

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Western blot analýza vybraných molekul oxidačního
stresu v aortě apoE/LDLR deficientního myšního
modelu**

Diplomová práce

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

Hradec Králové, 2017

Bc. Martina Čermáková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za její odbornou pomoc, cenné rady a poskytnuté materiály, které mi pomohly při zpracování diplomové práce.

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

V Hradci Králové, dne:

Podpis:

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Western blot analýza vybraných molekul oxidačního stresu v aortě apoE/LDLR deficientního myšního modelu

Autor diplomové práce: Bc. Martina Čermáková

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

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit expresi vybraných molekul oxidačního stresu (SOD-3, iNOS, kataláza, HO-1) v aortě a hladiny nitrátů a nitritů v plazmě u dvou skupin myší. Tyto dvě skupiny myší se lišily v genetické výbavě – sledovaná skupina měla, oproti skupině kontrolní, vypnuté geny pro apolipoprotein E a LDL receptor.

Metody: Pro studii se použili 2 měsíce staří samci myší, kteří byli krmeni standartní dietou pro hlodavce. Samci byli rozděleni do dvou skupin – kontrolní (C57BL/6J) a sledované (apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}). Pro zhodnocení a kvantifikaci molekul iNOS, SOD-3, kataláza a HO-1 v aortě byla použita metoda Western blot. Pro kvantifikaci nitrátů a nitritů v plazmě byla užitá metoda HPLC.

Výsledky: Metoda HPLC neprokázala statisticky významné rozdíly v hladinách nitrátů a nitritů v plazmě mezi oběma hodnocenými skupinami myší. Western blot analýza tkáně aorty prokázala statisticky významně vyšší expresi SOD-3 (208,39 %) i signifikantně vyšší expresi iNOS (207,62 %) u skupiny apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} myší oproti skupině kontrolní (100,00 %). Naopak, u molekuly HO-1 došlo k signifikantně nižší expresi (42,22 %) u skupiny apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} myší oproti skupině kontrolní (100,00 %). Analýza exprese molekuly kataláza neprokázala signifikantní rozdíl v expresi mezi hodnocenými skupinami myší.

Závěr: Výsledky našich analýz neprokázaly jednoznačné zvýšení oxidačního stresu u apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} myší oproti skupině C57BL/6J myší. Pro učinění finálních závěrů však bude potřeba výsledky rozšířit o další metodiky.

Klíčová slova: endotelová dysfunkce, ateroskleróza, oxLDL, oxidační stres, HO-1, kataláza, SOD3, iNOS

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Western blot analysis of selected oxidative stress markers in aorta of apoE/LDLR deficient mice

Author of diploma thesis: Bc. Martina Čermáková

Supervisor: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Background: The aim of this diploma thesis was to evaluate expression of selected oxidative stress molecules (SOD-3, iNOS, catalase, HO-1) in cardiac aorta and nitrate and nitrite levels in plasma in two groups of mice. These two groups of mice varied in genetic features - the monitored group was, compared to control group of mice, deficient for apolipoprotein E and LDL receptor.

Methods: For the study, 2 months old male mice were fed a standard rodent diet. The males were divided into two groups – control (C57BL/6J) and monitored (apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}). Western blot method was used to evaluate and quantify iNOS, SOD-3, catalase and HO-1 molecules in the aorta. HPLC method was used to quantify nitrate and nitrite levels in plasma.

Result: HPLC method did not show statistically significant differences in the nitrate and nitrite levels in plasma between the two groups of examined mice. Western blot analysis of aortic samples showed statistically significantly higher SOD-3 expression (208.39 %) and a significantly higher iNOS expression (207.62 %) in the apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice group compared to the control group (100.00 %). In contrast, HO-1 molecule showed significantly lower expression (42.22 %) in the apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice group compared to the control group (100.00 %). Analysis of the catalase molecule expression did not show a significant difference in expression between the groups of examined mice.

Conclusions: The results of our analyses did not show a clear increase in oxidative stress in apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice compared to the C57BL/6J group of mice. However, in order to make the final conclusions, the results will need to be broadened by other methods.

Key words: endothelial dysfunction, atherosclerosis, oxLDL, oxidative stress, HO-1, catalase, SOD-3, iNOS

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1.	STAVBA AORTY.....	13
2.2.	FYZIOLOGIE ENDOTELU A JEHO DYSFUNKCE.....	14
2.2.1.	Endotelová funkce.....	14
2.2.2.	Mechanismy endotelové dysfunkce.....	16
2.2.3.	Oxid dusnatý.....	18
2.2.3.1.	NO syntáza a její izoformy.....	20
2.2.3.2.	Dusitany a dusičnany.....	22
2.3.	OXIDAČNÍ STRES.....	23
2.3.1.	Reaktivní formy kyslíku.....	23
2.3.2.	Buněčné účinky ROS.....	26
2.3.3.	Zdroje ROS.....	27
2.3.4.	Poškození biomolekul.....	30
2.3.5.	Antioxidanty.....	32
2.3.5.1.	Superoxiddismutáza-3.....	32
2.3.5.2.	Kataláza.....	34
2.3.5.3.	Glutation peroxidáza.....	34
2.3.5.4.	Hemoxygenáza-1.....	35
2.4.	ATEROSKLERÓZA.....	39
2.4.1.	Rizikové faktory.....	40
2.4.2.	Úloha oxidačního stresu v aterogenezi.....	41
2.4.3.	Oxidovaný LDL.....	43
2.5.	MYŠÍ MODEL Y ATEROSKLERÓZY.....	46
2.5.1.	ApoE deficientní myš model.....	47
2.5.2.	LDLR deficientní myš model.....	48
2.5.3.	ApoE/LDLR deficientní myš model.....	49
2.5.4.	Myš model ApoE*3-Leiden.....	49
3	CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	50
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	51
4.1.	POUŽITÁ ZVÍŘATA.....	51
4.2.	POSTUP PRO METODU HPLC.....	51
4.3.	POSTUP WESTERN BLOT ANALÝZY.....	52

4.3.1.	Příprava vzorků.....	52
4.3.2.	Určení koncentrace proteinů.....	53
4.3.3.	Gelová elektroforéza.....	54
4.3.4.	Blotování.....	57
4.3.5.	Imunodetekce a vyhodnocení.....	59
5	VÝSLEDKY	63
5.1.	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	63
5.2.	WESTERN BLOT ANALÝZA.....	64
5.2.1.	Expres molekuly SOD-3	65
5.2.2.	Expres molekuly kataláza	66
5.2.3.	Expres molekuly HO-1	67
5.2.4.	Expres molekuly iNOS	68
6	DISKUZE	69
7	ZÁVĚR	73
8	SEZNAM TABULEK.....	74
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
10	SEZNAM GRAFŮ	76
11	POUŽITÁ LITERATURA.....	77

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

apoB	apolipoprotein B
apoE	apolipoprotein E
BH₄	tetrahydrobiopterin
cav	caveolin
CAT	kataláza
Ca²⁺	vápenatý iont
CETP	z angl. <i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CO	oxid uhelnatý
CVD	kardiovaskulární onemocnění (z angl. <i>Cardiovascular disease</i>)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
eNOS	endotelová NO syntáza
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GPx	glutation peroxidáza
HO	hemoxygenáza
H₂O₂	peroxid vodíku
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (z angl. <i>High density lipoproteins</i>)
HRP	křenová peroxidáza (z angl. <i>Horseradish peroxidase</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICAM	intercelulární adhezni molekula (z angl. <i>Intercellular adhesion molecule</i>)
iNOS	inducibilní NO syntáza
kDa	kilodalton
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou (z angl. <i>Low density lipoproteins</i>)
LDLR	LDL receptor
LOX	lektinu podobný oxLDL receptor (z angl. <i>Lectin like oxide LDL receptor</i>)
MDA	malondialdehyd
Milli-Q	redestilovaná voda
MPO	myeloperoxidáza
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

NO	oxid dusnatý
nNOS	neuronální NO syntáza
NO₂⁻	dusitan
NO₃⁻	dusičnan
RIPA	z angl. <i>Radio immuno precipitation assay buffer</i>
RMP	počet otáček za minutu (z angl. <i>Revolutin per minute</i>)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTG	rentgenové
oxLDL	oxidovaný LDL
oxPL	oxidované fosfolipidy
ONOO⁻	peroxynitrit
O₂⁻	superoxidový radikál
OH[•]	hydroxylový radikál
¹O₂	singletový kyslík
PECAM	destičková endotelová adhezní molekula (z angl. <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PDGF	růstový faktor destiček (z angl. <i>Platelet-derived growth factor</i>)
PGI₂	prostacyklin
PVDF	polyvinyliden difluorid
SDS	dodecylsírán sodný
SOD	superoxiddismutáza
TGF-β	transformující růstový faktor β (z angl. <i>Transforming growth factor</i>)
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu (z angl. <i>Tissue plasminogen activator</i>)
TBS	pufrovaný solný roztok “tris-buffered saline“
TEMED	N, N, N', N' – tetramethylethylendiamin
TWEEN	polyoxyetylen-sorbitanmonolaurate
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (z angl. <i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VCAM	vaskulární buněčná adhezní molekula (z angl. <i>Vascular cell adhesion molecule</i>)
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (z angl. <i>Very low density lipoproteins</i>)

1 ÚVOD

Je známo, že oxidační stres a volné radikály hrají důležitou roli ve vývoji aterosklerózy (Soydinç et al., 2007), která je hlavním zdrojem morbidity a mortality ve vyspělém světě. Ateroskleróza je charakterizována akumulací ložisek cholesterolu v makrofázích ve velkých a středních arteriích. Toto ukládání vede k proliferaci určitých buněčných typů v arteriální stěně, které postupně zasahují do lumen cévy a brání průtoku krve. Tento proces může být poměrně zákeřný, trvá po celá desetiletí, až dojde k narušení aterosklerotické léze fyzikálními silami z krevního oběhu (Stocker a Keaney, 2004). Zánět a oxidační stres, které se navzájem zesilují uvnitř vaskulatury a viscerálního tuku, jsou klíčovými procesy, které řídí iniciaci, progresi a následnou rupturu aterosklerotické léze (Hajjar a Gotto, 2013).

Během posledních let bylo prokázáno, že oxidační stres je jedním z nejdůležitějších induktorů endotelové dysfunkce a podílí se na všech stupních vývoje aterosklerotického plátu. Zvířecí modely poskytují jasný vztah mezi množstvím oxidačního stresu a reverzibilní vaskulární dysfunkcí, která může být pozorována před trvalými změnami na cévní stěně (Schnabel a Blankenberg, 2007).

Při ateroskleróze dochází ke zvýšení oxidačního stresu charakterizovaného oxidací lipidů a proteinů v cévní stěně (Stocker a Keaney, 2004). Nadprodukce reaktivních forem kyslíku (ROS) za patofyziologických podmínek tvoří nedílnou součást vývoje kardiovaskulárních onemocnění (CVD), zejména aterosklerózy (Rocha a Libby, 2009). Oxidační stres se podílí na patogenezi endotelové dysfunkce a hypertenze, což jsou dva důležité faktory u mnoha pacientů s aterosklerózou. Dále přispívá k mechanismům progresi onemocnění, jako je vaskulární remodelace (Schulze a Lee, 2005).

Oxidační modifikace lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) v cévní stěně se zdá být klíčovým faktorem při vývoji aterosklerózy. Oxidované LDL (oxLDL) přitahují aktivované makrofágy a přeměňují se na pěnové buňky. Navíc oxLDL vykazují cytotoxický potenciál, který je pravděpodobně zodpovědný za poškození endotelových buněk a za degeneraci makrofágů v aterosklerotickém plátu (Cherubini et al., 2005).

Produkce a účinek ROS závisí na expresi a správné funkci enzymů podílejících se na regulaci ROS ve vaskulárních buňkách. Navíc buňky obsahují četné antioxidantní enzymy, které detoxikují ROS nebo snižují jejich účinky. Nerovnováha mezi ROS

a eliminačním mechanismem nastává v důsledku změny celkové redoxní rovnováhy a modifikace cílových molekul (Kang a Kang, 2013; Li et al., 2014).

Jednou z prvních charakteristických rysů aterosklerózy je endotelová dysfunkce, která je také synonymem pro nedostatek biologicky dostupného oxidu dusnatého (NO) odvozeného z endotelové syntázy oxidu dusnatého (eNOS). Proto je ateroskleróza spojena se sníženými hladinami endogenního NO. Tvorba NO endotelem hraje klíčovou úlohu při udržování kardiovaskulárního zdraví podporou vazodilatace, antitrombotických a důležitých protizánětlivých účinků. Snížení biologicky dostupného NO uvolněného z endotelu má souvislost s řadou jevů spojených s aterogenezí. Obnova biologicky dostupných hladin NO při ateroskleróze může tedy nabídnout terapeutický přístup ke zlepšení zánětu, a tudíž k prevenci potenciální nemoci (Khambata et al., 2017).

Inducibilní NO syntáza (iNOS) přítomná v lidském aterosklerotickém plátu by mohla přispět k zánětlivému procesu vývoje plátu. NO, který produkuje eNOS, je spojen s prevencí dysfunkce endotelových buněk, což může být prospěšné při ateroskleróze. Avšak iNOS je vysoce výkonný enzym, který může po dlouhou dobu produkovat velké množství NO. Velké množství NO se může spojit s peroxidem vodíku (H_2O_2) za vzniku peroxynitritu ($ONOO^-$), aduktu se zvýšenou oxidační schopností. Takto produkováný NO má tedy potenciál zhoršit aterosklerózu podporou zánětu a nekrózy v místě lézí (Detmers et al., 2000).

