdce. Jejich větvení funguje jako konečné. To znamená, že mezi sousedními větvemi nemají významné spojky. Při uzávěru větve koronární tepny je proto příslušný okresek myokardu zbaven zásobení kyslíkem.

Za odvod krve ze srdečních stěn jsou zodpovědné žíly srdce. Dělí se do tří skupin podle vyústění. Hlavní sběrný kmen žilního odtoku představuje široký žilní splav, který ústí do pravé předsíně. Druhou skupinou jsou žíly ústící samostatně do pravé komory a třetí skupinu představují drobné žilky ústící jednotlivě do všech dutin srdce.

Nervy, které k srdci přicházejí, ovlivňují frekvenci a intenzitu srdečních stahů a tím výdej krve podle potřeb organismu. Působí na tkáň převodního systému, na věnčité tepny nebo přímo na myokard. Do srdce vedou vlákna sympatická i parasympatická. Sympatická vlákna obecně působí zrychlení a zintenzivnění srdeční akce a rozšíření věnčitých tepen. Parasympatická vlákna působí zpomalení frekvence srdečních stahů a zúžení věnčitých tepen. Ze srdce vedou i dostředivá vlákna vedoucí podněty ze srdce do vazomotorických a kardiomotorických oblastí v prodloužené míše (Čihák et al., 2004).

5.1.2 Patologická fyziologie srdce

Oběhová soustava umožňuje zásobovat tkáň kyslíkem, živinami, vitamíny, odstraňuje zplodiny látkové přeměny, pomáhá udržovat stálou koncentraci iontů, acidobazickou rovnováhu, teplotu a zajišťuje předávání informací prostřednictvím aktivních látek (Rokyta et al., 2000). Srdce zde funguje jako čerpadlo pro dva paralelně zapojené okruhy. Pumpou

velkého systémového oběhu je levá polovina srdce a pumpou malého plicního oběhu je pravá polovina srdce. Spojení obou čerpadel do jediného orgánu umožňuje jejich dokonalou synchronizaci. Čerpací činnost srdce je založena na rytmickém střídání relaxace a kontrakce svaloviny komor (Trojan et al, 2003). Nemoci vznikající na základě poruch krevního oběhu se nazývají nemocemi kardiovaskulárními (Mačák a Mačáková, 2004).

Kardiovaskulární choroby tvoří svou incidencí, závažností orgánových postižení a důsledky pro zdravotní stav obyvatelstva jeden z nejzásadnějších problémů naší populace. V našem státě se kardiovaskulární onemocnění podílejí na celkové mortalitě více než 54 % a jsou jednou z hlavních příčin kratší střední délky života u nás (Klener et al., 2006).

5.1.2.1 Hyperlipoproteinémie

Hyperlipoproteinémie (HLP) představují skupinu metabolických onemocnění, která jsou charakterizována zvýšenými hladinami lipidů a lipoproteinů v plazmě. Jsou důsledkem zvýšené syntézy nebo sníženého katabolismu částic, které transportují cholesterol a triacylglycerol v plazmě.

Hyperlipoproteinémie lze rozdělit dle klasifikace Evropské společnosti pro aterosklerózu do tří skupin na hypercholesterolémie, smíšené hyperlipidémie a hypertriacylglycerolémie.

Další dělení je možné na základě patogeneze na primární a sekundární. Primárních, tedy geneticky podmíněných HLP je většina. Je ale nutno podotknout, že se na jejich manifestaci může podílet řada faktorů zevního prostředí. Sekundární HLP vznikají na podkladě jiného základního onemocnění, které ovlivňuje lipidový a lipoproteinový metabolismus (např. diabetes mellitus, hypothyreóza, alkoholismus) (Klener et al., 2006).

Hyperlipoproteinémie jsou ale především jedním z nejzávažnějších rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Například autoři Mansego a kol. (2011) prokázali u vybraných pacientů s familiární hypercholesterolémií a familiární kombinovanou hyperlipidémií zvýšený oxidační stres, který se dále podílí na patofyziologii kardiovaskulárních chorob.

Byl také zkoumán přímý vliv HLP na funkci srdce. Autoři Huang a kol. (2004) popsali přímou souvislost mezi hypercholesterolémií vyvolanou potravou a vznikem tzv. cholesterolové kardiomyopatie. Ta je charakterizována oslabenou systolickou i diastolickou srdeční funkcí nezávisle na dění v cévách. Obdobně Liu a kol. (2014) potvrdili zhoršenou systolickou funkci levé komory vlivem hypercholesterolémie navozené potravou.

5.1.2.2 Ateroskleróza a její vztah k poškození srdce

„Ateroskleróza je oficiálně definována jako různorodá kombinace změn arteriální intimy, která vyúsťuje v místní akumulaci lipidů, dalších komponent krve a fibrózní tkáň, provázená současně změnami v medii cévní stěny. Tyto změny jsou výsledkem interakce metabolických a strukturálních vlastností cévní stěny s krevními komponentami a hemodynamickými silami.“ Jde tedy o degenerativní onemocnění probíhající dlouhodobě, u kterého dochází k tuhnutí a ztlustění cévní stěny. Dále vznikají aterosklerotické pláty, které snižují průsvit cévy a brání normálnímu průtoku krve. (Klener et al., 2006)

Je známá celá řada rizikových faktorů aterosklerózy. Mezi neovlivnitelné patří věk, pohlaví (muži jsou postiženi častěji) a genetická predispozice. Mezi ovlivnitelné, tedy získané rizikové faktory se řadí především hypercholesterolemie, arteriální hypertenze, kouření cigaret nebo diabetes mellitus.

Patogeneze aterosklerózy začíná poškozením endotelu a jeho následnou dysfunkcí. Zdravý endotel brání adhezi a aktivaci trombocytů, ovlivňuje kontrakci hladkých cévních svalů, tvoří bariéru pro vstup složek krevní plazmy do cévní stěny, exprimuje specifické adhezivní molekuly pro bílé krvinky nebo vytváří některé cytokiny. Tyto jeho funkce jsou narušeny mechanickým, metabolickým a zánětovým poškozením. Nastává zvýšení permeability pro lipoproteiny přítomné v plazmě a adheze monocytů a trombocytů. Nakupením lipoproteinů (LDL nebo VLDL) v mezibuněčném matrix intimy se začíná tvořit aterosklerotické ložisko. Aterogeneze je zahájena strukturální modifikací lipoproteinů vlivem kyslíkových radikálů. Výsledkem může být tvorba některých cytokinů a adhezních molekul na buňkách endotelu (VCAM-1, ICAM-1, P-selektin). Monocyty také pronikají do intimy, kde se mění na makrofágy, které fagocytují přítomné lipoproteiny (Nečas et al., 2006) a vznikají z nich tzv. pěnové buňky. Současně je spuštěna migrace hladkých svalových buněk z medie do intimy, kde jsou stimulovány k proliferaci. Vychytáváním zoxidovaných lipoproteinů se z nich také stávají pěnové buňky, které tvorbou extracelulárního matrix (kolagen, elastin, proteoglykany), přispívají k tvorbě ateromů. Následkem tvorby plaků je zúžení cévního průsvitu, což může v případě postižení koronárních cév vést k ischemické chorobě srdeční. Dalšími možnými následky jsou kalcifikace cévní stěny nebo tvorba trombů (Silbernagl a Lang, 2001).

5.1.2.3 Ischemická choroba srdeční

Pro ischemickou chorobu srdeční (ICHS) je charakteristický kriticky snížený průtok krve koronárním řečištěm. To má za následek vznik nerovnováhy mezi spotřebou kyslíku

myokardem a jeho dodávkou. Etiopatogeneze může být různá, ale nejčastější příčinou vzniku ICHS bývá aterosklerotický plát věnčitě tepny, popř. s nasedajícím trombem nebo spazmem. Jednotlivé formy můžeme rozdělit na akutní a chronické.

Chronické formy ICHS:

- stabilní angina pectoris – přechodné ischemie myokardu vyvolané fyzickou námahou nebo emoční zátěží s pocitem bolesti či tlaku za hrudní kostí
- němá ischemie myokardu – změny pozorovatelné na EKG bez obvyklých vnějších příznaků
- variantní angina pectoris – způsobená spazmy věnčitých tepen se stenokardiemi při námaze i v klidu

Akutní formy ICHS:

- nestabilní angina pectoris – nově vzniklá nebo zhoršená již existující anginy, častý přechod k infarktu myokardu a vysoké riziko náhlé smrti
- náhlá smrt – příčinou je ze 70 % ICHS
- akutní infarkt myokardu – nekróza části myokardu na podkladě poruchy koronární perfuze (Klener et al., 2006)

Důsledky ischemie v závislosti na délce jejího trvání

Mezi několik desítek sekund trvající hypoxií a 20 až 40 minut trvajícím úplným přerušením přívodu kyslíku, které vede k ireverzibilnímu poškození myokardu, existuje celá řada stavů s různou úrovní závažnosti.

Zajímavostí je, že po krátkodobé expozici hypoxii vzniká určitá forma adaptace, označovaná jako „přivykání“ (preconditioning). Ochranný účinek, který může přetrvávat až 24 hodin, spočívá v udržení dostatečné koncentrace ATP během následující ischemie.

Po přechodné ischemii myokardu může následovat přechodné období tzv. omráčeného myokardu. Přechodná dysfunkce je přičítána porušené homeostáze intracelulárního kalcia nebo reperfuznímu poškození myokardu volnými kyslíkovými radikály. Návrat k normální funkci je nepřímo úměrný trvání ischemie.

Zatímco v časných stádiích ischemie napomáhá reperfuze minimalizovat škody v myokardu, při prolongované ischemii může vést k ischemicko-reperfuznímu poškození.

Poškození je dáno celou řadou dějů, včetně zvýšeného množství reaktivních forem kyslíku (ROS), endotelové dysfunkce nebo aktivace komplementu a zánětvých buněk.

Tzv. hibernující myokard zahrnuje reverzibilní dysfunkci následkem chronické hypoxie. Dochází k periodám s těžkou ischemií a reperfuzí, při kterých dokází ke kumulativnímu poškozování myokardu. Pokud je postižena velká část myokardu, může vyústit v chronické srdeční selhání.

Při prolongované ischemii dochází k ireverzibilním změnám a s prodlužující se dobou ischemie vzrůstá počet postižených buněk v ischemickém ložisku. Při útlumu dýchacího řetězce vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), které poškozují mastné kyseliny membránových fosfolipidů. Rozpad buněčných organel vede k buněčné smrti a nekróza je poté nahrazena vazivem.

Remodelace myokardu může být adaptační nebo patologickou reakcí srdeční tkáně. Nemusí být spojena pouze s infarktem myokardu, způsobit ji může také objemové či tlakové přetížení. Vede k funkční a strukturální přestavbě tkáně, která postihuje kardiomyocyty a vazivové buňky. Dochází ke změně genové exprese a posttranslační modifikaci proteinů, což má za následek hypertrofii kardiomyocytů a proliferaci fibroblastů. Změny množství a funkce kolagenu mohou způsobit poruchy poddajnosti a změny v energetickém metabolismu mohou vést k depleci ATP. Tyto změny mohou vyústit v srdeční selhání (Nečas et al., 2006; Štejfá et al., 2007)

5.1.2.4 Srdeční selhání

Srdeční selhání (srdeční nedostatečnost) označuje neschopnost srdce přečerpávat krev v míře vyžadované aktuální metabolickou aktivitou tkání (Klener et al., 2006). Postihuje převážně levou komoru a nejčastějšími příčinami jsou ischemická choroba srdeční a hypertenze. K srdeční nedostatečnosti však mohou vést téměř všechny kardiální choroby. Rozlišuje se systolická, neboli dopředná nedostatečnost z objemového přetížení, tlakového přetížení nebo z onemocnění myokardu, a diastolická, neboli zpětná nedostatečnost, například při zvýšené tuhosti stěny komory (Silbernagl a Lang, 2001).

5.1.2.5 Kardiomyopatie

Jde o onemocnění myokardu provázená poruchou srdeční funkce.

- Dilatační kardiomyopatie – dilatace srdce s těžkým poškozením systolické i diastolické funkce myokardu komor. Vede k rozvoji srdeční nedostatečnosti.

- Hypertrofická kardiomyopatie – disproporční hypertrofie často postihující mezikomorové septum. Typické je postižení diastolické funkce a obstrukce výtokového traktu levé komory.
- Restriktivní kardiomyopatie - charakteristická je rigidita myokardu, která brání normálnímu diastolickému plnění komor (Klener et al., 2006).

5.1.2.6 Oxidační stres

Aerobní organismy mají antioxidační obranné systémy, které se zabývají reaktivními formami kyslíku (ROS) produkovanými jako důsledek aerobního dýchání a substrátové oxidace. Nízké hladiny ROS jsou nepostradatelné v mnoha biochemických procesech, jako intracelulární signalizace, obrana před mikroorganismy a pro některé buněčné funkce (Fukai et al., 2002). Naopak při nadbytku ROS reagují radikály s lipidy buněčných a subcelulárních membrán, jimiž do buněk nekontrolovatelně vstupuje vápník. Napadají guanin v DNA, fragmentují DNA a mohou vést k mutacím a chromozomovým aberacím. Dále poškozují proteosyntézu, vedou k expresi cytokinů a mohou fragmentovat některé polysacharidy.

Superoxidový anion $O_2^{\cdot-}$ vzniká ve všech buňkách a dále je enzymem superoxiddismutázou převáděn na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je intermediární produkt, který sám reaktivní není. Spouští však expresi a transkripci mnoha různých působků a vzniká z něj vysoce reaktivní hydroxylový radikál $\cdot OH$ (Štejfa et al., 2007). Mezi enzymy, které mohou generovat ROS a zahrnují části mitochondriálního elektronového transportního řetězce, patří xantinoxidáza, monooxygenázy cytochromu p450, lipoxygenázy, NO syntáza a NADPH oxidáza (Kojda a Harrison, 1999; Griendling et al., 2000).

Zvýšení tvorby molekul oxidačního stresu nastává za patofyziologických podmínek, které zahrnují i kardiovaskulární rizikové faktory. Zvýšený oxidační stav je v přítomnosti kardiovaskulárních rizikových faktorů dán jak aktivací prooxidačních mechanismů, tak redukcí těch antioxidačních (Mansego et al., 2011).

Reaktivní formy kyslíku mohou v srdci vznikat mnoha mechanismy včetně oxidativní fosforylace v mitochondriích, jako vedlejší produkt běžného aerobního metabolismu (Davies, 1995). Značný počet studií *in vitro* a na zvířatech prokázal aktivaci ROS u selhávajícího srdce. ROS také mohou hrát důležitou roli při vzniku a progresi ischemické choroby srdeční nebo srdeční hypertrofie (Khatri et al., 2004; Li et al., 2002.). Při ischemii a reperfuzi je oxidační stres jednou z příčin ischemicko-reperfuzního poškození a omráčeného myokardu (Štejfa et al., 2007).