Ačkoli četné experimentální studie ukázaly, že působení antioxidantů na ROS by mohlo zabránit patologickým událostem vedoucím k ateroskleróze, vnesení tohoto konceptu do léčby lidských onemocnění bylo problematické. ROS mají významné signalizační vlastnosti a neselektivní přístup k odstranění všech ROS by mohl mít škodlivé účinky. Je obecně uznáváno, že četné změny hladin ROS jsou pozorovány v pokročilých stádiích CVD. V počátečních stádiích, které zahrnují zahájení onemocnění, může být změna v úrovni ROS vysoce lokalizovanou událostí v jednotlivých buněčných kompartmentech, nebo dokonce záležitostí individuálních antioxidačních enzymů, aniž by byl ovlivněn celkový stav buněčného redoxu. Případné narušení těchto lokálních změn ROS určitými antioxidačními enzymatickými systémy může vést k narušení redoxní signalizace a potenciálně patologickým následkům (Kang a Kang, 2013).

V této diplomové práci jsme se, za použití myšího experimentálního modelu aterosklerózy, zaměřili na vybrané antioxidační enzymy, které hrají úlohu při

odstraňování volných radikálů. Zároveň cílem práce bylo zhodnotit expresi iNOS, která může přispět k procesu vývoje plátu v myši aortě. Zaměřili jsme se také na hladiny nitritů a nitrátů, jakožto konečných produktů odbourání NO, v plazmě těchto myší.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Stavba aorty

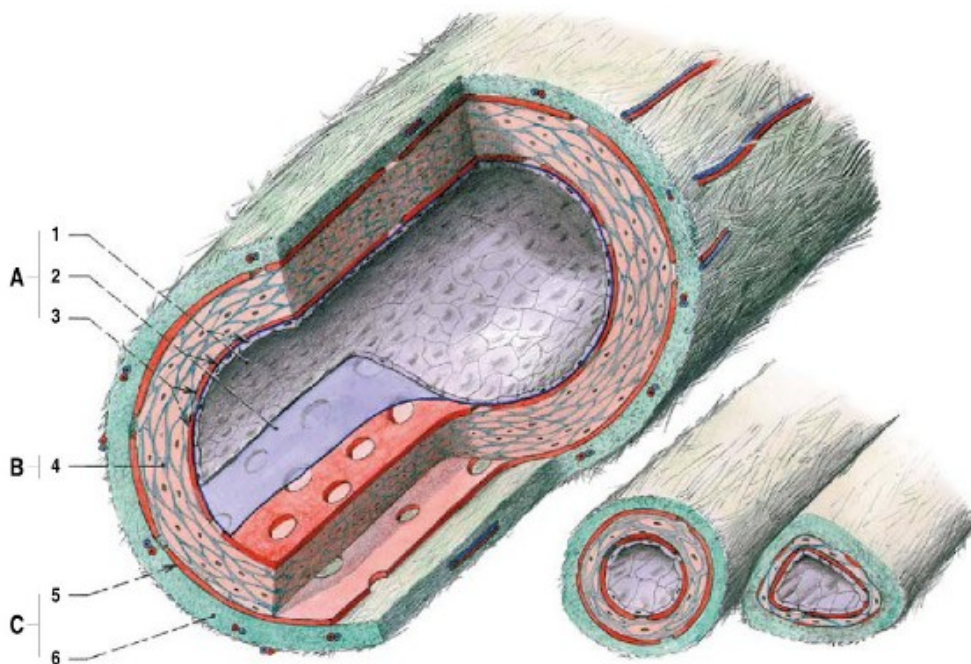
Cévní systém lidského těla je tvořen uzavřenou soustavou trubic, jejichž stěna se v jednotlivých úsecích liší stavbou, a tím i propustností (Dylevský, 2009).

Hrudní aorta je velká elastická tepna s třívrstvou stěnou složenou z *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia*. Tyto tři vrstvy jsou odděleny vrstvou elastinového vlákna, vnitřních a vnějších elastických lamel. Funkce každé vrstvy jsou určeny jejími endogenními složkami (Wheeler et al., 2014).

Tunica intima je nejvnitřnější vrstva skládající se z jedné vrstvy plochých endotelových buněk. Endotelové buňky jsou podloženy sítí elastických a kolagenních vláken (Čihák et al., 2016). Regulují difúzi rozpuštěných látek, vody a koagulaci podél lumenového povrchu (Wheeler et al., 2014). Poškození této endotelové výstelky je jednou z primárních příčin tvorby sraženin.

Tunica media je nejsilnější vrstvou skládající se z buněk hladkého svalstva, cév, fibroblastů, kolagenu, elastických lamel a podkladové hmoty. Tato střední vrstva je převážně zodpovědná za biomechanické vlastnosti arterie. Střídavé soustředné listy hladkého svalstva a elastinu, známé jako lamelární jednotky, jsou radiálně interkalovány kolagenem a poskytují tak roztažnost (Wheeler et al., 2014).

Tunica adventitia je vazivová vrstva tvořená sítí elastických a kolagenních vláken, které zajišťují převážně mechanické vlastnosti cévní stěny a také pružné zakotvení cévy v jejím okolí (Trojan et al., 2003). Vazivová vrstva je zároveň tkání, ve které probíhají autonomní nervy pro inervaci hladké svaloviny cév (Merkunová a Orel, 2008; Dylevský, 2009). Od svalových buněk je tato vrstva oddělena tenkou vrstvou zvanou *membrana elastica externa* (Čihák et al., 2016).



Obrázek 1 Schéma obecné stavby cévní stěny (převzato z: Čihák et al., 2016)

A – tunica intima, 1 – endotel, 2 – lumina basalis endotelu a subendotelová vrstva vaziva, 3 – membrána elastica interna, B – tunica media, 4 – buňky hladké svaloviny, C – tunica adventitia, 5 – membrána elastica externa, 6 – vazivo, v něm vasa vasorum

2.2. Fyziologie endotelu a jeho dysfunkce

Endotel hraje zásadní roli při zajišťování správné hemostatické rovnováhy (Rajendran et al., 2013). Tvoří jednovrstevnou vnitřní výstelku cévního lumen (Karásek et al., 2004) a zajišťuje tak antitrombogenní a nesmáčivý povrch. Endotelové buňky nejenom že tvoří mechanickou bariéru, ale představují metabolicky velmi aktivní tkáň regulující cévní tonus, permeabilitu a ostatní cévní funkce. Funkční poškození endotelové výstelky je počátkem cévních změn, které mohou vyústit v atherotrombotické cévní komplikace. Poškození je spouštěné řadou mechanických, fyzikálně-chemických a imunologických faktorů (Vrablík et al., 2011).

2.2.1. Endotelová funkce

Cévní endotel se podílí na uvolňování různých působků, které regulují buněčnou adhezi, tromborezistenci, proliferaci buněk hladkého svalstva a zánět cévní stěny (Deanfield et al., 2007). Udržuje normální vaskulární tonus a tekutinu v krvi, bez nebo s malou expresí prozánětlivých faktorů (Hadi et al., 2005).

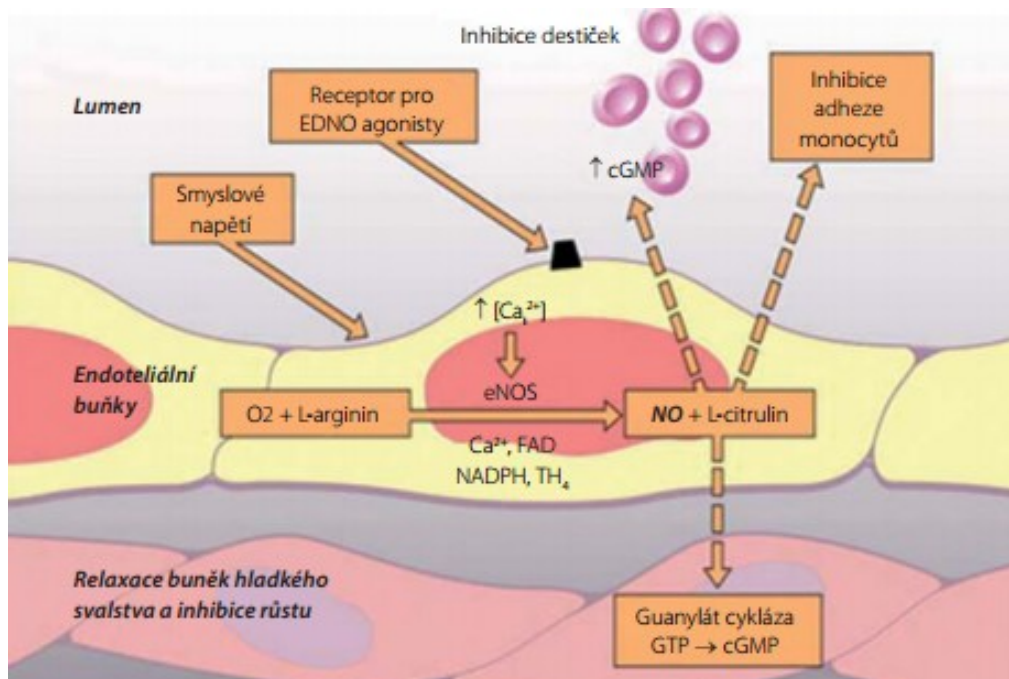
Za fyziologických podmínek zabraňují endotelové buňky trombóze pomocí různých antikoagulačních a antiagregačních mechanismů (Rajendran et al., 2013). Hlavními antiagregačními molekulami vylučovanými endotelovými buňkami jsou prostacyclin (PGI₂) a NO (Michiels, 2003). PGI₂ zvyšuje hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňkách hladké svaloviny a v trombocytech, čímž působí relaxačně, ale zejména má tlumivý vliv na patologicky zvýšenou aktivitu destiček. V prevenci trombózy se endotel uplatňuje prostřednictvím tvorby NO, který inhibuje adhezi a agregaci trombocytů cestou tvorby cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) (Karetová, 2002). Kromě toho mohou endotelové buňky uvolňovat i některé faktory indukující kontrakci např. endotelin, tromboxan A₂, angiotensin II, superoxid (O₂^{•-}) (Rajendran et al., 2013).

Endotel se rovněž podílí na fibrinolýze, a to uvolněním tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA) a urokinázy, což umožňuje transformaci plazminogenu na plazmin, který degraduje tromby štěpením fibrinové sítě. tPA se uvolňuje konstitutivně, zatímco urokináza je syntetizována pouze aktivovanými endotelovými buňkami. Je třeba poznamenat, že přirozený inhibitor aktivátoru plazminogenu typu 1 je též konstitutivně sekretován endotelovými buňkami (Michiels, 2003).

Další funkcí endotelu je zajištění integrity cévního řečiště (Karásek et al., 2004). Po aktivaci, která může být indukována cytokiny nebo následkem poranění cévy, může být rovnováha endotelových vlastností převážena ve prospěch agregace trombocytů a tvorby sraženin. Mediátory, které podporují aktivaci destiček, jsou faktor aktivující krevní destičky a von Willebrandův faktor (Michiels, 2003).

Endotel reguluje vstup pro buněčné elementy, tak i pro nebuněčné krevní komponenty. Nebuněčné komponenty využívají pro svou cestu paracelulární i transcelulární transportní mechanismy. Vstup krevních elementů, leukocytů, je realizován za pomoci adhezních molekul, které endotel exprimuje na svém povrchu (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) (Karásek et al., 2004).

Angioneogeneze řízená endotelem je zprostředkována růstovými faktory - VEGF, PDGF a TGF- β (Karetová, 2002). Tyto mitogeny stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendotelového prostoru s následnou hyperplázií intimy. Naopak velmi významným antimitogenem je NO, který inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny (Karásek et al., 2004). Schematicky funkce endotelové buňky zachycuje Obrázek 2.



Obrázek 2 Fyziologické funkce endotelové buňky (převzato z: Vrablík et al., 2011)

2.2.2. Mechanismy endotelové dysfunkce

Endotelová dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními a hemokoagulačními působky (Karásek et al., 2004).

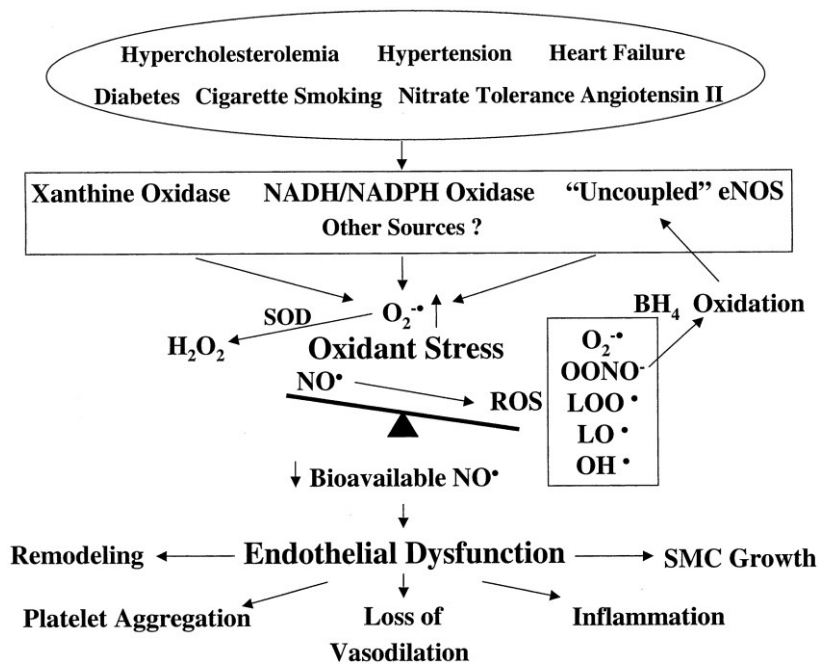
Hraje roli v časně fázi aterosklerózy, avšak podílí se i na vývoji aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy. Důležitou roli hraje také v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, renálního selhání, komplikací diabetes mellitus, sepse a dalších chorob (Karásek et al., 2004; Allen et al., 2012).

Endotel udržuje normální vaskulární tonus a tekutinu v krvi za normálních homeostatických podmínek (Hadi et al., 2005). Nicméně jak tradiční, tak nové kardiovaskulární rizikové faktory, včetně kouření, stárnutí, hypercholesterolemie (zvýšená hladina LDL – nejnebezpečnějšími jsou oxidované a glykované LDL), hypertenze, hyperglykémie a rodinné anamnézy předčasné aterosklerotické nemoci, jsou spojeny se změnami endotelové funkce (Obrázek 3). (Karásek et al., 2004; Hadi et al., 2005). Tyto faktory způsobují oxidační stres, který mění kapacitu endotelových buněk a vede k tzv. endotelové dysfunkci, která snižuje jeho schopnost udržovat homeostázu a vede k rozvoji patologických zánětlivých procesů a cévních onemocnění (Esper et al., 2006). Výsledkem je chronický zánětlivý proces doprovázený ztrátou antitrombotických

faktorů a zvýšením vazokonstrikčních a protrombotických produktů, čímž se zvyšuje riziko kardiovaskulárních příhod (Hadi et al., 2005).

Ztráta biologické dostupnosti NO (snížená syntéza nebo zvýšená degradace) je klíčovým projevem endotelové dysfunkce, která přispívá k patogenezi a klinické expresi aterosklerózy (Allen et al., 2012).

ROS, které se vytvářejí v místech zánětu a poranění mohou v nízkých koncentracích fungovat jako signální molekuly podílející se na regulaci základních buněčných aktivit. Zatímco při vyšších koncentracích mohou ROS způsobit poranění buněk a smrt. Cévní endotel, který reguluje průchod makromolekul a cirkulujících buněk z krve do tkání, je hlavním cílem oxidačního stresu a hraje klíčovou roli v patofyziologii několika vaskulárních onemocnění a poruch. Konkrétně oxidační stres zvyšuje vaskulární endotelovou propustnost a podporuje adhezi leukocytů (Hadi et al., 2005).



Obrázek 3 Mechanismy endotelové dysfunkce indukované oxidačním stresem u kardiovaskulárních onemocnění (převzato z: Cai a Harrison, 2000)

Hypercholesterolemia – hypercholesterolémie, Hypertension – hypertenze, Heart failure – srdeční selhání, Diabetes – diabetes mellitus, Cigarette smoking – kouření cigaret, Nitrate tolerance – tolerance nitrátů, Angiotensin II – angiotenzin II, Xanthine oxidase – xantinoxidáza, NADH/NADPH oxidase – nikotinamidadenindinukleotid/nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidáza, Other sources – jiné zdroje, Uncoupled eNOS – nedostatek endotelové NO syntázy, H₂O₂ – peroxid vodíku, SOD – superoxididmutáza, O₂^{•-} - superoxidový radikál, BH₄ – tetrahydrobiopterin, Oxidation – oxidace, OONO• - peroxyinitrit, LOO• - lipoperoxylový radikál, LO• - alkoxylový radikál, OH• - hydroxylový radikál, Oxidant stress – oxidační stres, NO• – radikál oxidu dusnatého, ROS - reaktivní formy kyslíku, Bioavailable NO – dostupnost oxidu dusnatého, Remodeling – přestavba, Endothelial dysfunction – endotelová dysfunkce, SMC growth - růst buněk hladkého svalstva, Platelet aggregation – agregace destiček, Loss of vasodilation – ztráta vazodilatace, Inflammation – zánět

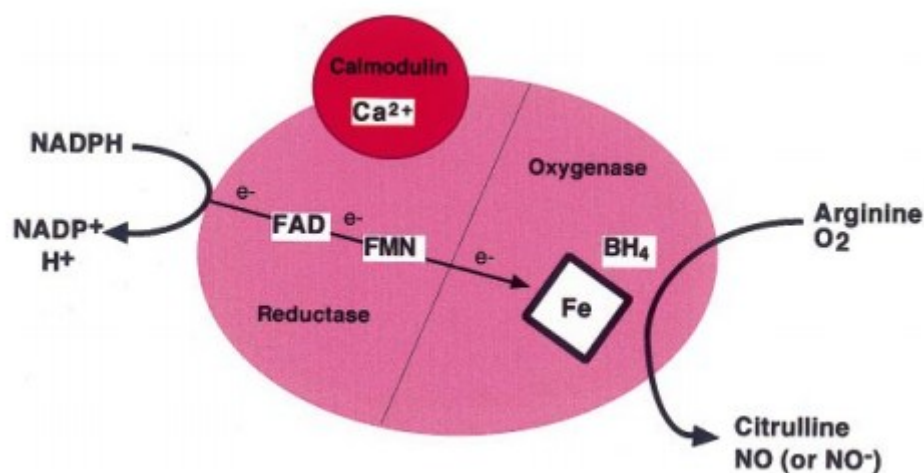
2.2.3. Oxid dusnatý

NO, biologicky aktivní, těkavý plyn, je přítomný prakticky ve všech tkáních těla. Díky své nízké molekulové hmotnosti a lipofilním vlastnostem snadno difunduje přes buněčné membrány. NO přechází přes intimu endotelu, degraduje guanosintrifosfát uvolňující cGMP, který naopak reguluje cytosolické Ca²⁺, a tím způsobuje relaxaci vláken hladkého svalstva (Esper et al., 2006).

Jeho tvorba je zprostředkována smykovým napětím krevního proudu (tzv. shear-stress), hypoxií a celou řadou lokálních působků (Karásek et al., 2004). Substrátem pro jeho tvorbu je aminokyselina L-arginin, zprostředkována působením syntázy NO, čímž

vzniká NO a L citrulin. Tato reakce vyžaduje molekulární kyslík a redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH), které působí jako kosubstráty. Proces je podporován kofaktory - flavinadeninukleotidem (FAD), flavinmononukleotidem (FMN), tetrahydrobiopterinem (BH₄), cysteinem a dalšími (Esper et al., 2006; Förstermann a Sessa, 2012) – Obrázek 4.

NO je hlavním faktorem podílejícím se na antiaterosklerotických vlastnostech endotelu. Působí jako důležitá signální molekula regulující vaskulární zánět, funkci trombocytů, angiogenezi a buněčné dýchání. Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, jako je hypercholesterolemie, diabetes mellitus, hypertenze a kouření, jsou spojeny se zhoršenou aktivitou NO (Allen et al., 2012).



Obrázek 4 Schéma tvorby NO katalyzované kofaktory a NO syntázou (převzato z: Alderton et al., 2001)

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 BH₄ a katalyzují reakci kyslíku s L-argininem za tvorby citrulinu a NO. Tok elektronů přes reduktázovou doménu vyžaduje přítomnost navázaného Ca²⁺/kalmodulinu. NADPH/NADP⁺ - nikotinamidnukleotidfosfát, Calmodulin–kalmodulin, Ca²⁺ - vápenatý ion, FAD – flavinadeninukleotid, FMN – flavinmononukleotid, Reductase –reduktázová doména, Oxygenase – oxygenázová doména, BH₄ – tetrahydrobiopterin, Fe – železo, Arginine –arginin, Citrulline – citrulin, O₂ – kyslík, NO – oxid dusnatý

2.2.3.1. NO syntáza a její izoformy

NO, známá také jako signalizační molekula, je produkována třemi izoformami NO syntázy, které se mírně liší ve fyziologické roli a profilu exprese (Shu et al., 2015). Všechny NOS váží kalmodulin a obsahují hem (Förstermann a Sessa, 2012).

nNOS

Neuronální NO syntáza (nNOS) je konstitutivně exprimována v centrálních a periferních neuronech a v některých dalších typech buněk. Funkce zahrnují synaptickou plastičnost centrálního nervového systému, centrální regulaci krevního tlaku, relaxaci hladkého svalstva a vazodilataci prostřednictvím periferních nitřergických nervů. NO produkovaný nNOS v nitřergických nervových buňkách může být považován za neobvyklý neurotransmitter, který stimuluje v jeho efektorových buňkách guanylylcyklázu citlivou na NO, čímž se snižuje tonus různých typů hladkých svalů včetně krevních cév (Förstermann a Sessa, 2012).

eNOS

eNOS je primárním endogenním zdrojem tvorby NO ve vaskulárním systému. Jeho exprese byla definována jako přímo úměrná hladinám dusitanů (NO_2^-) v plazmě, což naznačuje, že NO_2^- může odrážet kardiovaskulární biologickou dostupnost NO (Allen et al., 2012).

Funkční forma eNOS je homodimer s monomerem obsahujícím N-koncovou oxygenázu a C-terminální reduktázovou doménu spojenou centrální sekvencí vázající se na kalmodulin. Dimer eNOS je stabilizován BH_4 a zinkem, vázaným na oxygenázovou doménu (Shu et al., 2015).

Několik dalších proteinů přímo váže eNOS a moduluje její aktivitu (např. β -aktin, hemoglobin). Jedním z nejvýrazněji charakterizovaných inhibitorů eNOS aktivity je caveolin-1 (cav1). Cav1 je hlavním obalovým proteinem kaveol, což jsou stabilní struktury na plazmatické membráně. Lipidové složení kaveolárních membránových domén je rozhodující pro normální lokalizaci a aktivaci eNOS. Za normálních okolností jsou kaveoly obohaceny o cholesterol. Narušení nebo vyčerpání koncentrací cholesterolu způsobuje redistribuci eNOS do intracelulárního prostoru, a tím i sníženou produkci NO (Shu et al., 2015).

eNOS se zdá být homeostatickým regulátorem mnoha základních kardiovaskulárních funkcí (Förstermann a Sessa, 2012). Kromě vazodilatačního působení má NO významný protizánětlivý účinek na mikrovaskulaturu (Shu et al., 2015). NO uvolněný do lumen cév je silným inhibítorem agregace trombocytů a adheze k cévní stěně. Kromě ochrany před trombózou také zabraňuje uvolňování růstových faktorů z trombocytů, které stimulují proliferaci hladkého svalstva (Förstermann a Sessa, 2012). Bylo prokázáno, že nadměrná exprese eNOS inhibuje expresi adhezních molekul leukocytů a infiltraci monocytů v souvislosti s hypercholesterolémií (Shu et al., 2015). Adheze leukocytů je časnou událostí ve vývoji aterosklerózy, a proto NO může chránit před nástupem aterogeneze (Förstermann a Sessa, 2012).

iNOS

iNOS může být exprimována v mnoha buněčných typech v odezvě na lipopolysacharidy, cytokiny nebo jiné látky (Förstermann a Sessa, 2012). U aterosklerotických lézí je iNOS exprimována leukocyty a buňkami hladkého svalstva (Kuhlencordt et al., 2001). Jakmile je iNOS exprimována, je konstantně aktivní a není regulována intracelulárními hladinami Ca^{2+} (Förstermann a Sessa, 2012).

iNOS generuje velké množství NO, které mají cytostatické účinky na buňky napadené parazity. Přispívá též k patofyziologii zánětlivých onemocnění a septického šoku (Förstermann a Sessa, 2012). Mezi další prospěšné účinky patří cytoprotekce, snížená adheze leukocytů, aktivita proti destičkám, snížená vaskulární permeabilita, antioxidační aktivita a zlepšená srdeční diastolická funkce (Shah, 2000).

iNOS může přispět k tvorbě lézí zvýšením oxidačního napětí ve stěně cévy. Reaktivní meziprodukty odvozené od NO zrychlují oxidaci LDL. NO může reagovat s $\text{O}_2^{\cdot-}$ za vzniku ONOO^- , silného oxidačního činidla, s výslednou generací hydroxylových radikálů (OH^{\cdot}). ONOO^- také podporuje oxidaci LDL lipidů *in vitro* a tvorbu nitrosylátů proteinových tyrosinových zbytků u aterosklerotických lézí. Vzhledem k tomu, že $\text{O}_2^{\cdot-}$ reaguje s NO za vzniku ONOO^- rychleji, rychlost tvorby $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve stěně cévy může hluboce ovlivnit osud NO (Kuhlencordt et al., 2001).

V cévní stěně může iNOS zabraňovat zánětlivým a imunologickým reakcím a fungovat jako antioxidant, což uvádí některé studie. Je tedy nejasné, zda iNOS odráží patologické či ochranné účinky nebo obojí (Colman et al., 2006).