5.2 Vybrané markery protekce endotelu, zánětu a oxidačního stresu

5.2.1 eNOS

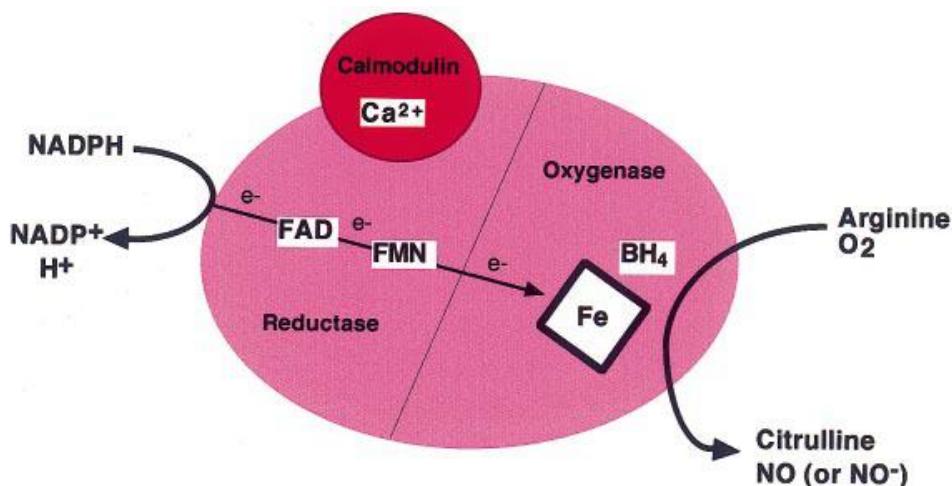
Oxid dusnatý (NO), nejmenší známá signální molekula, je produkován třemi izoformami NO syntázy (NOS). Nazývají se neuronální NO syntáza, indukibilní NO syntáza a endotelová NO syntáza (eNOS). Endotelová NO syntáza je exprimována především v endotelových buňkách a je také jedním ze zdrojů NO v srdci. Je přítomná v cévním endotelu kapilár a venul myokardu a v endokardiální výstelce. Dále byla detekována v hlodavčím myokardu a v lidských atriálních i ventrikulárních kardiomyocytech. Její účinky na srdce však zatím nebyly zcela objasněny (Sarkar et al., 2001; Carnicer et al., 2013).

Struktura a tvorba NO

Endotelová NO syntáza katalyzuje biosyntézu NO reakcí zahrnující přeměnu L-argininu na L-citrulin (Mayer a Hemmens, 1997). Enzym funguje jako dimer složený ze dvou identických monomerů a může být funkčně rozdělen na domény: C-terminální reduktázová doména a N-terminální oxygenázová doména (Hemmens a Mayer, 1998). Mezi těmito oblastmi leží doména vážící kalmodulin (CaM), který hraje klíčovou roli ve struktuře i funkci enzymu (Andrew a Mayer, 1999). L-arginin je využíván jako substrát, molekulární kyslík a redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADPH) jako kosubstráty. Flavinadeninukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN) a tetrahydrobiopterin (BH₄) jsou kofaktory. Funkční NOS přenáší elektrony z NADPH přes FAD a FMN na C-terminální reduktázové doméně na hem v N-terminální oxidázové doméně. Oxygenázová doména také váže nezbytný kofaktor BH₄, molekulární kyslík (O₂) a substrát L-arginin (Alderton et al., 2001). Na straně hemu jsou elektrony využívány k redukci a aktivaci O₂ a k oxidaci L-argininu na L-citrulin a NO (obrázek 1). V prvním kroku eNOS hydroxyluje L-arginin. V druhém kroku je hydroxylovaný L-arginin oxidován na L-citrulin a NO (Stuehr et al., 2001). Vazba kalmodulinu je vyvolána zvýšením intracelulárního Ca²⁺. Zvýšením afinity kalmodulinu k eNOS se usnadní tok elektronů z NADPH v reduktázové doméně k hemu v oxygenázové doméně. I některé další proteiny mohou interagovat a regulovat aktivitu eNOS (např. heat shock protein 90, kalveolin-1) (Förstermann a Sessa, 2012).

Obrázek 1: Reakční schéma tvorby NO

Elektrony jsou dodávány NADPH na reduktázovou doménu a pokračují přes redoxní přenašeče FAD a FMN na oxygenázovou doménu. Tam elektrony interagují s hemovým železem a BH_4 a katalyzují reakci kyslíku s L-argininem za tvorby citrulinu a NO. Tok elektronů přes reduktázovou doménu vyžaduje přítomnost navázaného Ca^{2+} /kalmodulinu. NADPH/NADP⁺ - nikotinamidnukleotidfosfát, Calmodulin – kalmodulin, Ca^{2+} - vápenatý ion, FAD – flavinadenindinukleotid, FMN – flavinmononukleotid, Reductase – reduktázová doména, Oxygenase – oxygenázová doména, BH_4 – tetrahydrobiopterin, Fe – železo, Arginine – arginin, Citrulline – citrulin, O_2 – kyslík, NO – oxid dusnatý.



Zdroj: Alderton et al., 2001 (převzato)

Regulace aktivity eNOS

Endotelová NO syntáza je obecně aktivována zvýšením intracelulárního Ca^{2+} , vstupem extracelulárního Ca^{2+} nebo uvolněním intracelulárních zásob. Aktivace eNOS receptorovou aktivací G-proteinu může být vyvolána hormony, jako katecholaminy nebo vazopresin, lokálními působky, jako bradykinin a histamin, nebo mediátory, jako serotonin a ADP (Boulanger a Vanhoutte, 1997). Mechanickou aktivaci eNOS způsobuje smykové napětí a zvýšená zátěž cévní stěny, také aktivací G-proteinu (Nishida et al., 1992; Ohno et al., 1993). Enzym se nachází v kaveolách cytoplazmatické membrány, v blízkosti molekul, které zprostředkovávají aktivaci. Toto umístění je regulováno posttranslační modifikací N-terminálního řetězce, která je charakteristická pro endotelovou izoformu NOS. Charakteristický obsah lipidů v kaveolách je pro správnou funkci eNOS důležitý. Je možné, že například při hypercholesterolemii může za narušenou aktivitu eNOS změna lipidového prostředí (Andrew a Mayer, 1999).

Funkce eNOS a účinky NO

NO uvolňovaný endotelovými buňkami je hlavním endogenním vazodilatačním systémem a jako protiváha vazokonstrikci způsobené sympatickým nervovým systémem a renin-angiotensinovým systémem. Významná je také zpětná vazba, která zabraňuje periferní vazodilataci způsobené NO. Je na ni využívána velká část uvolněného noradrenalinu. Také blokáda syntézy NO inhibičními analogy L-argininu vede k významné periferní vazokonstrikci (Halbriigge et al., 1991; Förstermann et al., 1994).

Endotelová NO syntáza je homeostatickým regulátorem mnoha nezbytných kardiovaskulárních funkcí. NO dilatuje všechny typy krevních cév stimulací rozpustné guanylátacyklázy a zvyšováním hladiny cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) v hladkých svalových buňkách (Förstermann et al., 1986). NO uvolněný do cévního lumen je silným inhibitorem destičkové agregace a adheze na cévní stěnu. Mimo to předchází uvolňování destičkových růstových faktorů, které stimulují proliferaci hladkých svalových buněk a jejich produkci extracelulárního matrix. NO také může inhibovat adhezi leukocytů na cévní stěnu, která probíhá na počátku rozvoje aterosklerózy (Alheid et al., 1987; Rudic et al., 1998). Porušená integrita vrstvy endotelu může iniciovat prozánětlivé děje. Endotelem produkováný NO zabraňuje apoptóze buněk endotelu vyvolané prozánětlivými cytokiny a proaterosklerotickými faktory zahrnujícími reaktivní formy kyslíku (ROS) a angiotensin II. Oxid dusnatý také zabraňuje formaci fibrózních plaků. Na základě všech těchto účinků se může NO produkováný endotelovými buňkami považovat za antiaterosklerotický základ (Dimmeler a Zeiher, 1999; Förstermann a Sessa, 2012).

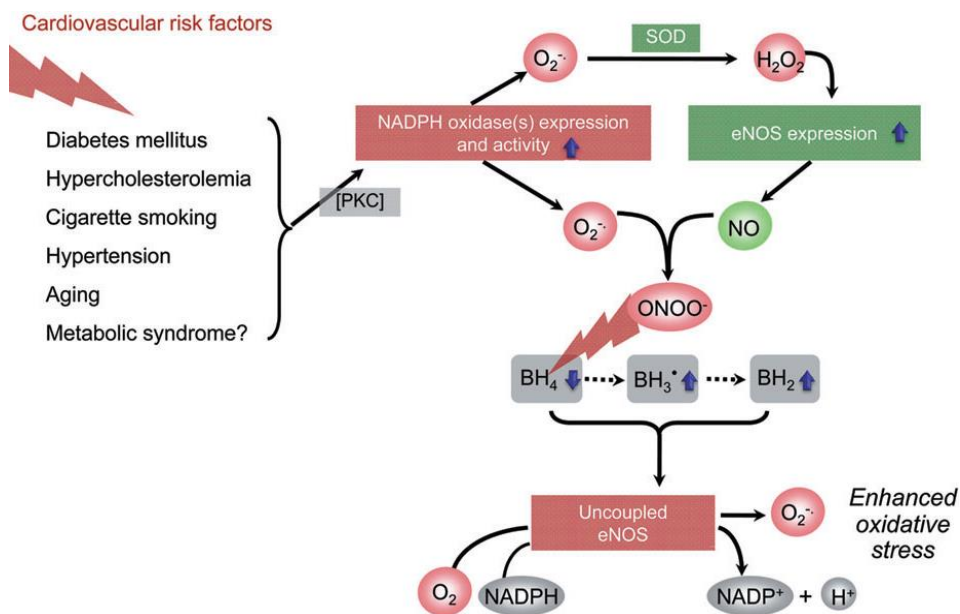
Oxidační stres a NO

V přítomnosti rizikových faktorů (například hypertenze, hypercholesterolemie, diabetes mellitus nebo kouření) nebo při onemocnění s dysfunkcí endotelu se rozvíjí neschopnost endotelu tvořit adekvátní množství bioaktivního NO. Kardiovaskulární rizikové faktory a cévní onemocnění jsou také spojeny se zvýšenou tvorbou ROS. Je několik enzymových systémů, které mohou tvořit ROS v cévní stěně. Zahrnují NADPH oxidázy, xantinoxidázu, enzymy mitochondriálního dýchacího řetězce a tzv. rozpojení eNOS. Bylo prokázáno, že vlivem oxidačního stresu se eNOS mění na enzym vytvářející superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$. Tento děj se nazývá rozpojení eNOS (Mueller et al., 2005; Förstermann a Sessa, 2012). Rozpojení lze popsat jako ztrátu dimeru a vzrůst poměru monomer – dimer nebo změnu kvarterní struktury enzymu (McMillan et al., 2000). Vzniká následkem snížení biodostupnosti BH_4 . Rozpojení se šíří, protože produkováný superoxid oxiduje zbývající BH_4 (Landmesser et al., 2003).

Superoxid může také reagovat s NO za vzniku peroxynitritu ONOO^- (Beckman a Koppenol, 1996). Zvýšená aktivita enzymů, jako např. NADPH oxidáz, podnítl kaskádu radikálů tvorbou superoxidu. Peroxynitrit oxiduje BH_4 na BH_3 , což dále zvyšuje rozpojení eNOS, která produkuje stále více radikálů (obrázek 2). Peroxynitrit také může vést k nevratné nitraci tyrosinových zbytků na dalších molekulách eNOS, což může způsobit špatnou fosforylaci a dysfunkci enzymu (Kuzkaya et al., 2003; Gielis et al, 2011).

Obrázek 2: Mechanismus rozpojení eNOS

Různé rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění aktivují proteinkinázu C (PKC), která zvyšuje expresi a aktivitu NADPH oxidáz. NADPH oxidázy tvoří superoxid, který může být dismutován enzymem superoxiddismutázou na peroxid vodíku, který dále zvyšuje expresi eNOS a tvorbu NO. Rekombinací produktů NO a superoxidu je tvořen peroxynitrit, který může oxidovat kofaktor BH_4 na BH_3 a BH_2 . V důsledku toho je funkční eNOS přeměněna na enzym tvořící superoxid, který se dále podílí na oxidačním stresu. Zvýšená exprese eNOS tedy dle tohoto schématu celou situaci zhoršuje. Cardiovascular risk factors – kardiovaskulární rizikové faktory, Hypercholesterolemia – hypercholesterolémie, Cigarette smoking – kouření cigaret, Hypertension – hypertenze, Aging – stárnutí, Metabolic syndrome – metabolický syndrom, PKC – proteinkináza C, NADPH – nikotinamidnukleotid fosfát, oxidases expression and activity – exprese a aktivita oxidáz, $\text{O}_2^{\cdot-}$ - superoxid, SOD – superoxiddismutáza, H_2O_2 – peroxid vodíku, eNOS expression – exprese endotelové NO syntázy, NO – oxid dusnatý, ONOO^- - peroxynitrit, $\text{BH}_{4,3,2}$ – tetra/tri/dihydrobiopterin, uncoupled – rozpojený, Enhanced oxidative stress – zvýšený oxidační stres.



Zdroj: Förstermann a Li, 2011 (převzato)

5.2.2 peNOS

Fosforylace eNOS, tedy tvorba fosforylované endotelové NO syntázy (peNOS) je jednou z posttranslačních modifikací, která může ovlivňovat regulaci aktivity eNOS (Fulton et al., 2001).

Fosforylace eNOS

Různé extracelulární podněty zahrnující smykové napětí a další stimuly, jako cévní endotelový růstový faktor (VEGF), estrogen, bradykinin, histamin nebo aldosteron, moduluji produkci NO enzymem eNOS různými signálními drahami. Buněčné studie ukázaly, že fosforylace eNOS na specifické aminokyselině reguluje enzymovou produkci NO (Garcia-Cardena et al., 1998; Fulton et al., 2001; Chen et al., 2008). Protein eNOS může být fosforylován na serinových (Ser), threoninových (Thr) a tyrosinových (Tyr) zbytcích (Förstermann a Sessa, 2012). Bylo identifikováno několik míst s potenciálem pro fosforylaci a posttranslační regulace – Ser-1177, Thr-495 a Ser-114, 615 a 633. Bylo dokázáno, že modifikace Ser-1177 a Thr-495 mají klíčový význam. Všeobecně je přijato, že endotelová produkce NO je inhibována fosforylací Thr-495 a indukována fosforylací Ser-1177 (Lin et al., 2003; Michell et al., 2001).

V kultivovaných endotelových buňkách bylo popsáno poprvé u bradykininu, že zvyšuje fosforylaci serinu na eNOS. Bradykininem indukovaná fosforylace eNOS je děj závislý na Ca^{2+} a je inhibován antagonisty kalmodulinu nebo odstraněním extracelulárního Ca^{2+} (Fleming a Busse, 1999). Fosforylace Ser-1177 stimuluje tok elektronů v rámci reduktázové domény, zvyšuje citlivost enzymu na Ca^{2+} a představuje jeden z nezávislých mechanismů aktivace eNOS (McCabe et al., 2000). Estrogen a VEGF fosforylují eNOS především prostřednictvím kinázy Akt (Akt = proteinkináza B), inzulin pravděpodobně aktivuje Akt i adenosinmonofosfátem-aktivovanou proteinkinázu (AMPK), bradykininem vyvolaná fosforylace Ser-1177 je zprostředkována Ca^{2+} /kalmodulinovou proteinkinázou II a smykové napětí vyvolává fosforylaci aktivací proteinkinázy A (Förstermann a Sessa, 2012). Bylo však prokázáno, že kináza Akt je zásadním regulátorem aktivity eNOS v živých organismech (Schleicher et al., 2009).

Thr-459 je negativní regulační místo a jeho fosforylace je spojena se snížením toku elektronů a enzymové aktivity eNOS. Má tendenci být fosforylován bez aktivujícího podnětu proteinkinázou C a interferuje s vazbou kalmodulinu na doménu vážící kalmodulin. Defosforylace Thr-495 je spojena se stimuly, které zvyšují intracelulární koncentraci Ca^{2+}

a zvyšují aktivitu eNOS. Výrazně více se kalmodulin váže na eNOS s defosforylovaným Thr-495. Fosfatázou, která defosforyluje Thr-495 je fosfatáza 1 (Fleming a Busse, 2003).

Oxidační stres a fosforylace eNOS

Při oxidačním stresu je vyčerpán zásadní kofaktor BH_4 a NADPH oxidace je rozpojením eNOS převedena z produkce NO na produkci $O_2^{\cdot-}$. Bylo zjištěno, že za podmínek nedostatku BH_4 vede fosforylace Ser-1177 kinázou Akt k výraznému zvýšení produkce $O_2^{\cdot-}$. Dále fosforylace Ser-1177 výrazně ovlivňuje citlivost enzymu k Ca^{2+} , takže se produkce $O_2^{\cdot-}$ stává ve velké míře nezávislou na koncentraci Ca^{2+} . Fosforylace Ser-1177 je tedy stěžejní pro přímou regulaci tvorby NO a $O_2^{\cdot-}$, jak změnou citlivosti enzymu k Ca^{2+} , tak změnou rychlosti tvorby produktu. Fosforylace kinázou Akt výrazně zvyšuje tvorbu $O_2^{\cdot-}$ enzymem za nízkých koncentrací Ca^{2+} . Na druhé straně, fosforylace eNOS na zbytku Thr-495 proteinkinázou C nemá žádný efekt na maximální aktivitu nebo citlivost na Ca^{2+} . Snižuje však vazbu kalmodulinu a zvyšuje asociaci s kaveolinem. Fosforylací Thr-495 proteinkinázou C nedochází k inhibici tvorby $O_2^{\cdot-}$, ale nepřímo ovlivňuje tento proces regulací interakce s kalmodulinem a kaveolinem. Fosforylace proteinkinázou C tedy mění citlivost enzymu k dalším negativním regulačním signálům (Chen et al., 2008).

Fosforylovaný eNOS v srdci

Změny ve fosforylaci eNOS mohou hrát důležitou roli při určování a regulaci aktivity dysfunkční eNOS při onemocnění srdce. Doposud většina důkazů vychází ze studií cév a přesná role těchto posttranslačních modifikací v kardiomyocytech zůstává stále nejasná (Carnicer et al., 2013). NO a peroxid vodíku (H_2O_2) jsou syntetizovány uvnitř kardiomyocytů a hrají klíčovou úlohu při modulaci kardiovaskulární signalizace. Aktivace eNOS vyvolaná peroxidem vodíku závisí na fosforylaci kinázou Akt a AMP-aktivovanou proteinkinázou a vede k masivní fosforylaci eNOS (Sartoretto et al., 2011). Srdeční produkce peroxidu vodíku může ovlivňovat aktivitu eNOS a inotropii. Nedávné studie prokázaly, že srdce vystavené různému trvání ischemie vykazuje časově závislou redukci hladiny BH_4 , což spouští zvýšenou produkci superoxidu prostřednictvím eNOS. I zde platí, že za podmínek nedostatku kofaktoru BH_4 , fosforylace zprostředkovaná kinázou Akt, která by obvykle zvýšila eNOS produkci NO, dále zvyšuje produkci superoxidu. To značí, že i zde je fosforylace Ser-1177 zásadním regulátorem funkce dimerní i rozpojené eNOS (Chen et al., 2008; Carnicer et al., 2013).

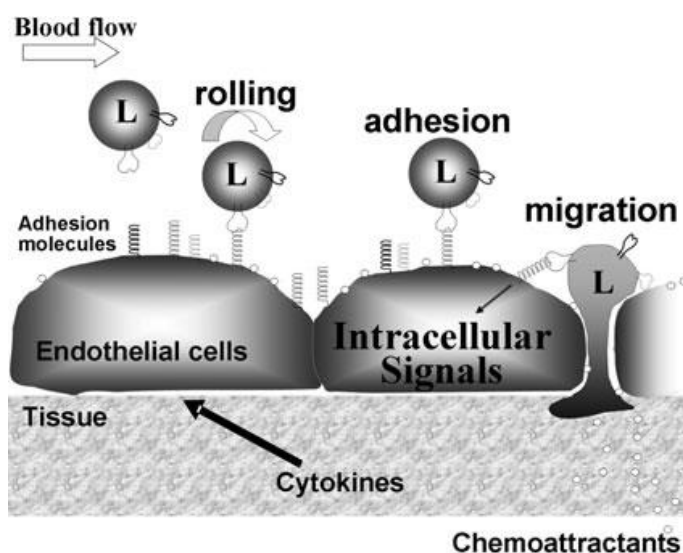
5.2.3 VCAM-1

Adhezní molekuly a endotel

Imunoregulační funkce endotelu spočívá v bránění infiltraci leukocytů inhibicí funkce cévních adhezních molekul, a tím brání zánětu tkáně. Funkce endotelových buněk během infiltrace leukocytů je regulována reaktivními formami kyslíku (ROS) a antioxidanty. V místech zánětu a lymfatických uzlíků je endotel stimulován k expresi adhezních molekul, které zprostředkovávají vazbu leukocytů. Při vazbě leukocytů tyto adhezní molekuly aktivují přenos signálu buňkami endotelu, které pak mění svůj tvar pro otevírání kanálů, kterými poté mohou migrovat leukocyty (obrázek 3). Pokud je stimulace otevření kanálů blokována, je blokován i rozvoj zánětu (Cook-Mills et al., 2011).

Obrázek 3: Migrace leukocytů

Během zánětu vyvolávají cytokiny produkované tkání expresi cévních adhezních molekul. Mimo to, chemoatraktanty uvolněné tkání a endotelovými buňkami zvyšují afinitu adhezních molekul leukocytů a určují směr migrace leukocytů. Tato cévní infiltrace leukocytů je třífázový proces. Zahrnuje tzv. kutálení leukocytu po endotelu následované zadržením leukocytu na endotelu pomocí vysoké afinity a poté migraci leukocytu přes endotel. L – leukocyt, blood flow – proud krve, rolling – kutálení, adhesion – adheze, migration – migrace, adhesion molecules – adhezní molekuly, endothelial cells – endotelové buňky, intracellular signals – intracelulární signály, cytokines – cytokiny, tissue – tkáň, chemoattractants – chemoatraktanty.



Zdroj: Cook-Mills et al., 2011 (převzato)

Struktura VCAM-1

Cévní adhezní molekula 1 (VCAM-1) je členem imunoglobulinové (Ig) nadrodiny proteinů. Je složena ze sedmi extracelulárních domén podobných Ig. Ty zahrnují disulfidové klíčky, samostatnou transmembránovou doménu typu I a C-terminální cytoplazmatickou doménu obsahující 19 aminokyselin (Kumar et al., 1994).

Funkce, exprese a regulace VCAM-1

Exprese VCAM-1 je vyvolána na endotelových buňkách během zánětlivých onemocnění prostřednictvím různých mediátorů zahrnujících ROS. Poté VCAM-1 na endotelu funguje jako „lešení“ k migraci leukocytů a jako spouštěč endotelové signalizace pro tvorbu ROS NADPH-oxidázou. Tyto ROS vyvolávají signály pro otevření mezibuněčných kanálů pro migraci leukocytů. Přenos signálu VCAM-1 a zánět vyvolaný VCAM-1 mohou být blokovány antioxidanty (Cook-Mills et al., 2011).

Expresi VCAM-1 vyvolávají cytokiny produkované tkání, jako tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a interleukin-1b, dále vysoké hladiny ROS nebo oxidované částice LDL. Vyvolání exprese těmito stimuly je zprostředkováno a regulováno transkripčními faktory, jakým je nukleární faktor kappa B (Marui et al., 1993; Lee et al., 2007; Lee et al., 2001).

VCAM-1 může být také uvolňována z povrchu endotelu desintegriny a metaloproteázou 17. Proto je VCAM-1 přítomná v plazmě v rozpustné formě (sVCAM-1) a je používána jako prediktivní biomarker onemocnění. Hladina sVCAM-1 v plazmě stoupá aktivací endotelu u mnohých chorob. Tento sVCAM-1 buď omezuje vazbu leukocytárních integrinů na endotelové VCAM-1 vazbou na leukocyty nebo stimuluje chemotaxi leukocytů (Gearing et al., 1992; Nadali et al., 1994).

VCAM-1 v srdci

Škodlivé účinky TNF- α na fibroblasty může zhoršit srdeční zánět způsobený zvýšenou expresí VCAM-1. Zvýšení exprese VCAM-1 a TNF- α bylo pozorováno v srdečním cévním endotelu u pacientů s chronickým srdečním selháním. Zvýšení exprese adhezních molekul na povrchu srdečních buněk může hrát klíčovou roli v příjmu a infiltraci leukocytů v místech zánětu při zánětlivých srdečních onemocněních. Zvýšená hladina VCAM-1 bývá často nalezena v séru pacientů s neischemickým srdečním selháním. Tato zvýšená hladina koreluje se zánětlivými infiltráty ve tkáni myokardu a s klinickými a hemodynamickými příznaky srdečního selhání. To potvrzuje spojení mezi srdečním selháním a zánětlivými změnami myokardu (Klein et al., 1998). Dále může být zvýšená endokardiální exprese VCAM-1 důležitým

článkem mezi zahájením zánětlivých a protrombogenních mechanismů zodpovědných za tvorbu trombu během remodelace endokardu (Goette et al, 2008).

5.2.4 HO-1

Funkce HO-1

Hemoxygenáza (HO) je enzym, který katalyzuje krok limitující rychlost oxidativní degradace buněčného hemu, který uvolňuje železo, oxid uhelnatý (CO) a biliverdin. V savčím systému byly identifikovány dvě odlišné izoformy HO. V porovnání s HO-2, která je exprimována konstitutivně, je HO-1 protein citlivý na stres, který je vysoce indukován mnohými látkami, jako cytokiny, endotoxiny, těžké kovy, NO a vlastní substrát hem. Kromě rolí v katabolismu hemu a v obratu erytrocytů, má HO-1 také důležité funkce při různých fyziologických a patofyziologických stavech spojených s buněčným stresem. Bylo jednoznačně prokázáno, že indukce HO-1 představuje důležitý obranný mechanismus před dalším oxidativním poškozením tkání a buněk následované různými poruchami. K ochranným funkcím dochází na základě protizánětlivé a antioxidační kapacity CO, biliverdinu a jeho metabolitu bilirubinu. V souladu se závěry základního výzkumu, četné studie potvrdily důležitost HO-1 při různých onemocněních, jako ischemická choroba srdeční, srdeční hypertrofie, diabetes mellitus, ateroskleróza a rakovina (Wang a Chau, 2010).

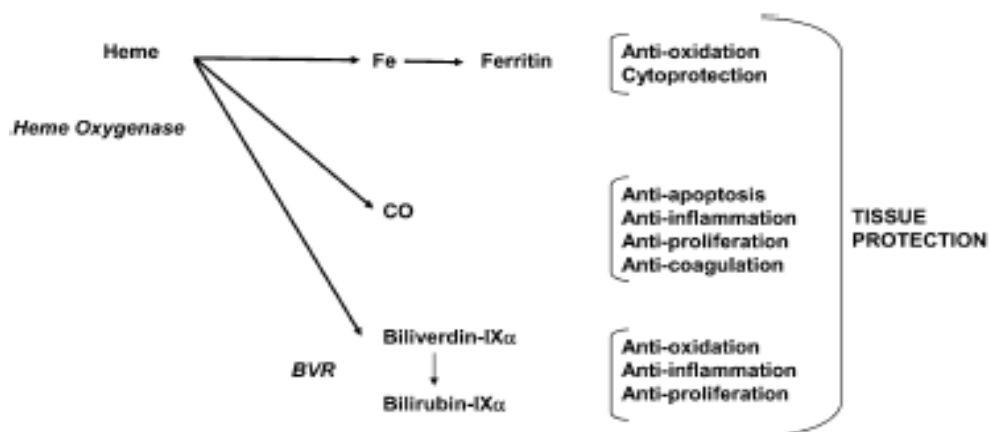
Činnost hemoxygenázy slouží při základních metabolických funkcích jako krok určující rychlost degradace hemu štěpením na α -methenovém můstku uhlíku za vniku CO, biliverdinu-IX α a Fe²⁺ (Tenhunen et al., 1969). Reakce vyžaduje molekulární kyslík a redukční ekvivalenty z NADPH reduktázy cytochromu p450. Biliverdin tvořený reakcí hemoxygenázy je redukován na bilirubin-IX α prostřednictvím NADPH biliverdin reduktázy (Tenhunen et al., 1969; Ryter a Choi, 2009).

Přesný molekulární mechanismus, kterým HO-1 zajišťuje protekci tkání, není dosud kompletně objasněn. Stocker a kol. (1987) navrhli možnost, že antioxidační funkce HO-1 by mohla být přenášena pomocí zvýšené produkce žlučových barviv. Ukázali, že biliverdin a bilirubin, konečné produkty degradace hemu, mohou plnit funkci antioxidantů. Farmakologická aplikace těchto pigmentů může chránit kultivované buňky před oxidačním a nitračním poškozením (Foresti et al., 2004). Antioxidační funkci také poskytuje aktivita HO-1 urychlením odstranění hemu k omezení oxidačního stresu vzniklého na základě mechanismu hem-železo (Ryter a Tyrrell, 2000). Aktuální pohled na protekci zprostředkovanou HO-1 je,

že každý z reakčních produktů HO aktivity (biliverdin, CO, železo) přispívá samostatně nebo v součinnosti k obnově buněčné homeostázy (Ryter et al., 2007).

Obrázek 4: Schéma účinků konečných produktů degradace hemu

Tyto tři koncové produkty aktivity HO mohou přispívat k cytoprotektivním mechanismům. CO je zapojený do protizánětlivých, antiapoptických a antiproliferačních drah. Biliverdin-IX α a bilirubin-IX α , silné antioxidanty, mohou uplatnit protizánětlivé a antiproliferační účinky. Železo uvolněné aktivitou HO stimuluje cytoprotektivní dráhu, která zahrnuje syntézu ferritinu. Heme – hem, Heme Oxygenase – hemoxygenáza, Fe – železo, CO – oxid uhelnatý, BVR – biliverdin reduktáza, anti-oxidation – antioxidační, cytoprotection – cytoprotektivní, anti-apoptosis - antiapoptický, anti-inflammation – protizánětlivý, anti-coagulation – antikoagulační, anti-proliferation – antiproliferační, tissue protection – tkáňová protekce.



Zdroj: Ryter a Choi, 2009 (převzato)

Exprese a regulace HO-1

Ve tkáních, které nejsou přímo zodpovědné za metabolismus hemoglobinu, je bazální exprese HO-1 velmi nízká, ale stimulací může rapidně vzrůst. Zjištění, že široká řada podnětů může indukovat HO-1, značí, že exprese je podrobena regulaci mnoha buněčnými signálními drahami (Maines, 1988). Regulace exprese HO-1 signální dráhou mitogenem aktivovanou proteinkinázou (MAPK) byla rozpoznána jako první, schopná zprostředkovat indukci HO-1 po extracelulárním stimulu (Gong et al., 2003). MAPK patří k evolučně konzervovaným serin/threonin proteinkinázám, které regulují mnohé buněčné funkce jako proliferaci, apoptózu, diferenciaci a odpovědi na okolní stimuly. MAPK jsou složeny ze tří rodin enzymů. Každá rodina se skládá z několika funkčně příbuzných kináz zřetelně spojených s fosforylací

jejich specifických cílů a transkripčních faktorů (Hazzalin a Mahadevan, 2002). Fosfatidylinositol-3-kináza/Akt signální dráha se také podílí na regulaci HO-1 (Geraldes et al., 2008). Může být aktivována mnoha růstovými faktory a cytotoxickými stimuly. Akt také může přímo fosforylovat HO-1 na Ser-188 a modulovat její aktivitu (Salinas et al., 2004). Kromě toho další signální molekuly, jako je proteinkináza C nebo tyrosinkináza, jsou také schopné ovlivňovat expresi HO-1 (Wung et al., 2006).