2.2.3.2. Dusitany a dusičnany

Až donedávna byly dusičnany (NO_3^-) a NO_2^- považovány za inertní konečné produkty metabolismu NO (Lundberg et al., 2009; Ahluwalia et al., 2016). Nicméně se objevuje nový pohled, že metabolismus NO_3^- a NO_2^- se vyskytuje v krvi a tkáních za vzniku NO a dalších bioaktivních oxidů dusíku, což představuje alternativu ke "klasické" signalizaci tvorby NO (Lundberg et al., 2009).

Snížení produkce a biologické dostupnosti NO je charakteristickým znakem mnoha hlavních chronických onemocnění. Tento nedostatek NO je způsoben hlavně dysfunkčními NO syntázami a zvýšeným zachytáváním NO za tvorby ROS. Anorganické NO_3^- a NO_2^- se objevují jako substráty pro *in vivo* nezávislou tvorbu NO (Omar et al., 2016). Bioaktivace stabilnějšího NO_3^- zahrnuje počáteční redukci na NO_2^- symbiotickými bakteriemi v dutině ústní. V roce 2001 bylo zjištěno, že NO_2^- poskytují důležitý alternativní zdroj NO, zvláště tam, kde jsou sníženy hladiny kyslíku (Lundberg et al., 2009; Lidder a Webb, 2013).

Tyto produkty endogenní tvorby NO jsou také přítomny v některém druhu stravy (především zelenině). Účinky NO_3^- a NO_2^- jsou různé a zahrnují vazodilataci, zlepšené endotelové funkce, zvýšenou mitochondriální účinnost a sníženou tvorbu ROS. Podávání NO_3^- nebo NO_2^- na zvířecích modelech kardiovaskulárních onemocnění vykazuje slibné protektivní výsledky, v současné době probíhají klinické zkoušky (Omar et al., 2016).

V důsledku své reaktivity je obtížné přímo měřit NO *in vivo*. Relativně stabilními reakčními produkty NO v lidské plazmě jsou tedy NO_3^- a NO_2^- (Allen et al., 2009).

Plazmatický NO_2^- je hlavním oxidačním produktem NO. Prokázalo se, že odráží změny v eNOS aktivitě. NO_2^- má nízkou koncentraci v plazmě, kvůli jeho potenciálu oxidace na NO_3^- , zejména v přítomnosti hemů, a proto vyžaduje relativně rychlé skladování nebo analýzu vzorku. Bylo prokázáno, že NO_2^- odráží akutní změny v biologické dostupnosti NO po chemických a fyziologických hyperstimulech (Allen et al., 2009).

Použití NO_3^- v plazmě jako markeru produkce NO pochází hlavně z jeho chemické stability a poměrně dlouhého poločasu. Avšak NO_3^- je produkován i několika jinými zdroji než je vaskulatura, včetně dietního příjmu, tvorby slin, inhalace a produkce ve střevě. Tyto vedlejší cesty tvorby NO_3^- vedou k vysokým hladinám v plazmě, které mohou ztížit stanovení změn produkce vaskulárního NO (Allen et al., 2009).

2.3. Oxidační stres

Nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů se nazývá "oxidační stres" (Birben et al., 2012; Rahman et al., 2012), který vede k tvorbě toxických ROS (Rahman et al., 2012). ROS a další volné radikály vznikají v lidském organismu neustále v průběhu řady biochemických procesů. Vysoce ROS hrají důležitou roli v antimikrobiální ochraně lidského organismu, pomáhají totiž usmrcovat mikroorganismy během fagocytózy (Hlúbik et al., 2007). Oxidační stres se podílí na poškozování bílkovin, lipidů a nukleových kyselin, na akceleraci aterosklerózy, ale také na degenerativních onemocněních a karcinogenezi (Hlúbik et al., 2007).

2.3.1. Reaktivní formy kyslíku

ROS jsou skupiny různých molekul a volných radikálů odvozených od molekulárního kyslíku. Molekulární kyslík je v základním stavu biradikál, který obsahuje dva nepárové elektrony ve vnějším plášti. Tyto elektrony mají stejný spin, a proto kyslík není příliš reaktivní. Pokud dojde k excitaci jednoho z těchto elektronů, změní se spin a kyslík se stává silným oxidovadlem – jelikož dva elektrony s opačnými spiny mohou rychle reagovat s jinými páry elektronů (Turrens, 2003).

Oxidační produkty, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , kyselina chlorná a lipidové radikály, jsou produkovány v důsledku aerobního metabolismu (Obrázek 5). Tyto molekuly jsou vysoce reaktivní s jinými biologickými molekulami a jsou označovány ROS. Za normálních fyziologických podmínek je produkce ROS vyvážena účinným systémem antioxidantů, které jsou schopné neutralizovat, a tím zabránit poškození oxidanty (Esper et al., 2006). Oxidační a antioxidační systémy jsou uvedeny v Tabulce 1.

Za patologických stavů mohou být ROS přítomny v relativním přebytku. Tento posun rovnováhy, ve prospěch oxidace, nazývaný "oxidační stres", může mít škodlivé účinky na buněčnou a tkáňovou funkci (Esper et al., 2006). Zvláště důležitou patofyziologickou událostí spojenou s ROS je oxidace lipidů, zejména LDL, což je proces, který je klíčový při tvorbě aterosklerotických lézí (Fukai et al., 2002).

Kromě generalizované oxidace vedoucí k buněčné dysfunkci, nekróze nebo apoptóze, indukují ROS také specifické posttranslační modifikace, které mění funkci důležitých buněčných proteinů a signálních cest v srdci (Ho et al., 2013).

Tabulka 1 Oxidační a antioxidační systémy (převzato a upraveno z: Esper et al., 2006)

Oxidační vedlejší produkty	Enzymatické antioxidyanty
Superoxidový radikál	Superoxiddismutáza
Peroxid vodíku	Glutation peroxidáza
Hydroxylový radikál	Kataláza
Kyselina chlorná	
Lipidové radikály	
Enzymové oxidanty	Antioxidyanty rozpustné v tucích
Xantindehydrogenázy	Vitamín E
NADPH oxidázy	β -karoten
Myeloperoxidáza	
Monoaminoxidáza	Antioxidyanty rozpustné ve vodě
NO syntázy	Vitamín C

Přehled vybraných typů ROS je uveden níže:

Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$)

$^1\text{O}_2$ není volným radikálem v pravém slova smyslu, nemá žádné páry elektronů. Excitací elektronu v molekule kyslíku dochází ke se změně spinu jednoho z vnějších elektronů a k odstranění spinové restrikce. Jeho oxidační schopnost je tak daleko vyšší než u kyslíku v základním stavu (Halliwell, 2006).

Superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Primárním ROS produkovaným v průběhu metabolismu kyslíku je $\text{O}_2^{\cdot-}$, který je vysoce reaktivní a cytotoxický (Rahman, et al., 2012). $\text{O}_2^{\cdot-}$ je prekurzorem většiny ROS a mediátorů v oxidačních řetězových reakcích. Je tvořen sledem reakcí, kde je redukován molekulární kyslík. Tento proces je zprostředkován NADPH oxidázami, které jsou lokalizované na buněčné membráně polymorfonukleárních buněk, makrofágů a endotelových buněk a oxygenázami závislými na cytochromu P450 (Dröge, 2002; Turrens, 2003), ale může vznikat i neenzymaticky (xenobiotika, mitochondriální respirační řetězec) (Turrens, 2003).

$\text{O}_2^{\cdot-}$ je převeden na mnohem méně reaktivní produkt, H_2O_2 , a to buď spontánně nebo reakcí katalyzovanou superoxiddismutázou (SOD) (Turrens, 2003). Všudypřítomné SOD

jsou tak rozhodující pro ochranu buněk před toxickými produkty aerobního respiračního vzplanutí (Rahman et al., 2012). $O_2^{\cdot-}$ sám není příliš reaktivní, a tedy ani škodlivý. Nebezpečí $O_2^{\cdot-}$ spočívá v tom, že z něj mohou vznikat mnohem škodlivější ROS (Racek a Holeček, 1999).

Dále může $O_2^{\cdot-}$ reagovat s jinými radikály jako je např. radikál oxidu dusnatého. Oxidanty pocházející z NO jsou nazývány reaktivními formami dusíku. $O_2^{\cdot-}$ může také reagovat s NO za vzniku ONOO⁻ a ten může oxidovat BH₄ - kritický kofaktor pro NO syntázu (Esper et al., 2006). Nízké koncentrace ONOO⁻ se chovají velmi podobně jako NO - mohou způsobit vazorelaxaci, snižují agregaci trombocytů a adhezi leukocytů na stěnu cévy, mají cytoprotektivní účinky a ve skutečnosti mohou působit jako donor NO. Naproti tomu vyšší koncentrace ONOO⁻ mohou být velmi toxické. Může tvořit cytotoxickou peroxynitrínovou kyselinu, způsobit toxicitu OH[•] a fragmentaci proteinů nitrací aminokyselin. Je možné předpokládat, že takové škodlivé koncentrace ONOO⁻ mohou být dosaženy u aterosklerotických lézí (Wever et al., 1998).

$O_2^{\cdot-}$ podléhá tzv. Haber-Weissově reakci a Fentonově reakce, při které vzniká OH[•]. Ten je nejreaktivnějším kyslíkovým radikálem schopným přímé oxidace lipidů, uhlovodíkových řetězců, proteinů i DNA (Chmátalová a Skoumalová, 2014).

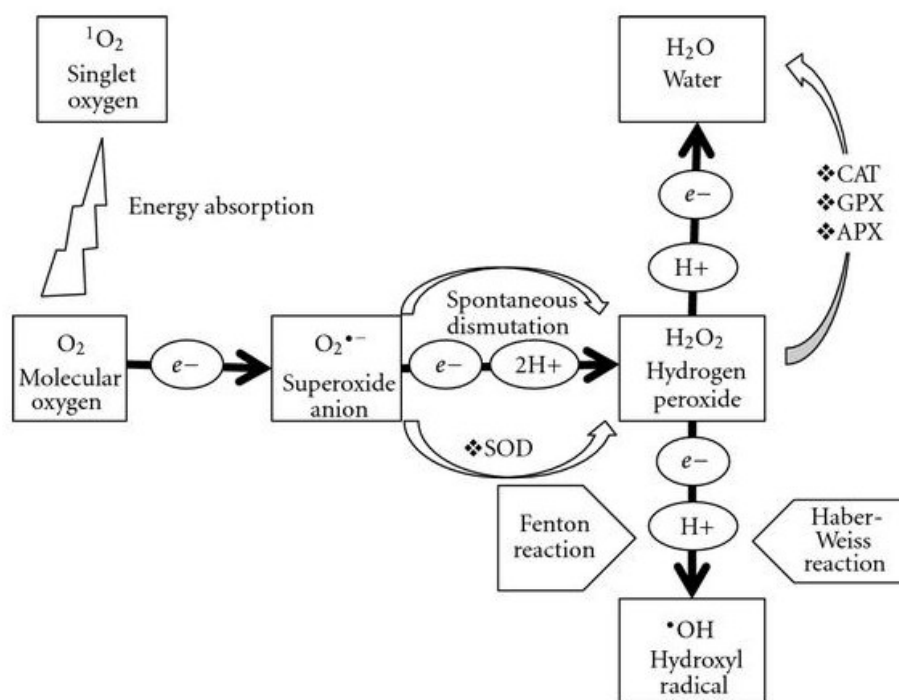
Hladiny $O_2^{\cdot-}$ se v krevních cévách zvyšují v mnoha patofyziologických stavech, včetně hypertenze, aterosklerózy, diabetes mellitus, hyperhomocysteinémie, srdečního selhání, sepse, subarachnoidálního krvácení a Alzheimerovy choroby, stejně jako během stárnutí. Některé studie naznačují, že $O_2^{\cdot-}$ nebo jiné ROS inaktivují NO, což přispívá k patologickému poškození cévní funkce (Faraci a Didion, 2004). $O_2^{\cdot-}$ v extracelulárním prostoru (uvolněném ze zánětlivých a vaskulárních buněk nejspíše prostřednictvím NADPH oxidázy) významně přispívá k oxidačnímu stresu v cévní stěně (Qin et al., 2008).

Peroxid vodíku (H₂O₂)

H₂O₂ vzniklý dismutací, může být plně redukován na vodu nebo částečně redukován na OH[•] (Turrens, 2003). H₂O₂ je signalizační molekulou a regulátorem genové exprese a může být důležitým mediátorem hypertrofie cévního svalu. Může aktivovat vybrané transkripční faktory a může také fungovat jako endotelový hyperpolarizační faktor v některých cévách (Faraci a Didion, 2004).

Ačkoliv H₂O₂ nemá nepárový elektron, je silným oxidačním činidlem schopným oxidace velkého množství biomolekul (Chmátalová a Skoumalová, 2014).

V kombinaci s některými přechodnými kovy (železo nebo měď), může H_2O_2 reagovat za vzniku OH^\bullet , a tím podporovat buněčné poškození pomocí Fentonovy reakce. Účinky zprostředkované H_2O_2 jsou regulovány aktivitou různých glutationových peroxidáz nebo katalázy (CAT) (Faraci a Didion, 2004).