Ačkoliv dříve bylo za hlavní místo výskytu HO-1 považováno hladké endoplazmatické retikulum, nedávné studie otevřely zajímavou možnost, že HO-1 se může vyskytovat i v jiných subcelulárních oddílech, jako kaveoly plazmatické membrány, mitochondrie a jádro. Jaderná forma HO-1 pravděpodobně působí jako regulátor transkripce. Funkční význam HO-1 v těchto specializovaných oddílech zůstává nejasný. Rané studie však silně naznačují, že by HO-1 v mitochondriích a kaveolách mohla mít důležité biologické a fyziologické funkce (Kim et al., 2004; Slebos et al., 2007; Lin et al., 2007).

Vliv HO-1 na srdce

Nadměrná exprese HO-1 chrání myokard před ischemickým a reperfučním poškozením (Yet et al., 2001). Protizánětlivé účinky CO a antioxidační účinky bilirubinu pravděpodobně zprostředkovávají myokardiální ochranu vyvolanou HO-1. Byla demonstrována i role HO-1 při remodelaci myokardu. Srdeční hypertrofie vyvolaná angiotensinem II může být výrazně potlačena nadměrnou expresí HO-1 a bilirubin zprostředkovává alespoň zčásti antihypertrofický účinek HO-1 pomocí inhibice produkce ROS po stimulaci angiotensinem II (Hu et al., 2004). ROS jsou zapojeny do různých patologických dysfunkcí myokardu, a proto zeslabení produkce ROS díky HO-1 je považováno za potencionální terapeutický přístup u onemocnění myokardu (Wang a Chau, 2010).

5.2.5 SOD-3

Nadměrná produkce a/nebo nedostatečné odstraňování ROS, zvláště superoxidového anionu $O_2^{\bullet-}$, je zapojeno do patogeneze mnoha kardiovaskulárních onemocnění, jako ateroskleróza, hypertenze, diabetes nebo endotelová dysfunkce, díky snížení biologické dostupnosti NO. NO reaguje se superoxidovým anionem $O_2^{\bullet-}$ za extrémně vysoké rychlosti. Tudiž, rovnováha mezi okolními úrovněmi $O_2^{\bullet-}$ a buněčná antioxidační kapacita významně regulují biologickou aktivitu NO (Fukai et al., 2002).

Superoxiddismutáza (SOD) je enzym katalyzující dismutaci superoxidu na peroxid vodíku podle reakce $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Peroxid vodíku poté musí být odstraněn enzymy

katalázou nebo glutathionperoxidázou (Young a Woodside, 2001). Všechny savčí tkáň obsahují tři formy superoxiddismutázy, které se liší lokalizací. Cu/ZnSOD (SOD-1) se nachází v cytosolu, MnSOD (SOD-2) v mitochondriích a extracelulární SOD (SOD-3) se vyskytuje v extracelulárním prostoru. Aktivita SOD-3 je desetinásobně vyšší v cévní stěně než v ostatních tkáních, kde působí SOD-1 a SOD-2. Proto v cévní stěně hraje SOD-3 zásadní roli v regulaci redoxních podmínek a biologické dostupnosti endotelového NO (Stralin et al., 1995; Fukai et al., 2002).

Struktura enzymu SOD-3

Sekreční extracelulární SOD (SOD-3) je tetramer složený ze dvou dimerů spojených disulfidovým můstkem (Oury et al., 1996a). Každá podjednotka je složena z N-terminálního signálního peptidu, který umožňuje exkreci z buňky. Dále se skládá z aktivní domény, která váže měď a zinek, a z C-terminální oblasti, která je zahrnuta do vazby na sulfatovaný proteoglykan (heparan sulfát). V organismu se vyskytuje cirkulující a vázaná forma, která převažuje z 99 % (Karlsson a Marklund, 1987). Sekvence domény vážící heparan sulfát je přítomna pouze ve vázané formě plné délky. Proteolýzou zkrácený cirkulující typ nemá k vazbě na něj žádnou afinitu (Oury et al., 1996a).

Exprese a regulace tvorby SOD-3

SOD-3 je přítomna na povrchu mnoha buněk. Převládající místo produkce SOD-3 jsou hladké svalové buňky zdravých cév. Studie nasvědčují, že endotelové buňky SOD-3 neprodukují (Stralin et al., 1995; Marklund, 1990). Váže se však na heparin na povrchu endotelových buněk a může být do nich začleněn. Proto tento silný antioxidantní enzym může být vytvořen v cévních hladkosvalových buňkách a skončit v přilehlých buňkách endotelu (Ohta et al., 1994; Fukai et al., 2002).

Určení lidského genu pro SOD-3 odhalilo několik potencionálních regulačních míst. Tento gen zahrnuje elementy citlivé na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), aktivační protein 1, glukokortikoidy, xenobiotika nebo antioxidanty. Přítomnost těchto regulačních prvků naznačuje, že exprese SOD-3 může být výrazně regulována mnoha stimuly (Folz a Crapo, 1994). Je potvrzeno, že endotelový NO moduluje expresi SOD-3 v organismu. Imunohistochemické studie ukázaly, že SOD-3 se vyskytuje ve vysokých koncentracích mezi endotelem a hladkými svaly, kde endotelem produkovaný NO musí přecházet k hladkým svalům, aby stimuloval jejich relaxaci. SOD-3 tedy hraje podstatnou roli v protekci NO před $O_2^{\bullet -}$ v extracelulárním prostoru. Dá se předpokládat, že podmínky spojené s dlouhodobým úbytkem NO mohou vést ke snížení

exprese SOD-3 s nepříznivým dopadem na cévní redoxní podmínky (Oury et al., 1996b; Fukai et al., 1998; Fukai et al., 2002).

Vliv SOD-3 na srdce

Významným objevem Brahmajothiho a Campbella (1999) je související exprese izoformem eNOS a SOD-3 napříč stěnou levé srdeční komory. Bylo demonstrováno, že exprese eNOS a SOD-3 je výrazně heterogenní mezi vnějškem a vnitřkem myocytů levé komory a je specificky lokalizována do sarkolemy (plazmatická membrána svalových buněk). To silně naznačuje funkční korelaci mezi aktivitami endogenních myocytárních eNOS a SOD-3 v regulaci extracelulárních a/nebo membránových NO^*/O_2^* interakcí (Campbell et al., 1996).

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) hrají důležité role v patogenezi ischemicko-reperfuzního poškození. Endogenní antioxidanty, jako SOD-3, jsou významné při ochranné funkci před ischemickou reperfuzí. Různými přístupy byla prokázána redukce ischemicko-reperfuzního poškození díky SOD-3. Bylo demonstrováno, že má příznivé účinky na zachování srdeční funkce a omezuje rozsah infarktu myokardu po ischemické reperfuzi (Dhalla et al., 2000; Sjoquist a Marklund, 1992; Fukai et al., 2002).

5.2.6 Kataláza

Kataláza (CAT) je antioxidační enzym, který generuje molekulární kyslík jako vedlejší produkt disproportionace peroxidu vodíku.

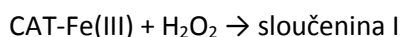
Struktura katalázy

Aktivita enzymu je závislá na strukturní konformaci tří nezbytných domén: skupina hemu v aktivním místě, doména vážící redukovaný NADPH a komplex sekundární struktury formovaný řetězením a proplétáním dlouhých peptidových klíčků v průběhu tetramerizace. Aktivní kataláza je homotetramer a jeho samostatné monomery nemají peroxid degradační aktivitu.

Funkce a lokalizace katalázy

Kataláza je známá především pro svoji jednoduchou schopnost přeměňovat peroxid vodíku na vodu a kyslík (katalytická aktivita) a dále pro aktivitu oxidace alkoholů o nízké molekulární hmotnosti v přítomnosti nízkých koncentrací peroxidu vodíku (peroxidační aktivita). Kataláza je jedním z nejlépe popsaných antioxidačních enzymů a patří do rodiny proteinů obsahujících Fe-protoporfyrin IX, která zahrnuje celou řadu cytochromů, globinů a peroxidáz. Přeměna peroxidu vodíku na vodu a kyslík pomocí katalázy je dvoustupňový

proces, při němž katalázový hem Fe^{3+} redukuje jednu molekulu peroxidu vodíku na vodu při současné tvorbě meziproduktů oxoferrylu Fe^{4+}O a kationického radikálu porfyrinu. Tyto meziprodukty jsou označovány jako sloučenina I. Poté je oxidována druhá molekula peroxidu vodíku za vzniku molekulárního kyslíku a další molekuly vody, viz níže (Jamieson et al., 1986; Zamocky et al., 2008; Kirkman a Gaetani, 2007; Heck et al., 2010).



Rychlostní konstanta pro katalázové reakce je extrémně vysoká, což znamená, že je prakticky nemožné enzym v organismu saturovat. Kataláza je z velké části lokalizována uvnitř buněk v peroxisomech, které rovněž obsahují většinu enzymů schopných generovat peroxid vodíku. Nejvyšší aktivita je přítomna v játrech a erytrocytech, ale je možné ji nalézt ve všech tkáních (Young a Woodside, 2001).

Vliv katalázy na srdce

Ischemická reperfuze může mít za následek kontraktální dysfunkci, arytmie, ztrátu adrenergických drah, změny v genové expresi nebo apoptickou i nekrotickou buněčnou smrt. Endogenní antioxidanty, jako kataláza, předcházejí takovýmto změnám. Ačkoliv se uvádělo, že aktivita katalázy v myokardu je nízká, mnoho dřívějších studií objasnilo její podstatnou roli při ochraně srdce před ischemickou reperfuzí (Dhalla et al., 2000).

5.3 Endoglin

Endoglin (CD105, TGF- β receptor III, ENG) je homodimerní transmembránový glykoprotein, který reguluje signální dráhy TGF- β (transformující růstový faktor beta) (Ma et al., 2000). TGF- β je multifunkční růstový faktor, který reguluje proliferaci, diferenciaci, migraci, produkci extracelulárního matrix a přežití různých druhů buněk (Oklu et al., 2010).

Endoglin je dimer složený z podjednotek spojených disulfidovým můstkem. Jeho primární struktura se skládá z rozsáhlé extracelulární domény, jednotné transmembránové oblasti a krátké cytosolické domény (Gougos a Letarte, 1990). Solubilní forma endoglinu (sEng) je odštěpená extracelulární doména, uvolněná do systémové cirkulace (Venkatesha et al., 2006).

Byly identifikovány dvě izoformy endoglinu, kratší S-izoforma a převažující L-izoforma, které se liší sekvencí jejich cytosolických domén. Obě izoformy jsou schopné vázat ligand, ale liší se mírou fosforylace a schopností regulovat určité odezvy TGF- β (Lastres et al., 1996). Obecně má L-izoforma proangiogenní a S-izoforma antiangiogenní účinky. Také, na rozdíl od

L-izoformy, snižuje S-izoforma expresi eNOS (Blanco et al., 2008). Výsledky studií naznačují, že membránově vázaný S-endoglin a sEng se podílejí na různých patologických stavech a mají opačné role vzhledem k membránově vázanému L-endoglinu (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2010).

Endoglin je exprimován především buňkami nacházejícími se v cévní stěně, jako endotelové buňky, monocyty, makrofágy a také různé mezenchymální buňky, včetně fibroblastů a cévních hladkých svalových buněk (Conley et al., 2000).

Bylo demonstrováno, že endoglin hraje roli v řadě metabolických a kardiovaskulárních onemocnění, jako preeklampsie (De Vivo et al., 2008), hypertenze nebo diabetes mellitus (Blazquez-Medela et al., 2010). Je zřejmé, že endoglin má klíčové funkce při vaskulárním vývoji i onemocnění (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2010).

5.3.1 Tkáňový endoglin

Membránově vázaný endoglin je koreceptorem se silnou vazebnou afinitou k izoformám TGF- β 1 a TGF- β 3 (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2010). TGF- β 1 je silný cytokin, který určuje vývoj hypertrofie kardiomyocytů a srdeční fibrózy při srdečním selhání (Kapur et al., 2012). Endoglin, jako koreceptor, může modifikovat syntézu kolagenu pomocí regulačních drah TGF- β 1 (Benjamin, 2012). TGF- β 1 tvoří signalizační receptorový komplex s typem I (označovaným jako aktivin receptor-like kinázy) a II transmembránových serin/threonin kinázových receptorů (Blanco et al., 2005). Aktivace těchto receptorů vede k aktivaci intracelulárních přenašečů signálu, nazývaných proteiny Smad (Feinberg a Jain, 2005). Konkrétně fosforylace Smad-2/3 podporuje syntézu kolagenu typu I a fibrózu (Leask, 2007).

V srdeční tkáni je endoglin exprimován endokardem a fibroblasty, s minimální expresí kardiomyocyty (Bernabeu et al., 2007). Exprese endoglinu se zvyšuje u lidského selhávajícího srdce, stejně jako u myšího srdce se srdečním selháním vyvolaným tlakovým přetížením (Benjamin, 2012). Endoglin je také nadměrně exprimován po ischemii a reperfuzi srdce (van Laake et al., 2006). Dále moduluje profibrogenní aktivitu angiotensinu II (Chen et al., 2004), který vyvolává zvýšenou expresi TGF- β 1, což vede k přeměně fibroblastů na myofibroblasty a generuje proteiny extracelulárního matrix, jako kolagen typu I (Massague, 1998). Nadměrná depozita kolagenu zvyšují mechanickou tuhost levé komory, zhoršují kontraktilitu myocytů, narušují elektrické spojení a zhoršují tkáňovou hypoxii (Berk et al., 2007). Tím podporují srdeční selhání (Kapur et al., 2012).

Navržené terapie srdečního selhání neselektivním blokováním aktivity TGF- β 1 se nepodařilo prokázat jako jednoznačně výhodné. Byla ale demonstrována důležitá funkční

role endoglinu u srdečního selhání specifickým důkazem, že endoglin podporuje srdeční fibrózu zprostředkovanou TGF- β 1. Dále se ukázalo, že snížená exprese endoglinu může omezit srdeční fibrózu, zachovat srdeční funkci a zvýšit přežití u srdečního selhání. Tyto poznatky dokládají, že endoglin poskytuje potenciálně jedinečný a nový terapeutický přístup pro jedince trpící srdečním selháním (Kapur et al., 2012).

Endoglin je však vysoce exprimován především cévním endotelem, kde moduluje účinky TGF- β nadrodiny proteinů na cévní homeostázu, angiogenezi, remodelaci a patologii (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2010).

5.3.2 Solubilní endoglin

Solubilní endoglin (sEng) se nachází v plazmě zdravých lidí, stejně jako u pacientů trpících různými chorobami. Solubilní forma endoglinu je známá jako extracelulární doména membránového endoglinu, vstupující do systémové cirkulace za různých podmínek vztahujících se k poškození endotelu, jako aktivace endotelu, zánět nebo stárnutí (Venkatesha et al., 2006).

Solubilní endoglin je N-terminální štěpný produkt, odštěpený nejčastěji membránovým typem matrix metaloproteinázy 14 (MMP-14), která je nejhojněji exprimovanou metaloproteinázou v endotelových buňkách (Hawinkels et al., 2010).

Bylo dokázáno, že sEng interaguje s TGF- β jako přirozený antagonist (Li et al., 2000). Dále kompetuje s TGF- β 1 o vazbu na receptory a interferuje s následnou signální dráhou a oslabuje aktivaci eNOS v endotelových buňkách (Venkatesha et al., 2006). To směřuje k předpokladu, že inhibice nebo blokování aktivity eNOS by mohlo zásadně souviset s možnými účinky sEng v cévním endotelu. Oslabení funkce eNOS je spojeno se zvýšenou expresí buněčných adhezivních molekul, zvýšenou cévní permeabilitou, antiangiogenními účinky, změnou vazodilatačních vlastností cév, rozvojem endotelové dysfunkce, arteriální hypertenzí a aterosklerózou (Förstermann a Sessa, 2012; Rathouská et al., 2015).

Hypercholesterolémie je jedním z nejvíce studovaných rizikových faktorů vedoucích k endotelové dysfunkci a ateroskleróze. Solubilní endoglin je kvalifikován jako marker zvyšující se s vysokou hladinou cholesterolu u pacientů s hypercholesterolémií (Bláha et al., 2008). Kromě hypercholesterolémie mohou mít vliv na hladinu sEng i jiné kardiovaskulární rizikové faktory. Po vyvolání oxidačního stresu peroxidem vodíku byla také detekována zvýšená hladina sEng (Ikemoto et al., 2012; Rathouská et al., 2015).

Zvýšení hladin sEng také souvisí s morfologií aterosklerotického plátu a koreluje s nestabilní anginou pectoris, akutním infarktem myokardu a poinfarktovou srdeční remodelací (Cui et al., 2008). V souvislosti s infarktem myokardu spekulovali autoři Cruz-Gonzales a kol. (2008), zda mohou hladiny sEng reflektovat expresi membránového endoglinu v srdci. Demonstrovali, že snížení hladiny sEng u pacientů se špatnou prognózou může být spojeno se sníženou expresí membránového endoglinu, což naznačuje vyvážený poměr mezi membránovou a solubilní formou. Kromě toho se ukázalo, že hladiny sEng u pacientů s akutním infarktem myokardu jsou nižší v porovnání se zdravými jedinci, což naznačuje, že snížené hladiny sEng mohou odrážet zhoršenou funkci endotelu. Závěrem uvedení autoři předpokládali, že předčasný pokles hladiny sEng může být prognostickým znakem úmrtí z kardiovaskulárních příčin (Cruz-Gonzales et al., 2008; Rathouská et al., 2015).

U srdečního selhání byly zjištěny značně zvýšené hladiny cirkulujícího sEng u pacientů s podezřením na dysfunkci levé komory a korelovaly s prediktory mortality na srdeční selhání, jako zvýšený koncový diastolický tlak levé komory, snížená ejekční frakce levé komory a celkové zhoršení symptomů dle NYHA (New York Heart Association) (Kapur et al., 2010). K proteolytickému odštěpení sEng z membránového endoglinu může dojít lokálně v srdeční tkáni nebo systémově, protože hladina matrix metaloproteinázy 14 je při srdečním selhání zvýšena (Peterson et al., 2000). Tato zjištění také představují důležitý paradox biologie endoglinu. Exprese membránově vázaného endoglinu je zvýšena při srdečním selhání a koreluje s přímým zvýšením cirkulujícího sEng. Ačkoliv membránový Eng podporuje nežádoucí remodelaci srdce poháněním srdeční fibrózy, sEng může sloužit jako negativní zpětná vazba omezením signalizace TGF- β 1/endoglin. V porovnání s funkční rolí tkáňového endoglinu v podpoře signalizace TGF- β 1 tedy solubilní endoglin omezuje signalizaci TGF- β 1, syntézu kolagenu typu I a nakonec srdeční fibrózu. Přesný funkční význam sEng zbývá ještě ověřit, ale zdá se, že slouží jako potenciálně důležitý marker srdečního selhání a účastní se srdeční remodelace spojené se srdečním selháním (Kapur et al., 2012; Kapur et al., 2013).

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Použitá zvířata

V tomto experimentu byl použit transgenní myší model kmene CBAxC57BL/6J exprimující lidský solubilní endoglin. Byl vytvořen Univerzitou v Salamance ve Španělsku (Genetically Modified Organisms Generation Unit), jak popsali Valbuena-Diez a kol. (2012). Šest měsíců staré samice vykazující vysoké hladiny lidského sEng byly krmeny dietou pro hlodavce obsahující 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku (Research Diets, Inc., NJ, USA) po dobu 3 měsíců (skupina Sol-Eng+). Stejně staré sourozenecké samice s nízkými plazmatickými hladinami sEng byly použity jako kontrolní skupina. Skupina Sol-Eng⁺ obsahovala 5 jedinců, kontrolní skupina obsahovala 6 jedinců.

Zvířata byla chována za konstantní teploty a vlhkosti, měla volný přístup k pitné vodě a byl dodržován 12-ti hodinový světelný cyklus. Žádné rozdíly hmotnosti mezi experimentálními skupinami nebyly zaznamenány.

Myši Sol-Eng⁺ mající v krvi vysoké hladiny solubilního endoglinu vykazovaly fenotyp podobný preeklampsii, což zahrnovalo hypertenzi, malou velikost mláďat, proteinurii a renální poškození (Valbuena-Diez et al., 2012).

Tato studie na zvířatech splnila všechna uznávaná kritéria pro péči a experimentální použití laboratorních zvířat. Všechny experimenty byly prováděny v souladu se směrnicí Evropské unie č. 86/609/EEC a všechny protokoly byly schváleny Etickou komisí na ochranu zvířat proti krutosti Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Bioetickou komisí Univerzity v Salamance. Všechny chirurgické procedury byly prováděny pod anestezií (ketamin/xylazin) a bylo vyvinuto veškeré úsilí, aby se minimalizovalo utrpení zvířat.

6.2 ELISA analýza hladin solubilního endoglinu

Pro zjištění hladin lidského a myšího solubilního endoglinu v plazmě experimentálních zvířat byla použita imunoanalytická metoda, tzv. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Krev byla extrahována ze špičky ocasu a koncentrace sEng v plazmě byla stanovena prostřednictvím Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA) dle pokynů výrobce.

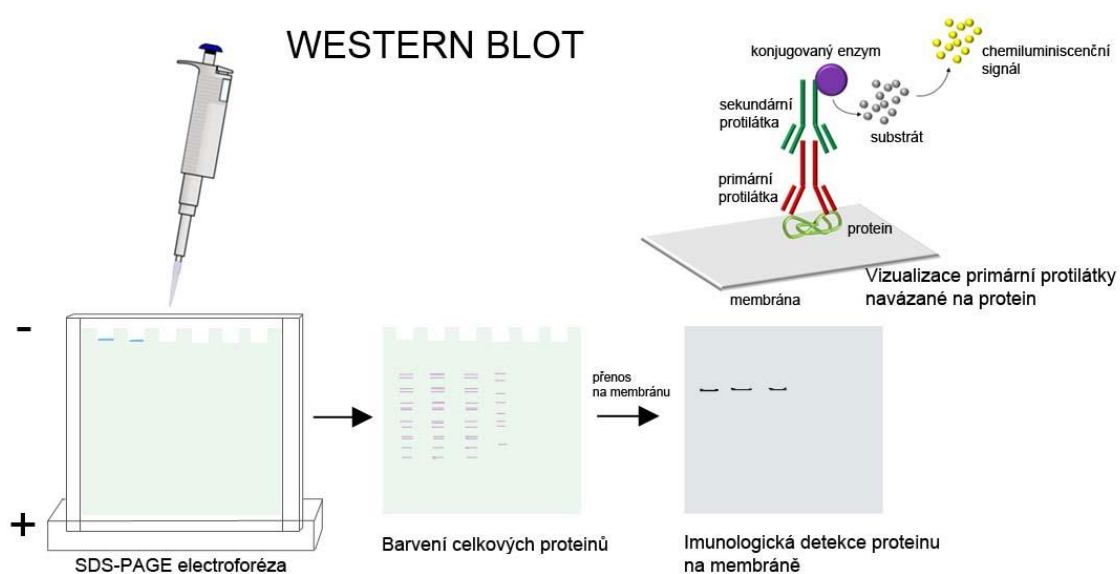
6.3 Biochemická analýza

U obou skupin myší byly měřeny hladiny celkového cholesterolu v krvi. Byly měřeny enzymaticky pomocí běžných enzymatických diagnostických souprav (Lachema, Česká republika) a spektrofotometrickou analýzou (510 nm, ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Švédsko).

6.4 Pracovní postup pro Western blot analýzu

Western blot je důležitá imunoanalytická metoda používaná pro detekci určitého proteinu ve vzorku. Je tvořena třemi základními kroky: elektroforetickou separací proteinů v gelu, přenosem separovaných proteinů na membránu a detekcí proteinů. Pro separaci proteinů byla využita gelová elektroforéza SDS-PAGE (sodiumdodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis). Vlivem SDS jsou proteiny denaturovány a získávají náboj, díky kterému cestují v elektrickém poli. Při elektroforéze jsou proteiny rozděleny dle své hmotnosti udávané v kDa. Separované proteiny jsou následně přeneseny na membránu, kde se zablokují nespecifická vazebná místa. Přítomnost daného proteinu je na membráně detekována nanesením specifické primární protilátky. Ta se naváže na protein a v dalším kroku je rozpoznávána sekundární protilátkou, která se naváže na protilátku primární. Sekundární protilátka je poté detekována chemiluminiscenčně díky značení křenovou peroxidázou, která katalyzuje reakci s chemiluminiscenčním činidlem za vzniku luminiscence.

Obrázek 5: Princip metody Western blot



Zdroj: < <http://labguide.cz/metody/western-blot/> > [cit. 2016-08-06]

6.4.1 Příprava vzorků

Pro přípravu analyzovaných vzorků byla použita myší srdce. Odebraná a zvážená tkáň byla zhomogenizována v lyzačním pufru RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay buffer) s přidavkem inhibitorů proteáz a fosfatáz, které zabraňují proteolýze vzorku vlastními enzymy. Tkáň byla homogenizována nejprve stříháním a poté elektrickým rotor-stator homogenizátorem. Homogenizáty byly umístěny do chlazené centrifugy (4°C) na dobu 10 min a nakonec jsme odebrali vzniklý supernatant a přenesli ho do zkumavky.

6.4.2 Určení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů je potřebné pro přípravu vzorků i samotnou gelovou elektroforézu. Pro stanovení byla použita BCA (bicinchonic acid) metoda. Tato metoda je založená na reakci proteinů přítomných ve vzorcích s detekčním činidlem, které reaguje s peptidovou vazbou proteinů. Výsledkem reakce je vznik barevného produktu, jehož množství bylo určeno spektrofotometricky. Totožným způsobem byla provedena reakce s ředící řadou roztoků bovinního sérového albuminu (BSA) o známých koncentracích. Koncentrace proteinů našich vzorků poté byly určeny z kalibrační křivky sestavené z hodnot absorbancí vzorků BSA. Na základě těchto výsledků jsme naředili všechny vzorky vodou do stejného objemu se shodnou koncentrací proteinů.

6.4.3 Gelová elektroforéza

Příprava gelů

Pro separaci proteinů se využívá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Polyakrylamid je polymer akrylamidových jednotek zesíťovaný bisakrylamidem. Tato směs polymerizuje při pokojové teplotě pomocí volných radikálů, které dodává peroxodisíran amonný (APS). K urychlení polymerizace se používá tetramethyldiamin (TEMED), který katalyzuje tvorbu volných radikálů APS. Dodecylsírán sodný (SDS) slouží jako denaturační činidlo a poskytuje proteinům záporný náboj. Využívá se kombinace zaostřovacího a separačního gelu.

Výběrem vhodné koncentrace separačního gelu lze optimalizovat separaci proteinů určité velikosti. Se zvyšující se koncentrací gelu se póry stávají menšími a gel se hodí pro separaci menších molekul. Byly použity separační gely o koncentraci 8 %, 10 % a 12 % se složením uvedeným v tabulce 1. Připraveným separačním gelem se plní prostor mezi skly

v připravené aparatuře pro elektroforézu zhruba 1,5 cm pod okraj kratšího skla. Gel se překryje vrstvou isobutanolu, aby se zabránilo přístupu vzduchu, a nechá se asi 60 minut polymerizovat. Po ztuhnutí gelu se vylíje isobutanol a gel se opláchne destilovanou vodou. Na separační gel se nanese vrstva zaostřovacího gelu až po okraj skla. Do zaostřovacího gelu se vloží hřeben, který v gelu vytvoří jamky pro nanášení vzorků. Gel se nechá polymerizovat přibližně další hodinu, poté se hřeben vyjme.

Tabulka 1: Složení gelů pro elektroforézu

Uvedená množství jsou vždy pro přípravu dvou gelů.

SDS – dodecylsírán sodný, APS - peroxodisírán amonný, TEMED – tetramethyldiamin.

	Separační gel			Zaostřovací gel
	8 % (ml)	10 % (ml)	12 % (ml)	5 % (ml)
Milli-Q voda	10,8	9,8	8,8	6,15
Pufř pro separační gel	5	5	5	-
Pufř pro zaostřovací gel	-	-	-	2,5
Akrylamid	4	5	6	1,25
10% SDS	0,2	0,2	0,2	0,1
10% APS	0,06	0,06	0,06	0,03
TEMED	0,03	0,03	0,03	0,015

Úprava vzorků

Aby bylo možné porovnat expresi proteinů mezi různými vzorky, je nutné analyzovat vzorky obsahující stejné množství proteinů. Z naředěných vzorků o stejné koncentraci bylo odebráno 7 μ l, které byly smíchány se 7 μ l nanášecího pufřu. Ten obsahuje SDS, který denaturuje proteiny a obaluje je záporným nábojem, a denaturační činidlo merkaptoethanol, které redukuje disulfidické vazby v proteinech. Pro úspěšnou separaci je nezbytné, aby zůstala zachována pouze primární struktura proteinu. Pro kompletní denaturaci byly vzorky na závěr ještě 5 minut zahřívány v termobloku na 95°C.

Aplikace vzorků a elektroforéza

Po vyjmutí hřebenu jsme jamky promyli elektroforetickým pufrům a skla s gely vložili do elektroforetické vany. Vzniklé komory mezi skly se naplnily pufrům, aby jamky byly pod hladinou. Do první jamky se nanáší jako standard hmotnostní marker (směs proteinů o známé molekulové hmotnosti). Do dalších jamek jsme nanášeli připravené vzorky o objemu 10 μ l. Poté jsme do vany doplnili elektroforetický pufr a zahájili elektroforézu při konstantním napětí 200 V a maximálním proudu 15mA/gel po dobu 75 minut. K zajištění nízké teploty v průběhu elektroforézy se vana obložila ledovými destičkami. Rychlost pohybu záporně nabitých proteinů elektrickým polem závisí na velikosti molekul.

6.4.4 Blotování

Blotování je proces, při kterém jsou působením elektrického proudu proteiny přeneseny z gelu na membránu. Použili jsme polyvinyliden difluoridové membrány (PVDF), které mají nespecifické protein-vazebné schopnosti. Pro přenos proteinů je možné pro blotování využít dvě různé metody, polosuchou nebo mokrou cestu. Pro přenos menších proteinů jsme využívali polosuchou cestu a pro větší proteiny cestu mokrou.

V obou případech je nutné si aktivovat membrány ponořením nejprve na 15 sekund do methanolu a následovně na 2 minuty do destilované vody.

Skla s gely jsme vyjmuli z elektroforetické aparatury. Po oddělení skel jsme odřezali okraje a zaostřovací gel. Separační gel jsme poté promyli v transferovém pufru a přenesli.

Polosuchá cesta

Pro tuto metodu jsme využívali blotovací přístroj Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Přístroj se skládá z anody a katody, mezi kterými dojde pomocí elektrického pole k přenosu proteinů.

Na anodu jsme položili silné filtrační papíry namočené v transferovém pufru. Na tyto filtrační papíry se umístily aktivované PVDF membrány, na které byly přímo položeny vyjmuté gely. Vše se překryje dalším silným filtračním papírem namočeným v transferovém pufru, čímž vzniká tzv. sandwich. Nakonec jsme přiklopili katodu a přístroj uzavřeli víkem. Blotování 4 gelů jsme prováděli za konstantního napětí 25 V a proudu 200 mA/4 gely po dobu 75 minut. Po uplynutí stanovené doby transferu jsme membrány vyjmuli a vložili k promytí do destilované vody.

Mokr  cestu

Pro blotování mokr  cestou jsme vyu ivali p řstroj Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), kter  se skládá z desti kov  katody a anody, kazety s pěnovými podložkami, chladící jednotky a vany.