Obrázek 5 Generování ROS (převzato z: Sharma et al., 2012)

Aktivace O_2 nastává dvěma různými mechanismy. Redukce O_2 vede k tvorbě $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 a OH^\bullet , zatímco přenos energie na O_2 vede k tvorbě 1O_2 . $O_2^{\bullet-}$ je snadno dismutován na H_2O_2 , buď neenzymaticky nebo reakcí katalyzovanou SOD. H_2O_2 je převeden katalázou, glutation peroxidázou a askorbátperoxidázou na H_2O . Singlet oxygen (1O_2) – singletový kyslík, Energy absorption – absorpce energie, Molecular oxygen (O_2) – molekulární kyslík, Superoxid anion ($O_2^{\bullet-}$) – superoxidový anion, Spontaneous dismutation – spontánní dismutace, Hydrogen peroxide (H_2O_2) – peroxid vodíku, Water (H_2O) – voda, H^+ – vodíkový iont, SOD – superoxidodismutáza, Fenton reaction – Fentonova reakce, HaberWeiss reaction – Haber-Weissova reakce, Hydroxyl radical (OH^\bullet) – hydroxylový radikál, Water – voda, CAT – kataláza, GPx – glutation peroxidáza, APx – askorbátperoxidáza

2.3.2. Buněčné účinky ROS

ROS jsou při nízké nebo střední koncentraci životně důležité pro lidské zdraví. Jsou nezbytné pro proces dozrávání buněčných struktur a mohou se podílet na obraně hostitele. Fagocyty totiž uvolňují volné radikály s cílem zničit patogenní mikroorganismy (Pham-Huy et al., 2008).

Nejsou pouze toxickými vedlejšími produkty buněčného metabolismu, ale podílejí se na buněčné signalizaci, funkci buněk a přispívají k dalším klíčovým funkcím, jako je regulace aktivity transkripčních faktorů a exprese některých genů. Naproti tomu vyšší hladiny ROS přispívají k vaskulární dysfunkci a abnormálnímu růstu buněk, včetně hypertrofie cévního svalu (Faraci a Didion, 2004).

Snad nejrozšířenější biologické účinky ROS jsou však ty, které se vyskytují, když jsou buněčné antioxidační obrany vyčerpány a ROS reagují přímo s buněčnými lipidy, bílkovinami a DNA, což způsobuje poškození buněk a smrt. Například peroxidace vede k poškození buněčné membrány. Stejně tak ROS mohou přispět k mutagenезi DNA, což má za následek přerušování řetězce, zesílení proteinů a DNA. Modifikace proteinů pomocí ROS může způsobit inaktivaci kritických enzymů a může indukovat denaturaci, která činí proteiny nefunkčními (Giordano, 2005).

2.3.3. Zdroje ROS

Volné radikály jsou generovány buď z endogenních, nebo exogenních zdrojů. Endogenní volné radikály jsou generovány v důsledku aktivace imunitních buněk, zánětu, duševního stresu, nadměrného cvičení, ischemie, infekce, rakoviny a stárnutí (Kabel, 2014). K dějům endogenně produkujícím volné radikály patří například respirace mitochondrií, činnost NADPH oxidázy, xantinoxidázy, NO syntázy (Elahi et al., 2009), lipoxygenázy a myeloperoxidázy (Vogiatzi, 2009). Exogenní volné radikály jsou výsledkem znečištění ovzduší a vody, kouření cigaret, alkoholu, těžkých kovů, určitých léků a ozařování (Birben et al., 2012; Rahman et al., 2012; Kabel, 2014).

Přehled vybraných endogenních zdrojů ROS a volných radikálů je uveden níže:

NADH/NADPH oxidáza

Hlavním zdrojem ROS ve vaskulárních tkáních je právě membránově vázaná NADPH oxidáza (Fukai et al., 2002). Činnost vaskulární NADH/NADPH oxidázy je regulována cytokiny, hormony a mechanickými silami, o kterých je známo, že se podílejí na patogenezi vaskulárních onemocnění. Stimulace buněk hladkého svalstva cév angiotensinem II, trombinem, růstovým faktorem trombocytů, nádorovým růstovým faktorem- α a lakosylceramidem zvyšuje aktivitu tvorby cévních ROS a aktivitu NADH/NADPH oxidázy (Cai a Harrison, 2000).

Xantin oxido-reduktáza

Xantin oxido-reduktáza existuje ve dvou vzájemně proměnlivých formách, a to jako xantindehydrogenáza nebo xantinoxidáza. První forma redukuje NAD^+ , zatímco druhá forma reaguje s molekulárním kyslíkem, což vede k tvorbě $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Xantinoxidáza generuje ROS cestou metabolismu purinů a podílí se na vyvolání endotelové dysfunkce (Cai a Harrison, 2000; Elahi et al., 2009). Tento enzym existuje v plazmatických a endotelových buňkách, nikoliv však v buňkách hladkého svalstva (Singh a Jialal, 2006; Vogiatzi et al., 2009). V purinovém katabolismu katalyzuje xantinoxidáza oxidační hydroxylaci hypoxantinu až na kyselinu močovou, která je silným antioxidantem a zachytávačem volných radikálů (Elahi et al., 2009).

Lipoxygenáza

Dalším důležitým zdrojem produkce ROS v cévní stěně jsou lipoxygenázy. Tyto dioxygenázy oxidují polynenasycené mastné kyseliny na deriváty hydroperoxy mastných kyselin (Singh a Jialal, 2006). Vytvářejí skupinu biologicky aktivních lipidů, jako jsou prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny, které se podílejí na zánětlivých reakcích a zvyšují permeabilitu cév. V experimentálních modelech 15-lipoxygenáza indukuje oxidaci LDL enzymatickými a neenzymatickými reakcemi (Vogiatzi et al., 2009).

Myeloperoxidáza

Myeloperoxidáza (MPO) je enzym produkovaný aktivovanými leukocyty (Vogiatzi et al., 2009). Během metabolického vzplanutí MPO produkuje kyselinu chlornou z H_2O_2 a chloridového aniontu. Tyto dva produkty jsou cytotoxické a neutrofilny je používají k usmrcení bakterií a jiných patogenů. Také účinkem H_2O_2 oxiduje tyrosin na tyrosylový radikál (Jabor et al., 2008). Samotné tyrosylové radikály se pak mohou účastnit sekundárních oxidačních reakcí, včetně oxidace LDL (Singh a Jialal, 2006).

MPO je tedy důležitá pro antimikrobiální působení, ale také se podílí na oxidaci bílkovin a lipidů, včetně LDL a fosfolipidů. Zvýšené cirkulující hladiny MPO indikují endotelovou dysfunkci (Ho et al., 2013).

Přehled vybraných exogenních zdrojů ROS a volných radikálů je uveden níže:

Cigaretový kouř

Cigaretový kouř obsahuje mnoho oxidantů a volných radikálů a organických sloučenin, jako jsou $O_2^{\cdot-}$ a NO. Inhalace cigaretového kouře do plic také aktivuje některé endogenní mechanismy, mezi něž patří akumulace neutrofilů a makrofágů, které dále zvyšují poškození oxidanty (Birben et al., 2012).

Expozice ozonu

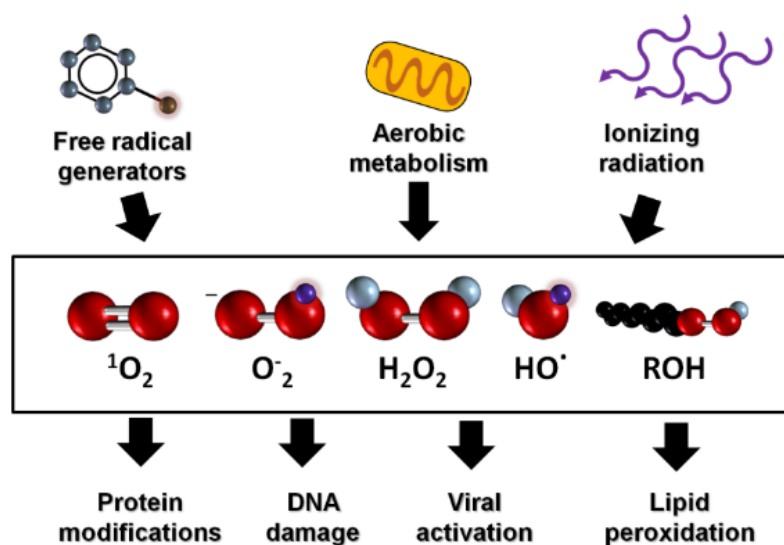
Expozice ozonu může způsobit peroxidaci lipidů a vyvolat tok neutrofilů do epitelu dýchacích cest. Krátkodobá expozice ozonu také způsobuje uvolňování zánětlivých mediátorů - MPO, eozinofilního kationtového proteinu a také laktátdehydrogenázy a albuminu (Birben et al., 2012).

Ionizující záření

V přítomnosti kyslíku převádí ionizující záření OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$ a organické zbytky na H_2O_2 a organické hydroperoxy. Tyto hydroperoxidové sloučeniny pak reagují s kovovými ionty (Fe a Cu) (Birben et al., 2012).

Ionty těžkých kovů

Železo, měď, kadmium, rtuť, nikl, olovo a arzen mohou také vyvolat tvorbu reaktivních radikálů a způsobit buněčné poškození prostřednictvím peroxidace lipidů a reakce s nukleárními proteiny a DNA. Jedním z nejdůležitějších mechanismů tvorby volných radikálů zprostředkovaných kovem je Fentonova reakce. $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 mohou interagovat s železem a mědí tzv. Haber-Weissovou a Fentonovou reakcí za vzniku OH^{\cdot} (Birben et al., 2012).



Obrázek 6 Některé zdroje a důsledky oxidačního stresu (převzato z: Leiva et al., 2015)
Free radical generators – generátory volných radikálů, Aerobic metabolism – aerobní metabolismus, Ionizing radiation – ionizační záření, $^1\text{O}_2$ – singletový kyslík, O_2^- - superoxidový radikál, H_2O_2 – peroxid vodíku, HO^\bullet - hydroxylový radikál, ROH – alkohol, Protein modification – modifikace proteinů, DNA damage – poškození DNA, Viral activation – aktivace virů, Lipid peroxidation - peroxidace lipidů

2.3.4. Poškození biomolekul

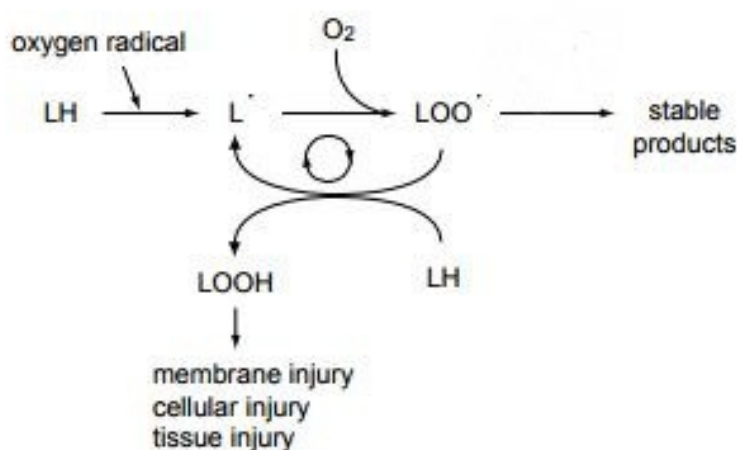
Peroxidace lipidů

Snadným terčem oxidačního poškození jsou polyneenasycené mastné kyseliny, protože obsahují dvojně vazby. Peroxidace membránových lipidů vede ke ztrátě membránové fluidity a elasticity, narušení buněčné funkce a dokonce i k prasknutí buněk (Chmátalová a Skoumalová, 2014).

Lipoperoxidace je radikálová řetězová reakce a probíhá ve třech stupních - iniciace, propagace a terminace. Iniciační reakce zahajuje reakční kaskádu a spočívá v ataku uhlovodíkového řetězce reaktivní sloučeninou, odnětí vodíkového atomu jedné z metylenových skupin řetězce ($-\text{CH}_2-$) a vytvoření nového radikálu ($-\text{CH}^\bullet-$). Radikál způsobí intramolekulární přesmyk za vzniku konjugovaného dienu. Tento dien není příliš stálý a reaguje s kyslíkem za vzniku peroxy radikálu ($-\text{COO}^\bullet$), který je velmi reaktivní a může odejmout vodíkový atom z jiné mastné kyseliny, a tím přispět k propagaci řetězové reakce. Konečným krokem jsou terminační reakce, při kterých vznikají lipoperoxydy (Chmátalová a Skoumalová, 2014) – Obrázek 7.

Produkty lipidové peroxidace, malondialdehyd (MDA), isoprostany a 4-hydroxynonenal, jsou považovány za nejdůležitější biomarkery oxidačního stresu v tkáních (Zegarac, 2015). Tyto sloučeniny jsou oproti volným radikálům stabilní, mohou difundovat od místa svého vzniku a vystupovat jako „druhý posel“ oxidačního poškození a vyvolat primární reakci v místech, které původně oxidačním stresem zasažené nebyly (Chmátalová a Skoumalová, 2014).

MDA je reaktivní karbonylová sloučenina, která je mutagenní i karcinogenní. Reaguje s DNA za tvorby DNA aduktů, u nichž se předpokládá, že významně přispívají k rakovině. Isoprostany jsou prostaglandinové látky odvozené od kyseliny arachidonové vyvolané volnými radikály, které mají silné biologické účinky (Zegarac, 2015).



Obrázek 7 Řetězová reakce způsobující peroxidaci lipidů (převzato z: Yoshikawa a Naito, 2002)

LH – mastná kyselina fosfolipidu, Oxygen radical – radikál kyslíku, L• - alkylový radikál, O₂ – kyslík, LOO• - lipoperoxylový radikál, Stable products – stabilní produkty, LOOH – hydroperoxid, Membrane injury – poškození membrány, Cellular injury – poškození buněk, Tissue injury – poškození tkání

Poškození proteinů

Proteiny jsou v organismu nejčastějším terčem oxidačního poškození díky svému velkému zastoupení. K poškození dochází na všech strukturních úrovních – od primární struktury až po kvartérní. Poškození může být způsobeno buď přímo reaktivními sloučeninami, nebo reakcí s reaktivními produkty oxidačního poškození (Chmátalová a Skoumalová, 2014).

Oxidace proteinů může způsobit fragmentaci aminokyselinových zbytků, tvorbu zesíťování řetězců a oxidaci proteinového řetězce, což nakonec vede ke ztrátě funkce.

Poškozené proteiny ovlivňují intracelulární dráhy a přispívají k různým poruchám a chorobám. Pokud proteolytické mechanismy odpovědné za degradaci proteinu nefungují správně, v buňce se hromadí pozměněné bílkoviny, které mohou přispívat k rozvoji patologických stavů (Zegarac, 2015).

Následky oxidační změny proteinů jsou nevratné a ovlivňují fyziologické funkce proteinů. Může docházet k poruchám jejich enzymatických, strukturních a vazných vlastností, k ovlivnění exprese proteinů a jejich metabolismu, dysregulaci buněčné signalizace (Chmátalová a Skoumalová, 2014).

Modifikace DNA

Oxidačnímu poškození podléhá RNA i DNA kyselina. Nukleové kyseliny jsou nejčastějším terčem hydroxylových radikálů a reakcí vznikají různě modifikované báze či cukerné zbytky (Chmátalová a Skoumalová, 2014). Oxidační poškození DNA způsobuje změny v DNA bázích. Pokud tyto změny nejsou opraveny, dochází ke genetickým defektům. Vzhledem k tomu, že guanin je obzvláště náchylný k oxidaci, tradičně jako biomarker oxidačního poškození DNA je využíván 8-hydroxydeoxyguanosin (Zegarac, 2015).

2.3.5. Antioxidanty

Lidské tělo je vybaveno řadou antioxidantů, které slouží k vyvažování vlivu oxidantů. Lze je rozdělit do 2 kategorií: enzymatické a neenzymatické (Birben et al., 2012).

Mezi hlavní enzymatické antioxidanty patří SOD, CAT a glutathion peroxidáza (GPx). Kromě těchto hlavních enzymů obsahuje naše tělo další antioxidanty, mezi něž patří hemoxygenáza-1 (HO-1) a redoxní proteiny. Neenzymatické antioxidanty zahrnují sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou vitamíny (vitamíny C a E), β -karoten, kyselina močová a glutathion (Birben et al., 2012), které zejména chrání plazmatické lipidy před peroxidací, odstraňují $O_2^{\cdot-}$ a hrají roli při recyklaci vitamínu E (Esper et al., 2006).

2.3.5.1. Superoxiddismutáza-3

SOD-3, obsahující měď a zinek, je primárním antioxidačním enzymem vylučovaným do extracelulárního prostoru (Qin et al., 2008; Weydert a Cullen, 2010). Je distribuována v extracelulární matrix mnoha tkání (Weydert a Cullen, 2010), menším podílem

i v plazmě a extracelulárních tekutinách (Fukai a Ushio-Fukai, 2011). Je vysoce omezena na specifické typy buněk a tkání, jako jsou krevní cévy, plíce, srdce, ledviny, plazma, lymfa, ascites a cerebrospinální tekutina (Weydert a Cullen, 2010). SOD-3 je lokalizována v celé stěně cévy, zejména mezi endotelem a cévním svalem (Fukai a Ushio-Fukai, 2011). Její aktivita tvoří téměř polovinu celkové aktivity SOD v lidské aortě (Qin et al., 2008).

Ve většině tkání je SOD-3 homotetramer složený ze dvou disulfidově vázaných dimerů (Fukai a Ushio-Fukai, 2011). Na rozdíl od ostatních SOD má afinitu k proteoglykanům (heparin sulfátu) umístěným na povrchu buněk a v extracelulární matrix, díky své doméně, která váže heparin. Doména vázající heparin je důležitá, protože zprostředkovává její vazbu na buňky (Weydert a Cullen, 2010).

Účinky SOD-3

SOD katalyzuje dismutaci $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 a molekulární kyslík. Bylo prokázáno, že SOD je zapojena do aterogeneze inhibicí oxidačních změn způsobených $O_2^{\cdot-}$ (Fukai a Ushio-Fukai, 2011).

Několik poznatků naznačuje, že SOD-3 může hrát roli při ateroskleróze. Některé studie naznačují, že enzym je hojně přítomen v cévní stěně a syntetizován v aterosklerotických lézích buňkami hladkého svalstva a makrofágy. Zajímavé je, že SOD-3 je exprimována v iNOS pozitivních lézích bohatých na makrofágy kolokalizovaných epitopy charakteristickými pro oxLDL a proteiny modifikované ONOO⁻. Je tedy možné předpokládat, že vysoká exprese SOD-3 v arteriální stěně může zabránit nejen škodlivým účinkům $O_2^{\cdot-}$, ale také tvorbě ONOO⁻ (Fukai a Ushio-Fukai, 2011).

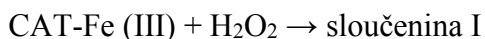
Díky své extracelulární poloze hraje SOD-3 rozhodující roli v prevenci destrukce NO uvolněného z endotelu. SOD-3 reguluje endotelovou funkci a NO-zprostředkovanou signalizaci inhibicí oxidační inaktivace. Četné patofyziologie (ateroskleróza, stárnutí, kouření cigaret a diabetes mellitus) jsou spojeny s poklesem produkce/biologické aktivity NO odvozeného z endotelu. Ztráta NO vede k poklesu exprese SOD-3, protože eNOS je pozitivní regulátor pro její expresi (Fukai a Ushio-Fukai, 2011).

2.3.5.2. Kataláza

Kataláza je tetramerní hemoprotein o molekulové hmotnosti 240 kDa obsahující 4 molekuly NADPH. V lidském organismu nacházíme nejvyšší aktivitu v mitochondriích a peroxisomech hepatocytů a v cytoplazmě erytrocytů. U jiných živočišných druhů může být distribuce katalázy ve tkáních různorodá (Racek a Holeček, 1999).

Kataláza generuje molekulární kyslík jako vedlejší produkt oxidace H_2O_2 v procesu označovaném jako disproporcionace (Heck et al., 2010), čímž brání tvorbě hydroxylového zbytku (Ho et al., 2004). Zajišťuje štěpení peroxidu dvěma různými způsoby: katalatickou aktivitou ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) a peroxidační aktivitou ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow \text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$) (Ho et al., 2004; Kabel, 2014).

Konverze H_2O_2 je dvoustupňový proces, při kterém katalázový hem Fe^{3+} redukuje jednu molekulu H_2O_2 na vodu a vytváří kovalentní Fe^{4+}O oxyferrylový produkt a porfyrinový kationtový radikál. Tento reakční meziprodukt, označovaný jako sloučenina I, pak oxiduje druhou molekulu H_2O_2 , která tvoří molekulární kyslík a další molekulu vody (viz níže). Peroxidační aktivita katalázy vyplývá ze schopnosti sloučeniny I oxidovat alkoholy na aldehydy a vodu (rovnice v předcházejícím odstavci), když hladiny H_2O_2 nejsou dostatečné pro dokončení katalytického cyklu (Heck et al., 2010).



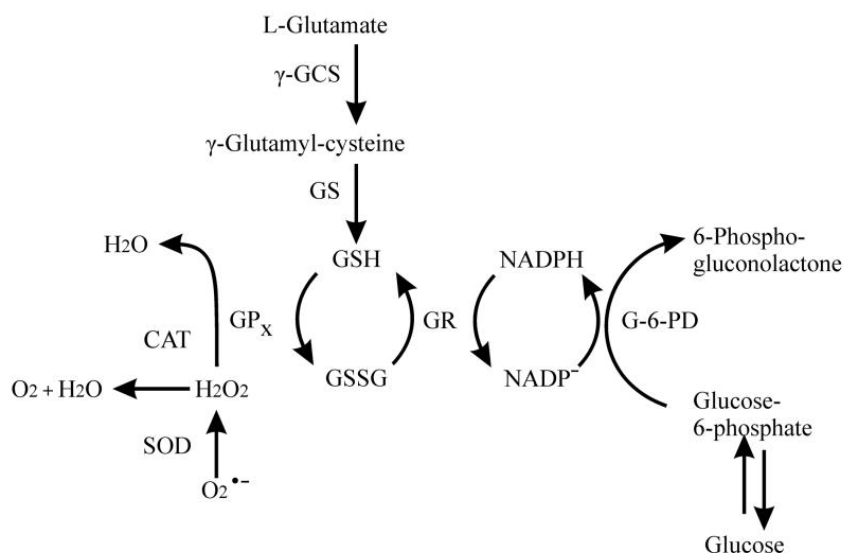
Aktivita tohoto enzymu závisí na strukturní konformaci tří základních domén - hemové části v aktivním místě, redukované NADPH vázané ve vazebné doméně a komplexní sekundární struktury tvořené propletením dlouhých peptidových smyček během tetramerizace (Heck et al., 2010).

Význam pro organismus je tedy jasný, chrání buňky před toxickým vlivem H_2O_2 . Navazuje tak vlastně (spolu s peroxidázami) na činnost SOD. Pokud je vazebné místo enzymu pro NADPH obsazeno, přeměňuje kataláza i H_2O_2 v nízkých koncentracích (Racek a Holeček, 1999).

2.3.5.3. Glutathion peroxidáza

Existuje pět isoenzymů GPx, z nichž GPx1 je považována za hlavní enzym zodpovědný za odstranění H_2O_2 . Cytosolická GPx1 je selenoprotein, poprvé popsán jako

enzym, který chrání hemoglobin před oxidační degradací v červených krvinkách. Jak je patrné z Obrázku 8, GPx vyžaduje několik sekundárních enzymů (glutathion-reduktázu a glukosa-6-fosfát dehydrogenázu) a kofaktory (redukovaný glutathion, NADPH a glukosa-6-fosfát). Nadměrná exprese tohoto enzymu chrání buňky před oxidačním poškozením - potlačuje apoptózu indukovanou H_2O_2 (Weydert a Cullen, 2010).



Obrázek 8 Schéma antioxidačních enzymů (převzato z: Weydert a Cullen, 2010)

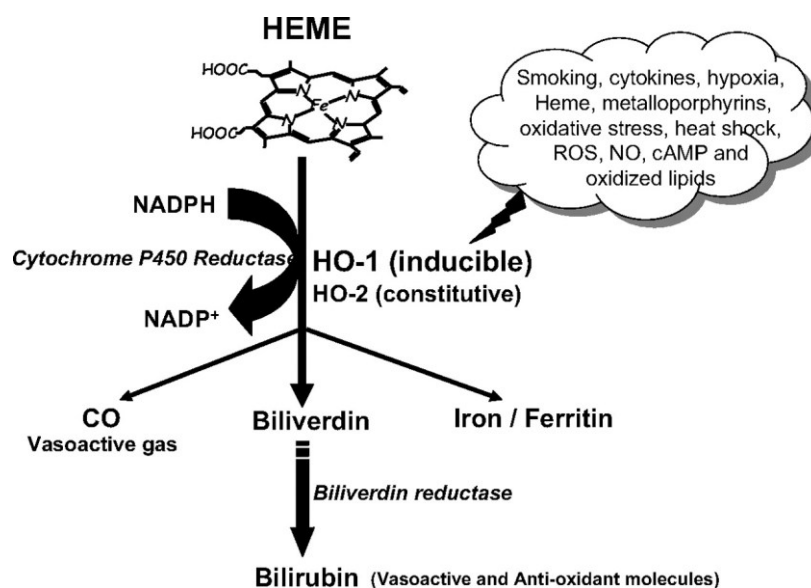
Existují tři hlavní typy primárních intracelulárních antioxidačních enzymů v savčích buňkách - SOD, kataláza a peroxidáza. SOD konvertují $O_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 , zatímco kataláza a peroxidázy převádí H_2O_2 na vodu. GPx vyžaduje několik sekundárních enzymů, jako jsou glutathionreduktáza, glukosa-6-fosfát dehydrogenáza a kofaktory (glutathion, NADPH a glukosa-6-fosfát). Pokud je GR inhibována, buňky nemohou odstranit H_2O_2 přes systém glutathion peroxidázy a zvyšovat hladiny glutathiondisulfidu. Pokud dojde k inhibici syntézy glutathionu inhibicí glutathionsyntázy nebo γ -glutamylcystein syntetázy, glutathion bude vyčerpán a GPx nebude schopna odstranit H_2O_2 . Pokud je inhibována kataláza, buňky také nemohou odstranit H_2O_2 . L-glutamate – kyselina glutamová, γ -GCS – γ -glutamylcystein syntetáza, γ -glutamylcysteine – γ -glutamylcystein, GS – glutathionsyntáza, GSH – glutathion, GSSG – glutathiondisulfid, GPx- glutathion peroxidáza, H_2O_2 – peroxid vodíku, CAT – kataláza, H_2O – voda, O_2 – kyslík, $O_2^{\bullet-}$ -superoxidový radikál, SOD–superoxiddismuzáza, GR – glutathionreduktáza, NADPH/NADP -nikotinamadenindinukleotidfosfát, 6-phosphogluconolactone – 6-fosfogluconolakton, G-6-PD - glukosa-6-fosfátdehydrogenáza, glucose-6-phosphate - glukosa-6-fosfát, Glucose – glukosa

2.3.5.4. Hemoxygenáza-1

HO-1 je indukovatelná izoforma enzymu štěpícího hem na železo, oxid uhelnatý (CO) a biliverdin, který je následně konvertován na bilirubin cytosolickým enzymem biliverdinreduktázou (Abraham a Kappas, 2008; Idriss et al., 2008). Tyto produkty

mohou mít fyziologické i patologické funkce, například při ochraně před oxidačním stresem, který je důležitý v patofyziologii několika kardiovaskulárních onemocnění (Idriss et al., 2008).