Do kazety jsme vložili pěnovou podložku namočenou v transferov m pufru, na kterou jsme položili namo en  siln  filtrační papír, na něj gel, dále aktivovanou membránu, namo en  siln  filtrační papír a druhou pěnovou podložku. Kazetu jsme uzav řeli a vložili mezi katodu a anodu ve van . Na z v ř jsme p řidali chladící jednotku. Vanu jsme poté naplnili pufrem a uzav řeli v kem. Transfer probíhal za konstantního napětí 130 V, proudu 300 mA po dobu 90 minut. Po ukon en  transferu jsme, stejn  jako u polosuch  cesty, vyjmuli membrány z p řstroje a vložili je k promyt  do destilovan  vody.

6.4.5 Imunodetekce

Během imunodetekce dochází k navázání primární protilátky na stanovovan  protein. Na primární látku se naváže sekundární protilátka, tj. protilátka proti primární protilátce. Sekundární protilátky jsou konjugovan  s enzymem, schopn m po p řid n  substrátu katalyzovat reakci, při které vzniká luminiscence.

Membrány s p nesen mi proteiny jsme nejprve nast řihali na proužky podle molekulových hmotností stanovovaných proteinů. Protože membrány PVDF vážou proteiny zcela nespecificky, je t řeba zablokovat jejich neobsazen  vazebn  m sta. To jsme provedli pomocí 5 % roztoku sušeného nízkotučného mléka v TBS-T (Blocking solution/buffer). Membrány jsme do tohoto roztoku ponořili a nechali je hodinu při pokojové teplotě na kývačce.

Po skončení blokace jsme membrány vložili do parafinových vaniček s roztokem primární protilátky v roztoku TBS-T-5 % mléka, umístili je na k va ku a nechali inkubovat přes noc při teplotě 4 C. Nastavení primárních protilátek pro jednotliv  proteiny bylo následující:

- Goat anti-VCAM-1 (R&D systems, USA): v ředění 1:500
- Rabbit anti-eNOS (Santa Cruz Biotechnology, USA): v ředění 1:200
- Rabbit anti-phospho(Ser1177) eNOS (Santa Cruz Biotechnology, USA): v ředění 1:500
- Rabbit anti-HO-1 (Abcam, UK): v ředění 1:2000
- Rabbit anti-SOD-3 (Abcam, UK): v ředění 1:500

- Rabbit anti-catalase (Abcam, UK): v ředění 1:2000
- Mouse anti-GAPDH (pro potvrzení jednotné nanášky proteinů, Sigma-Aldrich, USA): v ředění 1:10000

Po inkubaci s primární protilátkou jsme membrány 3x propláchli a 6 x 10 minut na kývačce promývali v roztoku TBS-T.

Dále proběhla hodinová inkubace na kývačce za pokojové teploty se sekundárními protilátkami v roztoku TBS-T-5 % mléka. Nastavení sekundárních protilátek pro jednotlivé markery bylo následující:

- VCAM-1: Rabbit Anti-Goat IgG-peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) v ředění 1:5000
- eNOS: Goat Anti-Rabbit IgG-(Fab')₂ (HRP) (Abcam, UK) v ředění 1:2000
- peNOS: Goat Anti-Rabbit IgG-(Fab')₂ (HRP) (Abcam, UK) v ředění 1:2000
- HO-1: Goat Anti-Rabbit IgG-(Fab')₂ (HRP) (Abcam, UK) v ředění 1:4000
- SOD-3: Goat Anti-Rabbit IgG-(Fab')₂ (HRP) (Abcam, UK) v ředění 1:2000
- Catalase: Goat Anti-Rabbit IgG-(Fab')₂ (HRP) (Abcam, UK) v ředění 1:4000
- GAPDH: Goat Anti-Mouse IgG-peroxidase (Sigma - Aldrich, USA) v ředění 1:20000

Inkubované membrány byly promyty stejným způsobem, jako po primární inkubaci.

6.4.6 Chemiluminiscenční detekce

Námi použité sekundární protilátky byly konjugované s enzymem křenuvou peroxidázou, která reaguje s chemiluminiscenčním substrátem za vzniku světla v místě výskytu proteinu. Světlo je možné detekovat přiložením membrány na fotografický film. Množství světla je úměrné množství detekovaného proteinu.

Jako detekční činidla byly podle potřeby použity roztoky dvou různých intenzit, tzv. Pico (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific), nebo tzv. Femto (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate; Thermo Scientific). Složky 1 a 2 těchto komerčně vyrobených detekčních roztoků jsme smíchali v poměru 1:1 a nanесли na membrány na přesně určenou dobu. Po uplynutí této doby jsme roztok slili, membrány vložili do průhledné folie a uzavřeli do kazety.

V temné komoře jsme k membránám přikládali fotografický film, který byl poté ihned vložen do vývojky, následně byl opláchnut ve vodě a vložen do ustalovače. Po usušení byly filmy připraveny k vyhodnocení.

6.5 Vyhodnocení

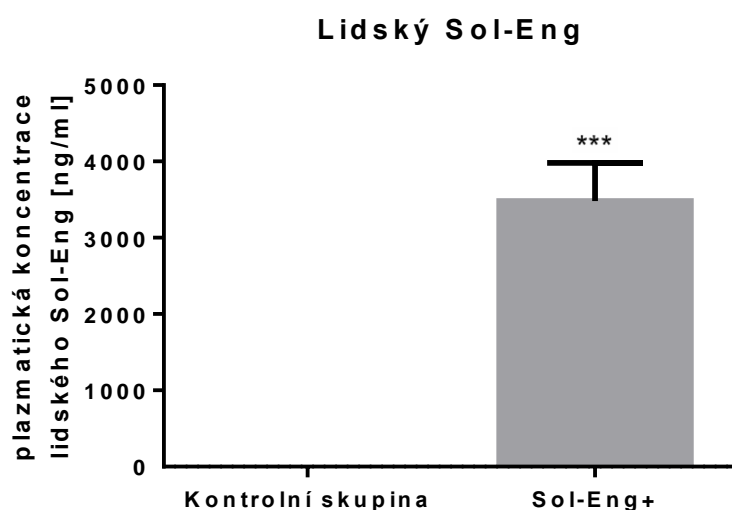
Pruhy bandů z vyvolaných filmů byly naskenovány a semikvantitativně vyhodnoceny denzitometrickou metodou. Výsledky byly statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Výsledky jsou prezentovány jako průměr procentuálních hodnot exprese jednotlivých proteinů u hodnocené skupiny v porovnání se skupinou kontrolní \pm S.E.M. (standardní chyba průměru). Pro hodnocení byl použit neparametrický Mann-Whitney t-test, přičemž byla stanovena hladina statistické významnosti $p \leq 0,05$.

7. VÝSLEDKY

7.1 ELISA analýza

Pomocí ELISA analýzy byla určena exprese lidského solubilního endoglinu u obou skupin myší. Hodnoty skupiny Sol-Eng⁺ byly signifikantně vyšší (3480 ± 501 ; $p \leq 0,0001$) než u kontrolní skupiny, kde byla hladina lidského sEng nedetekovatelná. Výsledek je zobrazen v grafu 1 v ng/ml.

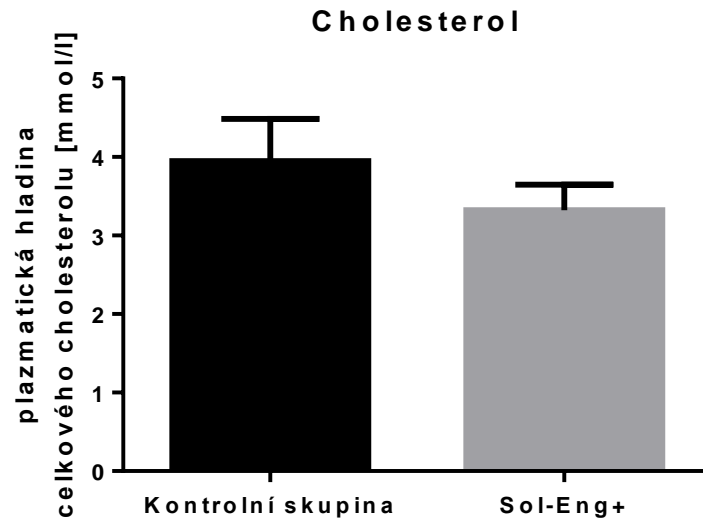
Graf 1: Hladiny lidského solubilního endoglinu



7.2 Biochemická analýza

Biochemickou analýzou byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu u porovnávaných skupin. Zvířata byla krmena dietou bohatou na cholesterol a tuky po dobu 3 měsíců. Rozdíly mezi hladinami celkového cholesterolu mezi kontrolní skupinou a skupinou Sol-Eng⁺ nebyly statisticky významné. Výsledky jsou uvedeny v grafu 2 v mmo/l ($3,947 \pm 0,5385$ vs. $3,322 \pm 0,3241$; $p= 0,3308$).

Graf 2: Hladiny celkového cholesterolu

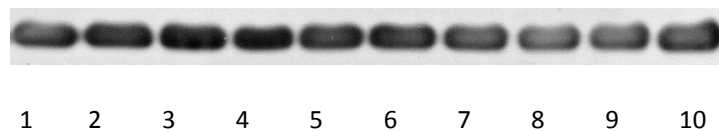


7.3 Western blot analýza

Pomocí Western blot analýzy jsme získali informace o expresi vybraných molekul v srdeční tkáni transgenního myšního modelu s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu v porovnání s kontrolní skupinou. Pro kontrolu jednotné nanášky proteinů jsme detekovali protein GAPDH. Fotografie je na obrázku 6 (reprezentativní imunoblot: 1-5 kontrolní skupina, 5-10 Sol-Eng⁺).

Obrázek 6: Kontrola nanášky detekcí GAPDH

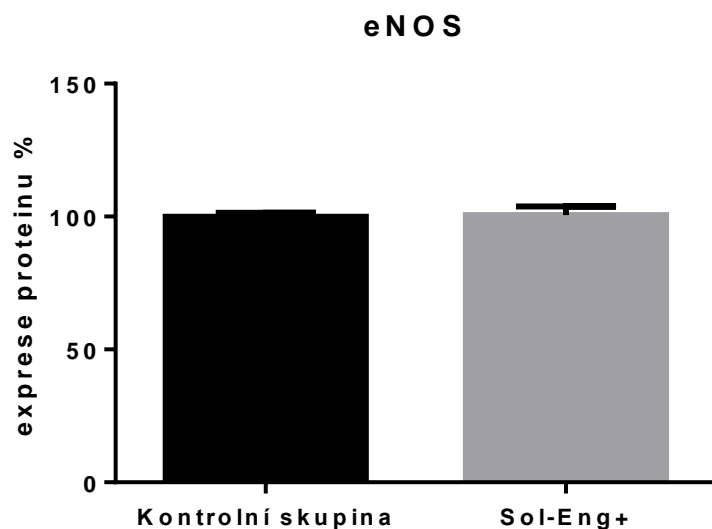
Vzorky č. 1-5 – kontrolní skupina, vzorky č. 5-10 – Sol-Eng⁺



7.3.1 Exprese molekuly eNOS

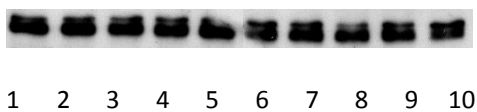
V expresi molekuly eNOS nebyl ve výsledcích měření zaznamenán signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou Sol-Eng⁺ ($100 \pm 1,410$ vs. $100,5 \pm 3,249$; $p = 0,8016$). Výsledky jsou znázorněny v grafu 3 v % exprese proteinu. Reprezentativní snímek s vyobrazenými bandy proteinu chemiluminiscenční detekcí je pod grafem (obrázek 7).

Graf 3: Exprese eNOS



Obrázek 7: Snímek detekce eNOS

Vzorky č. 1-5 – kontrolní skupina; č. 5-10 – Sol-Eng⁺

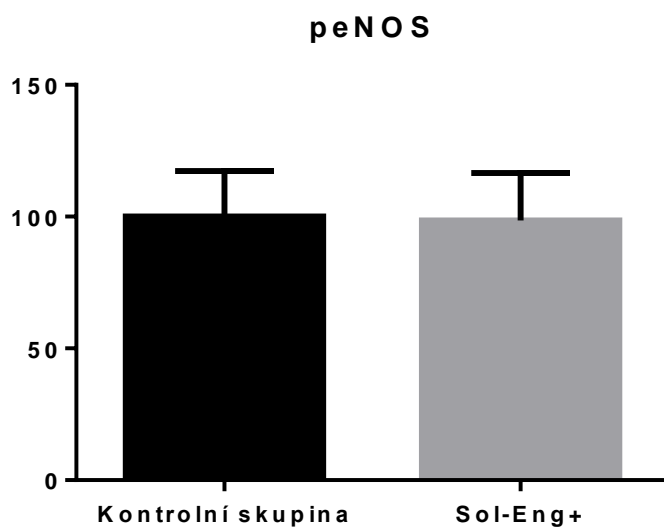


..

7.3.2 Exprese molekuly peNOS

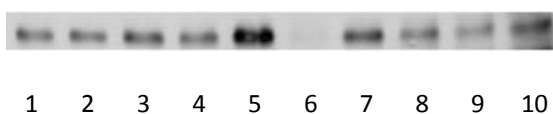
Výsledky analýzy také neprokázaly signifikantní rozdíl v expresi peNOS mezi kontrolní skupinou a skupinou Sol-Eng⁺ ($100,0 \pm 17,33$ vs. $98,51 \pm 18,04$; $p = 0,9004$). Výsledky jsou znázorněny v grafu 4 v % exprese proteinu. Reprezentativní snímek s vyobrazenými bandy proteinu chemiluminiscenční detekcí je pod grafem (obrázek 8).

Graf 4: Exprese peNOS



Obrázek 8: Snímek detekce peNOS

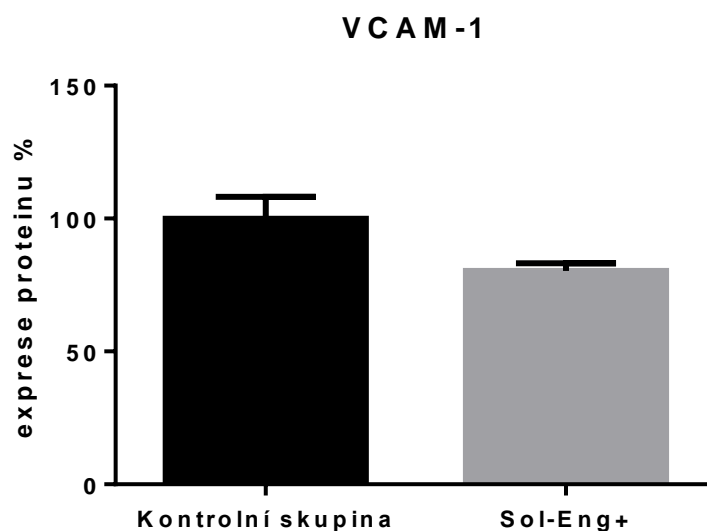
Vzorky č. 1-5 – kontrolní skupina; č. 5-10 – Sol-Eng⁺



7.3.3 Exprese molekuly VCAM-1

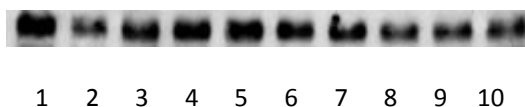
Dále nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi molekuly VCAM-1 mezi kontrolní skupinou a skupinou Sol-Eng⁺ ($100,0 \pm 8,139$ vs. $80,31 \pm 2,853$; $p = 0,0823$). Výsledky jsou znázorněny v grafu 5 v % exprese proteinu. Reprezentativní snímek s vyobrazenými bandy proteinu chemiluminiscenční detekcí je pod grafem (obrázek 9).