V systému savců byly identifikovány dvě odlišné HO izoformy. Ve srovnání s HO-2, která je konstitutivně exprimována, je HO-1 stresově reaktivní protein, který je vysoce indukován mnoha molekulami, včetně cytokinů, endotoxinu, těžkých kovů, NO a jeho vlastního substrátového hemu (Abraham a Kappas, 2008; Wang a Chau, 2010).



Obrázek 9 Schematické znázornění degradační cesty hemu (převzato z: Abraham a Kappas, 2008)

HO-1/HO-2 degraduje hem za vzniku ekvimolárních množství CO, biliverdinu a železa. Biliverdin je konvertován na bilirubin cytosolickým enzymem biliverdinreduktázou. Vzniklé železo má za následek zvýšení hladin feritinu. HO-2 je konstitutivní enzym, zatímco HO-1 je indukovatelná těžkými kovy, cytokiny, UV zářením, oxidačním stresem, zánětlivými cytokiny a mnoha léky. Heme – hem, Smoking – kouření, cytokines – cytokiny, Hypoxia – hypoxie, Metalloporphyrins – metaloporfyriny, Oxidative stress – oxidační stres, Heat shock – tepelný šok, ROS – reaktivní formy kyslíku, NO – oxid dusnatý, cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, Oxidized lipid- oxidované lipidy, NADPH/NADP⁺- nikotinamidadenindinukleotidfosfát, Cytochrome P450 reductase – cytochrom P450 reduktáza, HO-1 – hemoxygenáza-1, HO-2 – hemoxygenáza-2, constitutive – konstitutivní, inducible - indukovatelný, CO – oxid uhelnatý, Vasoactive gas - vazoaktivní plyn, Iron – železo, Ferritin – feritin, Biliverdin reductase – biliverdinreduktáza, Vasoactive and antioxidant molecules - vazoaktivní a antioxidační molekuly

Účinky HO-1

Řada studií zaznamenala důležitost HO-1 v různých klinických onemocněních, včetně onemocnění koronární arterie, srdeční hypertrofie, diabetes mellitus, ischemického/reperfúzního poškození, aterosklerózy a rakoviny (Wang a Chau, 2010).

Vedle své dobře definované úlohy při katabolismu hemu a erytrocytů, hraje HO-1 také důležitou funkci v různých stavech spojených s buněčným stresem (zánět, ischemie, hypoxie, hyperoxie, hypertermie nebo expozice záření). Během uplynulého desetiletí ukázaly přesvědčivé důkazy, že indukce HO-1 představuje důležitý obranný mechanismus proti dalšímu oxidačnímu poškození v tkáních a buňkách. K tomu dochází na základě protizánětlivých a antioxidačních vlastností CO, biliverdinu a následného metabolitu - bilirubinu (Abraham a Kappas, 2008; Wang a Chau, 2010; Araujo et al., 2012).

Několik důkazů naznačuje, že biliverdin a bilirubin mohou být součástí strategie obrany buněk v reakci na oxidační stres. Obě molekuly jsou přirozenými antioxidanty a vysoké hladiny bilirubinu v séru jsou spojené se snižováním hladin kyslíkových radikálů a s inhibičními účinky na oxidaci LDL. Dále byl prokázán inhibiční účinek na proteinkinázu C a fosforylační aktivitu proteinu, které vedou k inhibici proaterogenních faktorů. Bilirubin také poskytuje kardioprotekci proti reperfúznímu poškození, jako je potlačení oxidace lipidových membrán (Idriss et al., 2008).

CO má fyziologickou roli při regulaci vaskulárního tonusu, podobně jako NO. Modely hlodavců naznačují, že nadprodukce CO může narušit tvorbu rozpustné guanylátcyklázy vyvolanou NO, což vede k inhibici růstu cGMP v aortách transgenních myší, které nadměrně exprimovaly HO-1, a k potenciální ochraně před akutní hypertenzí. CO může také omezit vývoj vaskulárních onemocnění kvůli účinkům na proliferaci a smrt buněk hladkého svalstva (Idriss et al., 2008).

Je známo, že železo vede k tvorbě ROS, což může mít za následek poškození různých buněčných komponent. Železo může být integrováno do fosfolipidové dvojvrstvy a způsobit oxidaci buněčných membránových složek. Snad nejznámější z těchto reakcí je Fentonova reakce, která vytváří OH[•]. Zdá se, že zvýšená koncentrace železa vyvolaná aktivitou HO-1 způsobuje zároveň zvýšenou syntézu feritinu, který je pro buňky silným oxidantem (Abraham a Kappas, 2008). Zvýšení intracelulárního feritinu prostřednictvím HO-1 snižuje cytotoxické účinky hemu a H₂O₂ ve vaskulárních endotelových buňkách

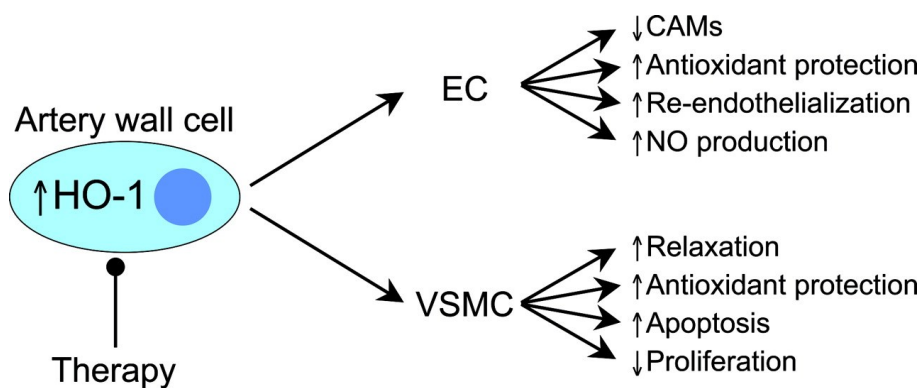
a může chránit proti ischemicko-reperfúznímu poškození díky jeho cytoprotektivním účinkům na endotel (Idriss et al., 2008).

Nicméně všechny vedlejší produkty HO reakce, i když jsou potenciálně cytoprotektivní, mohou být také cytotoxické. Bilirubin je silným neurotoxinem, stejně jako CO. Navíc tato reakce uvolňuje železo, které může interagovat s buněčnými oxidanty. Transfekce pomocí inaktivního mutantního proteinu HO-1 vede k cytoprotekci proti chemicky indukovanému oxidačnímu stresu (Lin et al., 2007).

U buněk hladkého svalstva cév vyvolává indukce HO-1 apoptózu a inhibuje proliferaci a migraci. Naproti tomu nadměrná exprese HO-1 v endotelových buňkách chrání před apoptózou a podporuje proliferaci. Tyto zvýšené aktivity HO-1 se promítají do ochrany před aterosklerotickým vaskulárním onemocněním (Wu et al., 2006).

Endotelová dysfunkce se podílí na tvorbě lézí podporou jak raného, tak pozdního mechanismu aterosklerózy, včetně vyšší exprese adhezních molekul, zvýšené sekrece chemokinů a adheze leukocytů, zvýšené propustnosti buněk, zvýšené oxidace LDL, aktivace destiček, zpracování cytokinů a proliferace buněk hladkého svalstva a migrace (Hadi et al., 2005; Abraham a Kappas, 2008). Nadměrná exprese HO-1 endotelem významně snižuje produkci mediátorů zánětu a reverzibilní pokles eNOS. Kromě toho nadměrná exprese HO-1 také zlepšuje zhoršené vazodilatační odpovědi aortálních segmentů vystavených oxidovaným LDL (Kawamura et al., 2005; Abraham a Kappas, 2008).

Dále je HO-1 proteinem tepelného šoku a také stresovým proteinem indukovaným několika látkami, které způsobují oxidační stres, a je také považován za klíčového hráče ve vývoji tolerance v reakci na NO_3^- (Abraham a Kappas, 2008).



Obrázek 10 Způsoby ochrany buněk arteriální stěny zprostředkované HO-1 (převzato z: Stocker a Perrella, 2006)

V endotelových buňkách HO-1 poskytuje ochranu (1) sníženou expresí buněčných adhezních molekul, (2) zvýšením antioxidantní ochrany, (3) podporou růstu buněk a opětovnou endotelizací, (4) zvýšením produkce NO v důsledku zvýšeného počtu endotelových buněk. V buňkách hladkého svalstva HO-1 poskytuje ochranu (1) zvýšenou relaxací, (2) zvýšením antioxidantní ochrany, (3) zvýšením apoptózy, (4) snížením proliferace. Artery wall cell – buňky stěny tepny, Therapy – terapie, EC – endotelové buňky, VSMC – buňky hladkého svalstva, CAMs – adhezní molekuly, Antioxidant protection – antioxidantní ochrana, Re-endothelialization – opětovná endotelizace, NO production – produkce oxidu dusnatého, Relaxation – relaxace, Apoptosis – apoptóza, Proliferation – proliferace

2.4. Ateroskleróza

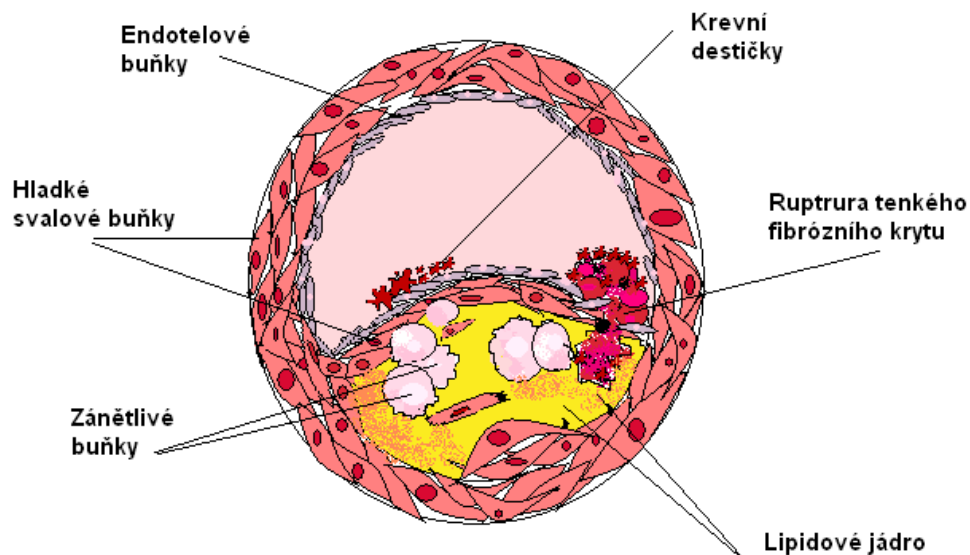
Ateroskleróza je hlavní příčinou kardiovaskulárních onemocnění. Objevuje se již v dětském věku a postupně progreduje do dospělosti (Pitřha, 2011). Nejčastěji postihuje cévy tepenného řečiště, především koronární tepny, dále mozkové tepny, břišní aortu a její odstupující větve a periferní arterie (Lukáš a Žák, 2011).

Rozeznáváme tři základní formy aterosklerózy:

- Časnou formu, charakterizovanou funkčními změnami endotelu tzv. endotelovou dysfunkcí nebo změnami intimy a medie, pro něž jsou typické tukové proužky, hromadění cholesterolu, zánětlivé a pěnové buňky (Zeman a Pospíšil, 2003).
- Stadium, ve kterém se z tukových proužků vyvíjí fibrózní a ateromové pláty bohaté na T buňky, makrofágy, buňky hladkého svalstva. V hlubších vrstvách plátu mohou být kalcifikace a cholesterolové krystaly (Zeman a Pospíšil, 2003).

- Posledním stadiem jsou komplikované léze charakterizované degenerativními změnami – masivní kalcifikací, ulceracemi, rupturami, s následnou snadnou adhezí trombocytů, tvorbou trombů, které mohou vést často k uzavěru tepny (Zeman a Pospíšil, 2003).