Graf 5: Exprese VCAM-1



Obrázek 9: Snímek detekce VCAM-1

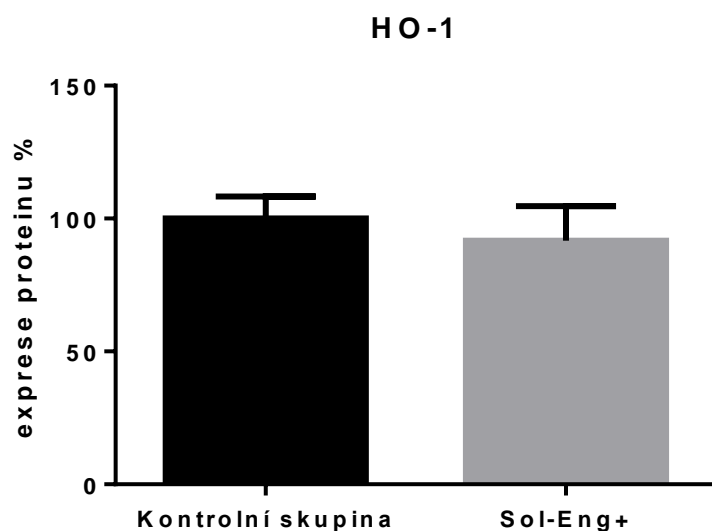
Vzorky č. 1-5 – kontrolní skupina; č. 5-10 – Sol-Eng⁺



7.3.4 Exprese molekuly HO-1

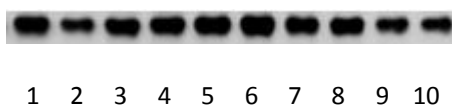
Ani ve výsledcích měření exprese molekuly HO-1 nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou Sol- Eng⁺ ($100,0 \pm 8,273$ vs. $91,68 \pm 12,99$; $p = 0,6277$). Výsledky jsou znázorněny v grafu 6 v % exprese proteinu. Reprezentativní snímek s vyobrazenými bandy proteinu chemiluminiscenční detekcí je pod grafem (obrázek 10).

Graf 6: Exprese HO-1



Obrázek 10: Snímek detekce HO-1

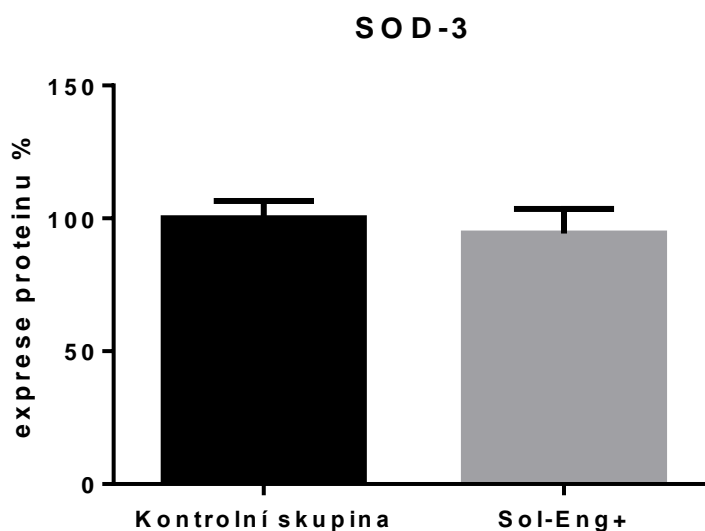
Vzorky č. 1-5 – kontrolní skupina; č. 5-10 – Sol-Eng⁺



7.3.5 Expres molekuly SOD-3

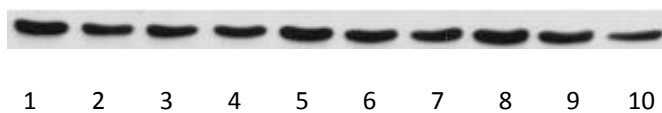
Jako další byla hodnocena exprese molekuly SOD-3. Výsledky měření také neprokázaly signifikantní rozdíl v expresi u kontrolní skupiny a skupiny Sol-Eng⁺ ($100,0 \pm 6,569$ vs. $94,35 \pm 9,267$; $p > 0,9999$). Výsledky jsou znázorněny v grafu 7 v % exprese proteinu. Reprezentativní snímek s vyobrazenými bandy proteinu chemiluminiscenční detekcí je pod grafem (obrázek 11).

Graf 7: Expres SOD-3



Obrázek 11: Snímek detekce SOD-3

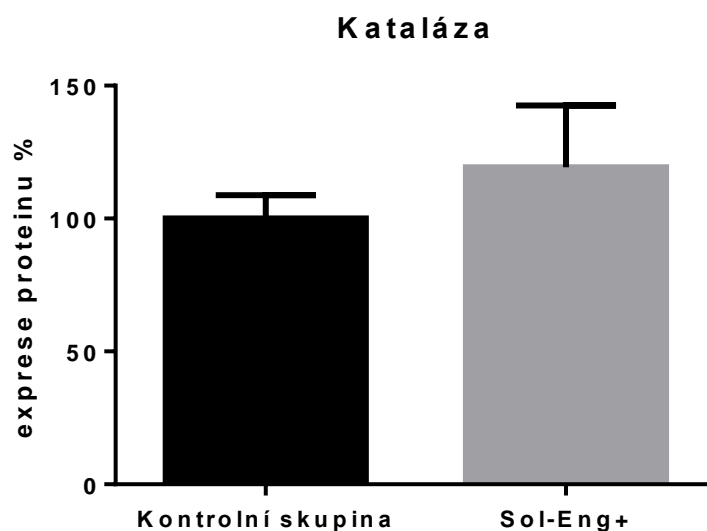
Vzorky č. 1-5 – kontrolní skupina; č. 5-10 – Sol-Eng⁺



7.3.6 Exprese molekuly kataláza

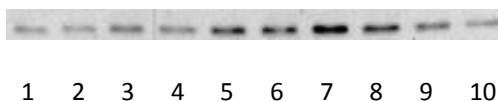
Ani ve výsledcích měření exprese molekuly katalázy se neprokázal statisticky významný rozdíl v expresi mezi kontrolní skupinou a skupinou Sol-Eng⁺ ($100,0 \pm 8,801$ vs. $119,3 \pm 23,18$; $p = 0,6494$). Výsledky jsou znázorněny v grafu 8 v % exprese proteinu. Reprezentativní snímek s vyobrazenými bandy proteinu chemiluminiscenční detekcí je pod grafem (obrázek 12).

Graf 8: Exprese katalázy



Obrázek 12: Snímek detekce katalázy

Vzorky č. 1-5 – kontrolní skupina; č. 5-10 – Sol-Eng⁺



8. DISKUSE

Endotelové buňky v srdci hrají nezbytnou roli v regulaci a udržování srdeční funkce. Jedná se zejména o buňky endokardu a kapilár myokardu, kde endotelové buňky přímo interagují s přilehlými kardiomyocyty. Srdeční endotelové buňky vytváří a uvolňují, stejně jako buňky cévního endotelu, celou řadu auto- a parakrinních působků, které přímo ovlivňují srdeční metabolismus, růst, kontraktilitu a rytmicitu srdce. Syntéza, sekrece a především aktivita těchto látek v srdci spolu úzce souvisí, je vzájemně propojena a interaguje. Kardiovaskulární rizikové faktory jako hyperlipidémie, hypertenze, oxidační stres, kouření nebo diabetes mohou způsobit adaptační reakce, často následované srdeční endotelovou dysfunkcí. Vzhledem k provázanosti všech endotelových signálních drah, aktivace nebo narušení některé z nich ovlivní i další, což vede k narušení rovnováhy a progresi srdečního onemocnění (Brutsaert, 2003).

Oxidační stres je stav, při kterém oxidanty projevují své toxické účinky buď v důsledku jejich zvýšené produkce, nebo narušením mechanismů buněčné protekce. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou za fyziologických podmínek generovány jako vedlejší produkty aerobního dýchání a substrátové oxidace. Jejich zvýšená tvorba nastává za různých patofyziologických podmínek nebo narušením antioxidantních mechanismů. ROS se mohou účastnit mnoha signálních procesů a mohou způsobit ireverzibilní poškození buněk nebo buněčnou smrt (Giordano, 2005). V srdci se ROS mohou podílet na vzniku a progresi dysfunkce endotelu, ischemické choroby srdeční, hypertrofie srdce, srdečního selhání (Khatri et al., 2004; Li et al., 2002.) a ischemicko-reperfuzního poškození (Štejfa et al., 2007).

Zvýšené hladiny solubilní formy endoglinu (TGF- β receptoru III) cirkulující v plazmě byly zjištěny za různých patologických podmínek v souvislosti s kardiovaskulárním systémem. Existuje celá řada studií, které předpokládají, že by sEng mohl být považován za biomarker endotelové dysfunkce, například u preeklampsie (Venkatesha et al., 2006), aterosklerózy (Blann et al., 1996; Stráský et al., 2011), hypercholesterolemie (Bláha et al., 2008), diabetu mellitu a hypertenze (Blazquez-Medela et al., 2010) nebo ischemické choroby srdeční (Ikemoto et al., 2012). Protože u všech těchto onemocnění hraje významnou roli endotelová dysfunkce, předpokládá se, že vysoké hladiny sEng mohou představovat znak endotelové dysfunkce, která se podílí na rozvoji mnohých kardiovaskulárních onemocnění (Němečková et al., 2015).

Výsledky nedávné studie autorů Němečková a kol. (2015) demonstrovaly, že vysoké hladiny sEng samostatně nevyvolávají dysfunkci endotelu. Studie byla provedena na aortách

transgenního kmene myší s vysokými hladinami sEng a kontrolní skupině bez vysokých hladin sEng. Obě skupiny byly krmeny standardní dietou pro hlodavce. Bylo porovnáváno funkční poškození aorty a exprese markerů endotelové dysfunkce mezi jednotlivými skupinami. Žádné významné rozdíly nebyly zaznamenány. Tato data však nevyvrátila možnost, že se sEng může podílet na změně endotelové funkce v kombinaci s jiným rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění, například hypercholesterolémií (Němečková et al., 2015).

První zmínka o souvislosti mezi cholesterolémií a sEng se objevila v práci autorů Blann a kol. (1996), kteří prokázali zvýšené sérové hladiny sEng u pacientů s aterosklerózou. Zvýšené hladiny sEng byly spojeny s hladinami celkového cholesterolu, ale s markery poškození endotelu a jeho dysfunkcí nikoliv (Blann et al., 1996). Následně byl sEng kvalifikován, jako marker zvyšující se s hladinou celkového cholesterolu u pacientů s familiární hypercholesterolémií (Bláha et al., 2008).

Kromě hypercholesterolémie, mohou mít na hladinu sEng vliv i jiné kardiovaskulární rizikové faktory. Z pohledu patofyziologie endotelové dysfunkce jsou zásadní zánět a oxidační stres. Hladiny sEng byly zvýšeny po podávání zánětlivého cytokinu TGF- α i po vyvolání oxidačního stresu peroxidem vodíku (Ikemoto et al., 2012). Také se prokázalo, že HO-1 s ochrannou funkcí inhibuje uvoňování sEng z buněk endotelu a placentárních explantátů (Cudmore et al., 2007).

V dalších studiích bylo zjištěno, že je sEng schopný interagovat se signalizací TGF- β , pro kterou představuje přirozeného antagonistu. S TGF- β 1 kompetuje o vazbu na své receptory, interferuje s následnou signalizací a oslabuje aktivaci eNOS v endotelových buňkách (Venkatesha et al., 2006). Předpokládá se, že inhibice aktivity eNOS může být rozhodující pro možné účinky sEng na cévní endotel. Snížení funkce eNOS se vztahuje ke zvýšené expresi adhezních molekul (tvorbě zánětu), zvýšené cévní permeabilitě, antiangiogenním účinkům, změnám vazodilatačních vlastností arterií, rozvoji dysfunkce endotelu, arteriální hypertenzi a ateroskleróze (Förstermann a Sessa, 2012), to vše přičítáno sEng (Rathouská et al., 2015).

V naší experimentální práci jsme stavěli na poznatcích předchozích studií, přestože o působení sEng na srdce se prozatím neví mnoho. Tato práce vznikla v návaznosti na studie týkající se cévního endotelu (Němečková et al., 2015) a na předpoklad, že kombinací vlivu vysokých hladin sEng a přítomnosti dalšího rizikového faktoru kardiovaskulárních onemocnění (vysokotuková dieta) by mohlo dojít k iniciaci zánětu a oxidačního stresu v srdeční stěně, případně ke změně funkce endotelu v myokardu myší.

Pro hodnocení stavu myokardu pod vlivem vysokých hladin solubilního endoglinu byl zvolen již experimentálně zavedený kmen transgenních myší (Valbuena-Diez et al., 2012; Němečková et al., 2015) vykazující vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu. K posílení vlivu sEng byla, jako další kardiovaskulární rizikový faktor, zvolena dieta s vysokým obsahem tuku a cholesterolu, která u myší vedla k mírné hypercholesterolemii (cca 3,5 mmol/l). Mezi skupinami Sol-Eng+ myší (vykazující vysoké hladiny lidského sEng) a kontrolních myší (vykazující nedetekovatelné hladiny lidského sEng) však signifikantní rozdíl v hladinách cholesterolu zaznamenán nebyl. Pomocí metody Western blot byla v homogenátu srdeční tkáně sledována exprese zvolených markerů oxidačního stresu (HO-1, SOD-3, kataláza), zánětu (VCAM-1) a protekce endotelu (eNOS, peNOS). U žádného z vybraných proteinů však nebyl zaznamenán významný rozdíl v expresi mezi oběma skupinami myší.

Z výsledků studie vyplývá, že vliv solubilního endoglinu v kombinaci s vysokotukovou dietou na myší myokard, ve smyslu indukce zánětu, oxidačního stresu, případně dysfunkce endotelu, se nepodařilo potvrdit. Konečné závěry, týkající se vlivu sEng v kombinaci s vysokotukovou dietou na stav myšího myokardu, však bude vhodné vyvodit až po rozšíření výsledků, případně potvrzení výsledků stávajících také dalšími metodami.

9. ZÁVĚR

V této práci byla porovnávána exprese vybraných markerů zánětu, oxidačního stresu a funkce endotelu (VCAM-1, HO-1, SOD-3, kataláza, eNOS, peNOS) v myokardu myší vykazujících vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu se skupinou kontrolní s nedetekovatelnými hladinami tohoto plazmatického proteinu. Obě skupiny myší byly krmené dietou s vysokým obsahem tuku a cholesterolu po dobu tří měsíců. Výsledky studie neukázaly signifikantní rozdíl v expresi proteinů v myokardu mezi skupinami ani u jedné z vybraných molekul. Dále byly analyzovány rozdíly hladin celkového cholesterolu mezi oběma skupinami. Ani zde nebyl zjištěn signifikantní rozdíl hodnot mezi skupinami.

Vysokotuková dieta u obou skupin myší podnítila tvorbu mírné hypercholesterolémie, avšak v kombinaci s vysokými hladinami solubilního endoglinu u sledované skupiny nevedla k tvorbě zánětu, oxidačního stresu, případně narušení funkce endotelu v myokardu myší. Hodnocení vlivu vysokých plazmatických hladin lidského solubilního endoglinu v kombinaci s tukovou dietou na myší myokard je v současnosti předmětem dalších studií.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

Akt	proteinkináza B
AMPK	adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkináza
APS	peroxodisíran amonný (ammonium persulphate)
ATP	adenosintrifosfát
BCA	kyselina bicinchoninová (bicinchonic acid)
BH _{2/3/4}	di-/tri-/tetrahydrobiopterin
BSA	bovinní sérový albumin
BVR	biliverdin reduktáza
CaM	kalmodulin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
CD 105	endoglin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CO	oxid uhelnatý
ELISA	enzymová metoda detekce antigenu (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ENG	endoglin
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HLP	hyperlipoproteinémie
HO	hemoxygenáza
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)
ICHS	ischemická choroba srdeční
Ig	imunoglobulin

LDL	nízkodenzitní lipoprotein (low density lipoprotein)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MMP-14	matrix metaloproteináza 14
NADPH	nikotinamiddinukleotid fosfát
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)
NOS	syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)
O ₂ ^{•-}	superoxidový anion
ONOO ⁻	peroxynitrit
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (polyacrylamide gel electrophoresis)
peNOS	fosforylovaná endotelová syntáza oxidu dusnatého
PVDF	polyvinyliden difluorid
RIPA	lyzační pufr (Radio Immuno Precipitation Assay buffer)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SDS	dodecylsírán sodný (sodiumdodecylsulphate)
sEng	solubilní endoglin
Ser	serin
SOD	superoxiddismutáza
sVCAM-1	rozpustná cévní adhezí molekula 1 (soluble vascular cell adhesion molecule 1)
TBS-T	promývací roztok (Tris-buffered saline + Tween 20)
TEMED	tetramethylendiamin
TGF-β	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
Thr	threonin
TNF-α	tumor nekrotizující faktor alfa
Tyr	tyrosin

VCAM-1	cévní adhezní molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)
VEGF	cévní endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení gelů pro elektroforézu	39
---	----

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Reakční schéma tvorby NO	20
Obrázek 2: Mechanismus rozpojení eNOS	22
Obrázek 3: Migrace leukocytů	25
Obrázek 4: Schéma účinků konečných produktů degradace hemu	28
Obrázek 5: Princip metody Western blot	37
Obrázek 6: Kontrola nanášky detekcí GAPDH	45
Obrázek 7: Snímek detekce eNOS	46
Obrázek 8: Snímek detekce peNOS	47
Obrázek 9: Snímek detekce VCAM-1	48
Obrázek 10: Snímek detekce HO-1	49
Obrázek 11: Snímek detekce SOD-3	50
Obrázek 12: Snímek detekce katalázy	51

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Hladiny lidského solubilního endoglinu	44
Graf 2: Hladiny celkového cholesterolu	45
Graf 3: Exprese eNOS	46
Graf 4: Exprese peNOS	47
Graf 5: Exprese VCAM-1	48
Graf 6: Exprese HO-1	49
Graf 7: Exprese SOD-3	50
Graf 8: Exprese katalázy	51

14. POUŽITÁ LETERATURA

Alderton, W. K., Cooper, C. E. a Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 2001, 357: 593–615.

Alheid, U., Frolich, J. C. a Förstermann, U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thrombosis Research*, 1987, 47: 561–571.

Andrew, P. J. a Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*, 1999, 43.3: 521-531.

Beckman, J. S. a Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology*, 1996, 271: C1424–C1437.

Benjamin, I. J. Targeting endoglin, an auxiliary TGF- β coreceptor, to prevent fibrosis and heart failure. *Circulation*, 2012, 125.22: 2689-2691.

Berk, B.C., Fujiwara, K. a Lehoux, S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117: 568 –575.

Bernabeu, C., Conley, B. A. a Vary, C. P. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, 102.6: 1375–1388.

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

Blanco, F. J., et al. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circulation Research*, 2008, 103: 1383–1392.

Blanco, F. J., et al. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *Journal of Cellular Physiology*, 2005, 204: 574–584.

Blann, A. D., et al. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1996, 120.1-2: 221-226.

Blazquez-Medela, A. M., et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Medicine*, 2010, 8: 86.

Boulanger, Ch. M. a Vanhoutte, P. M. G proteins and endothelium-dependent relaxations. *Journal of Vascular Research*, 1997, 34.3: 175-185.

- Brahmajothi, M. V. a Campbell, D. L. Heterogeneous Basal Expression of Nitric Oxide Synthase and Superoxide Dismutase Isoforms in Mammalian Heart Implications for Mechanisms Governing Indirect and Direct Nitric Oxide–Related Effects. *Circulation Research*, 1999, 85.7: 575-587.
- Brutsaert, D. L. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiological Reviews*, 2003, 83.1: 59-115.
- Campbell, D. L., Stamler, J. S. a Strauss, H. C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes: dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *Journal of General Physiology*, 1996, 108: 277–293.
- Carnicer, R., et al. Nitric oxide synthases in heart failure. *Antioxidants & redox signaling*, 2013, 18.9: 1078-1099.
- Conley, B. A., et al. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 2000, 153: 323–335.
- Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E. a Abdala-Valencia, H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling*, 2011, 15.6: 1607-1638.
- Cruz-Gonzalez, I., et al. Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008, 12: 955-961.
- Cudmore, M., et al. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation*, 2007, 115: 1789-1797.
- Cui, S., et al. Relationship among soluble CD105, hypersensitive Creactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 2008, 121: 128-32.
- Čihák, R. *Anatomie 3*. 2. vyd. Praha: Grada, 2004. 692 s. ISBN 80-247-1132-X.
- Davies, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 1995, 61: 1–31.
- De Vivo, A., et al. Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstetricia Gynecologica Scandinavica*, 2008, 87: 837–842.
- Dhalla, N. S., et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 2000, 47: 446–456.

- Dimmeler, S. a Zeiher, A. M. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death & Differentiation*, 1999, 6: 964–968.
- Feinberg, M. W. a Jain, M. K. Role of transforming growth factor-beta1/Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis. *Panminerva Medica*, 2005, 47: 169–186.
- Fleming, I. a Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2003, 284: R1–R12.
- Fleming, I. a Busse, R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular Research*, 1999, 43.3: 532-541.
- Folz, R. J. a Crapo, J. D. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics*, 1994, 22: 162–171.
- Foresti, R., Green, C. J. a Motterlini, R. Generation of bile pigments by haem oxygenase: a refined cellular strategy in response to stressful insults. *Biochemical Society Symposia*, 2004, 71: 177–192.
- Förstermann, U. a Li, H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *British Journal of Pharmacology*, 2011, 164.2: 213-223.
- Förstermann, U. a Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 2012, 33.7: 829-37.
- Förstermann, U., et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 1994, 23.6.2: 1121-1131.
- Förstermann, U., et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulation Research*, 1986, 58: 531–538.
- Fukai, T., et al. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, 101: 2101–2111.
- Fukai, T., et al. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 2002, 55.2: 239-249.

Fulton, D., Gratton, J. P. a Sessa, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 299.3: 818-824.

Garcia-Cardena, G., et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 1998, 392.6678: 821-824.

Gearing, A. J., et al. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Annals of the New York Academy Sciences*, 1992, 667: 324–331.

Geraldes, P., et al. Selective regulation of heme oxygenase-1 expression and function by insulin through IRS1/phosphoinositide 3-kinase/Akt-2 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 34327-34336.

Gielis, J. F., et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 50.7: 765-776.

Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115.3: 500-508.

Goette, A., et al. Angiotensin II receptor blockade reduces tachycardia-induced atrial adhesion molecule expression. *Circulation*, 2008, 117.6: 732-742.

Gong, P., Cederbaum, A. I. a Nieto, N. Increased expression of cytochrome P450 2E1 induces heme oxygenase-1 through ERK MAPK pathway. *Jurnal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 29693-29700.

Gougos, A. a Letarte, M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265: 8361–8364.

Griendling, K. K., Sorescu, D. a Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 2000, 86: 494–501.

Halbriigge, T., et al. Role of nitric oxide formation in the regulation of haemodynamics and the release of noradrenaline and adrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1991, 344: 720-727.

Hawinkels, L. J., et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)- mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 2010, 70: 4141-50.

Hazzalin, C. A. a Mahadevan, L. C. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3: 30-40.

- Heck, D. E., et al. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1203: 120-125.
- Hemmens, B. a Mayer, B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Nitric Oxide Protocols*, 1998, 100: 1-32.
- Hu, C. M., et al. Heme oxygenase-1 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation*, 2004, 110: 309-316.
- Huang, Y., et al. Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. *Circulation*, 2004, 109.1: 97-102.
- Chen, C. A., et al. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283.40: 27038-27047.
- Chen, K., et al. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circulation Research*, 2004, 95: 1167–1173.
- Ikemoto, T., et al. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels*, 2012, 27: 344-351.
- Jamieson, D., et al. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annual Review of Physiology*, 1986, 48: 703–719.
- Junqueira, L. C., Kelley, R. O. a Carniero, C. *Základy histologie*. 7. vyd. Jinočany: H+H, 1999. 502 s. ISBN 80-85787-37-7.
- Kapur, N. K., et al. Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation*, 2012, 125.22: 2728-2738.
- Kapur, N. K., et al. Usefulness of soluble endoglin as a noninvasive measure of left ventricular filling pressure in heart failure. *American Journal of Cardiology*, 2010, 106.12: 1770–1776.
- Kapur, N. K., Morine, K. J. a Letarte M. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Journal of Vascular Health and Risk Managment*, 2013, 9: 195-206.
- Karlsson, K. a Marklund, S. L. Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochemical Journal*, 1987, 242: 55–59.
- Khatri, J. J., et al.. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation*, 2004, 109: 520–525.

- Kim, H. P., et al. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB Journal*, 2004, 18: 1080–1089.
- Kirkman, H. N. a Gaetani, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32: 44–50.
- Klein, R. M., et al. Circulating adhesion molecules (cICAM-1, IcVCAM-1) in patients with suspected inflammatory heart muscle disease. *Zeitschrift fur Kardiologie*, 1998, 87.2: 84-93.
- Klener, P. *Vnitřní lékařství*. 3., přepr. a dopl. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2006. 1158 s. ISBN 807262430X.
- Kojda, G. a Harrison, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Research*, 1999, 43: 562–571.
- Kumar, A. G., et al. Murine VCAM-1. Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form. *Journal of Immunology*, 1994, 153: 4088–4098.
- Kuzkaya, N., et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 22546–22554.
- LabGuide – Průvodce laboratoří* [online]. Vytvořeno 2014 [cit. 2016-08-06]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>
- Landmesser, U., et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 111: 1201–1209.
- Lastres, P., et al. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *Journal of Cell Biology*, 1996, 133: 1109–1121.
- Leask, A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovascular Research*, 2007, 74: 207–212.
- Lee, S., et al. Hydrogen peroxide increases human leukocyte adhesion to porcine aortic endothelial cells via NFkappaB-dependent up-regulation of VCAM-1. *International Immunology*, 2007, 19: 1349–1359.
- Lee, Y. W., et al. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2001, 33: 83–94.

- Li, C. G., et al. The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2000, 152: 249-256.
- Li, J. M., et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*, 2002, 40: 477-484.
- Lin, M. I., et al. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278.45: 44719-44726.
- Lin, Q., et al. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 20621-20633.
- Liu, L., et al. Association of hypercholesterolemia and cardiac function evaluated by speckle tracking echocardiography in a rabbit model. *Lipids in health and disease*, 2014, 13.1: 1.
- Lopez-Novoa, J. M. a Bernabeu, C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *America Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2010, 299: H959-H974.
- Ma, X., et al. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000, 20: 2546-2552.
- Mačák, J. a Mačáková, J. *Patologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 347 s. ISBN 80-247- 0785-3.
- Maines, M. D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB Journal*, 1988, 2: 2557-2568.
- Mansego, M. L., et al. Different impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 2011, 12.9: 6146-6163.
- Marklund, S. L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochemical Journal*, 1990, 266: 213-219.
- Marui, N., et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 92: 1866-1874.
- Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annual Review Biochemistry*, 1998, 67: 753-791.
- Mayer, B. a Hemmens, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences*, 1997, 22.12: 477-481.

- McCabe, T. J., et al. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain 'calcium-independent' eNOS activation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 6123–6128.
- McMillan, K., et al. Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2000, 97: 1506–1511.
- Michell, B. J., et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of biological chemistry*, 2001, 276.21: 17625-17628.
- Mueller, C. F., et al. Redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005, 25: 274–278.
- Nadali, G., Chiliosi, M. a Semenzato, G. Circulating soluble adhesion molecules: more observations on the increased levels in disease. *Immunology Today*, 1994, 15: 140–141.
- Nachtigal, P., et al. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2012, 224.1: 4-11.
- Nečas, E., Šulc K. a Vokurka, M. *Patologická fyziologie orgánových systémů Část I*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 377 s. ISBN 978-80-246-0615-6.
- Němečková, I., et al. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One*, 2015, 10.3: e0119665.
- Nishida, K., et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *Journal of Clinical Investigation*, 1992, 90.5: 2092.
- Ohno, M., et al. Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of potassium channel and G protein coupling. *Circulation*, 1993, 88.1: 193-197.
- Ohta, H., Adachi, T. a Hirano, K. Internalization of human extracellular-superoxide dismutase by bovine aortic endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, 16: 501–507.
- Oklu, R., et al. Localization of latent transforming growth factor-beta binding protein-1 in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation Journal*, 2010, 75: 196–200.
- Oury, T. D., Day, B. J. a Crapo J. D. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Laboratory Investigation*, 1996b, 75: 617–636.

- Oury, T. D., et al. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, 1996a, 317: 51–57.
- Peterson, J. T., et al. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovascular Research*, 2000, 46.2: 307–315.
- Rathouská, J., et al. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*, 2015, 243.2: 383-388.
- Rokyta, R., et al. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. 1. vyd. Praha: ISV, 2000. 359 s. ISBN 80-85866-45-5.
- Rudic, R. D., et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, 101: 731–736.
- Ryter, S. W. a Choi, A. M. K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2009, 41.3: 251-260.
- Ryter, S. W. a Tyrrell, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28: 289–309.
- Ryter, S. W., Morse, D. a Choi, A. M. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007, 36: 175–182.
- Salinas, M., et al. Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. *FEBS Letters*, 2004, 578: 90-94.
- Sarkar, D., Vallance, P. a Harding, S. E. Nitric oxide: not just a negative inotrope. *European journal of heart failure*, 2001, 3.5: 527-534.
- Sartoretto, J. L., et al. Hydrogen peroxide differentially modulates cardiac myocyte nitric oxide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108.38: 15792-15797.
- Schleicher, M., et al. The Akt1-eNOS axis illustrates the specificity of kinase-substrate relationships in vivo. *Science Signaling*, 2009, 2.82: ra41.
- Silbernagl, S. a Lang, F. *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vyd. české. Praha: Grada, 2001. 390 s. ISBN 80-7169-968-3.

- Sjoquist, P. O. a Marklund, S. L. Endothelium bound extracellular superoxide dismutase type C reduces damage in reperfused ischaemic rat hearts. *Cardiovascular Research*, 1992, 26: 347–350.
- Slebos, D. J., et al. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007, 36: 409–417.
- Stocker, R., et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987, 235: 1043–1045.
- Stralin, P., et al. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995, 15: 2032–2036.
- Stráský, Z., et al. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circulation Journal*, 2011, 75: 1747–1755.
- Stuehr, D., Pou, S. a Rosen, G. M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 14533–14536.
- Štejfá, M., et al. *Kardiologie*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007. 722 s. ISBN 978-80-247-1385-4.
- Tenhunen, R., Marver, H. S. a Schmid, R. Microsomal heme oxygenase: characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244: 6388–6394.
- Trojan, S., et al. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada, 2003. 771 s. ISBN 8024705125
- Valbuena-Diez, A. C., et al. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*, 2012, 126.22: 2612-2624.
- van Laake, L. W., et al. Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation*, 2006, 114: 2288–2297.
- Venkatesha, S., et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*, 2006, 12: 642-649.
- Wang, C. a Chau, L. Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Chang Gung Medical Journal*, 2010, 33.1: 13-24.
- Wung, B. S., et al. Piceatannol upregulates endothelial heme oxygenase-1 expression via novel protein kinase C and tyrosine kinase pathways. *Pharmacological Research*, 2006, 53: 113-122.

Yet, S. F., et al. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circulation Research*, 2001, 89: 168-173.

Young, I. S. and Woodside, J. V. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 2001, 54.3: 176-186.

Zamocky, M., Furtmüller, P. G. and Obinger, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & redox signaling*, 2008, 10: 1527–1548.