Ateroskleróza vzniká jako odpověď na nespecifické poškození cévní stěny. Jednoznačná příčina vzniku, která by vedla k bezpečné prevenci a léčbě, je stále neznámá. Kromě teorie lipidové, kdy dochází k ukládání lipidů do cévní stěny a endotelové, kdy dochází k poškození buněk cévní výstelky je diskutována i tzv. teorie infekční (Zeman a Pospíšil, 2003).



Obrázek 11 Schéma aterosklerotického plátu

(převzato z: <http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki2/wp-content/uploads/2011/12/6.bmp>)
[cit. 2017-08-04]

2.4.1. Rizikové faktory

V současné době je známa celá řada rizikových faktorů, které vedou ke vzniku nebo urychlení progresu aterosklerotických změn.

Mezi neovlivnitelné rizikové faktory aterosklerózy patří věk, pohlaví a genetické faktory, což jsou projevy, se kterými se setkáváme ve formě pozitivní rodinné anamnézy.

Rodinná anamnéza poskytuje důležitou informaci o individuálním riziku rozvoji aterosklerózy (Vohnout a Rašlová, 2009).

V současnosti známe několik desítek ovlivnitelných rizikových faktorů, z nichž má dominantní postavení hyperlipoproteinémie (dyslipidémie), kouření cigaret, hypertenze a diabetes mellitus. Hlavní rizikové faktory však nedokážou plně vysvětlit příčinu vzniku aterosklerózy, proto se věnuje velká pozornost tzv. novým rizikovým faktorům, jejichž ovlivnění může v budoucnosti přinést další redukci rizika (Vohnout a Rašlová, 2009).

2.4.2. Úloha oxidačního stresu v aterogenezi

Porozumění patofyziologii aterosklerózy může poskytnout nové strategie pro prevenci a léčbu pacientů s tímto onemocněním. Klinické, epidemiologické a základní molekulární vědy identifikovaly oxidační stres jako faktor přispívající k rozvoji a progresi aterosklerózy (Schulze a Lee, 2005).

Ateroskleróza je charakterizována komplexní souhrou mezi složkami krve a arteriální stěnou, která vede k chronickému stavu vaskulárního oxidačního stresu a zánětu. Oxidační stres je klíčovým rysem aterogeneze, protože tvorba volných radikálů je spojena s tvorbou oxidačních produktů lipidů, které zvyšují vaskulární zánět. Cévní zánět hraje klíčovou roli ve vývoji raných lézí a tukových proužků. Zánět a oxidační stres jsou tedy znaky aterosklerózy a předpokládá se, že přispívají k iniciaci, progresi a ruptuře vaskulárních lézí bohatých na lipidy (Rosenson a Stafforini, 2012).

Oxidace a glykace LDL a fosfolipidů hraje ústřední roli v patogenezi aterosklerózy, přičemž adukty jsou proaterogenní i prozánětlivé. Tvorba oxLDL se objevuje uvnitř cévních stěn, kde jsou zachyceny makrofágy za vzniku pěnových buněk. Akumulace oxLDL v cévních stěnách také stimuluje endotelové buňky k produkci prozánětlivých cytokinů včetně adhezních molekul, jako jsou ICAM-1, VCAM-1 a E-selektin (Hajjar a Gotto, 2013; Ho et al., 2013). Dendritické buňky a T buňky se dostávají z arteriálního lumen do intimy, kde jsou později začleněny do rostoucího ateromu. Stimulací leukocytů se aktivuje MPO, která katalyzuje vznik řady ROS, které mohou přispět k poškození tkání, peroxidaci lipidů a prozánětlivému působení (Hajjar a Gotto, 2013).

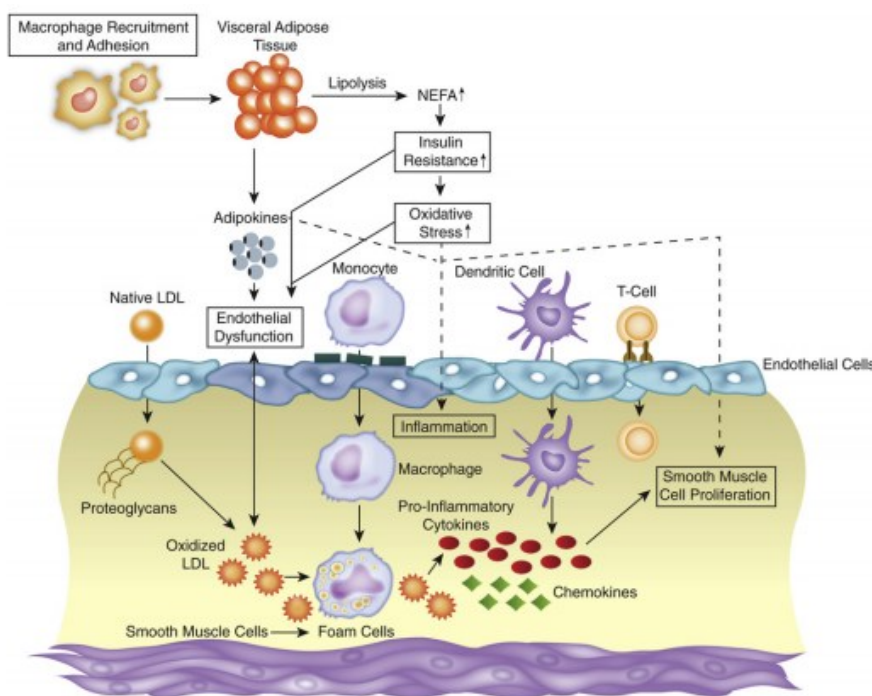
Oxidované fosfolipidy (oxPL) jsou nové biomarkery, které mají smíšené účinky na aterosklerózu, včetně podpory adheze monocytů k endotelovým buňkám. Množství oxPL bohatých na apolipoprotein B100 (apoB100) silně koreluje s plazmatickými hladinami lipoproteinu (a), který je hlavním nosičem oxPL v plazmě (Hajjar a Gotto, 2013).

V ateromu oxidovaný LDL a jeho složky aktivují vrozený imunitní systém ligací receptorů podobných Toll like. Tyto interakce vyvolávají intracelulární signalizační kaskádu, která vede ke zvýšené expresi řady prozánětlivých molekul včetně cytokinů, chemokinů, eikosanoidů, proteáz, ROS, reaktivních forem dusíku a kostimulačních molekul (Hajjar a Gotto, 2013).

Endotelové buňky pohlcují oxLDL přes lektinu podobný oxidovaný LDL receptor 1 (LOX-1). Celková prozánětlivá prooxidační atmosféra narušuje vaskulární funkci především snížením biologické dostupnosti NO a prodlužováním podmínek oxidačního stresu přes nadměrnou tvorbu ROS a reaktivních forem dusíku. Vědci se domnívají, že účinky kardiovaskulárních rizikových faktorů, včetně kouření, dyslipidémie, hypertenze a diabetes mellitus, mohou navíc přispívat k endotelové dysfunkci částečně tím, že narušují oxidační rovnováhu (Hajjar a Gotto, 2013).

Cévní stavy oxidační nerovnováhy podporují aterotrombotické onemocnění i prostřednictvím jiných mechanismů kromě oxidace LDL. Jedná se o modifikaci lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) za vzniku dysfunkčních, prozánětlivých a prooxidačních částic, stimulace aktivace destiček, podpora koagulace prostřednictvím snížené fibrinolýzy a zvýšené exprese tkáňového faktoru (Hajjar a Gotto, 2013).

Jedním z mechanismů ochrany proti aterosklerotickému procesu jsou HDL. Hlavním faktorem tohoto antioxidačního ochranného účinku je paraoxonáza asociovaná s HDL (Ho et al., 2013). Paraoxonáza-1 je antioxidačním enzymem, který přispívá k antioxidační vlastnosti HDL prevencí peroxidace lipidů. Zejména oxidací LDL, a omezením produkce oxidovaných produktů odvozených od kyseliny arachidonové (Delfino et al., 2011). Acetylhydroláza destičkového aktivačního faktoru, která cirkuluje ve spojení s HDL, je produkována v arteriální stěně makrofágy a degraduje bioaktivní oxPL. Oba enzymy aktivně chrání hypercholesterolemické myši před aterosklerózou. OxLDL tyto enzymy inhibuje. OxLDL a HDL jsou tedy skutečně antagonisty ve vývoji kardiovaskulárních onemocnění (Mertens a Holvoet, 2001).



Obrázek 12 Mechanismy onemocnění při ateroskleróze a obezitě (převzato z: Hajjar a Gotto, 2013)

Patofyziologické procesy uvnitř stěny cévy mohou být rozšířeny o účinky spojené s obezitou v tukové tkáni. Ateroskleróza začíná zadržováním a oxidační modifikací LDL, začleněním oxidovaného LDL do pěnových buněk, vyvoláním prozánětlivé kaskády a následnou proliferací buněk hladkého svalstva. Dendritické buňky a T buňky jsou přitahovány do lumen adhezními molekulami a jsou začleněny do ateromu. Při obezitě se makrofágy infiltroují do tukové tkáně, což může vést k uvolnění adipokinů a vzniku prozánětlivého stavu. Za těchto podmínek může vést lipolýza ke zvýšenému uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin a pravděpodobně také k inzulinové rezistenci. Výsledné zvýšení oxidačního stresu v kombinaci s působením adipokinů zhoršuje vaskulární prooxidační a prozánětlivé prostředí, zhoršuje endotelovou funkci, proliferaci buněk hladkého svalstva a urychluje aterosklerotický proces. Macrophage recruitment and adhesion - nábor a adheze makrofágů, Visceral adipose tissue – viscerální tuková tkáň, Lipolysis - lipolýza, NEFA – neesterifikované mastné kyseliny, Insulin resistance – inzulinová rezistence, Oxidative stress – oxidační stres, Adipokines – adipokyiny, Monocyte – monocyt, Native LDL - nativní LDL, Dendritic cell – dendritická buňka, T cell – T buňka, Endothelial dysfunction – endotelová dysfunkce, Endothelial cells – endotelové buňky, Inflammation – zánět, Macrophages – makrofágy, Pro-inflammatory cytokines – protizánětlivé cytokiny, proteoglycans – proteoglykany, Oxidized LDL – oxidované LDL, Smooth muscle – hladká svalovina, Cell proliferation – buněčná proliferace, Chemokines – chemokiny, Smooth muscle cells – buňky hladkého svalstva, Foam cells – pěnové buňky

2.4.3. Oxidovaný LDL

LDL částice obsahují vysoký podíl cholesterolu, který je soustředěn v nepolárním jádře. V obalu LDL je charakteristickou bílkovinnou strukturou apoB100. V průběhu

fyziologického metabolismu se LDL částice katabolizují prostřednictvím LDL receptorů (LDLR), lokalizovaných na povrchu hepatocytů i buněk extrahepatálních tkání.

V počátečních stádiích aterosklerózy se významně uplatňují částice LDL, které snadněji pronikají do endotelu při jeho poškození (hypertenze, kouření, apod.). Prostřednictvím svého apoB se v cévní stěně váží na glykosaminoglykany, kde podléhají modifikaci. ApoB podléhá buď přímé oxidaci nebo se na aminokyselinu lysin apolipoproteinu váží aldehydy. LDLR mohou mírně modifikované LDL ještě rozpoznávat, při větší modifikaci se mění struktura apoB100 natolik, že tyto částice nejsou receptory rozpoznány (Racek et al., 2006).

OxLDL je ligandem pro acetyl LDL receptor místo přirozeného LDL receptoru. Acetyl LDL receptor, přítomný v makrofázích, přijímá oxLDL mnohem rychleji než přirozené receptory, což zvyhodňuje nadměrnou intracelulární akumulaci cholesterolu. oxLDL je začleněn do "scavengerových receptorů", které na rozdíl od normálního LDL receptoru indukují velkou akumulaci intracelulárních lipidů (Leiva et al., 2015).

Zdá se, že oxidace LDL je tedy rozhodujícím krokem pro tvorbu pěnových buněk pocházejících z makrofágů v počátečních stádiích aterosklerotické léze. Navíc, LDL může být oxidován specifickými enzymy, jako je lipooxygenáza a fosfolipáza A2, i když tyto modifikace nejsou nutně identické s modifikacemi závislými na endotelových buňkách. V roce 1998 bylo prokázáno, že oxidační modifikace LDL specifickými enzymy vede k většímu rozpoznání makrofágy (Leiva et al., 2015).

Dalším procesem, který je třeba vzít v úvahu, je autooxidace glukosy nebo časných glykačních produktů generovaných volnými radikály kyslíku ($O_2^{\cdot-}$ a OH^{\cdot}) a H_2O_2 , které mohou způsobit oxidační poškození. Modifikace lipoproteinů glykací a oxidací mění jejich strukturu tak, aby byly dostatečně imunogenní. U diabetes mellitus typu 2 byly nalezeny vysoké titry protilátek proti glykosylovaným LDL a glykosylovaným oxLDL. Bylo prokázáno, že glykosylovaný OxLDL je zachycen ve stěně tepny *in situ* (Leiva et al., 2015).

Oxidační modifikace LDL způsobuje četné strukturální změny, což vede ke zvýšení elektroforetické mobility, vyšší hustotě, degradaci apoB, hydrolýze fosfatidylcholinu, změnám aminoskupin lyzinových zbytků a generaci fluorescenčních aduktů způsobených kovalentní vazbou oxidovaných produktů lipidů k apoB (Leiva et al., 2015).

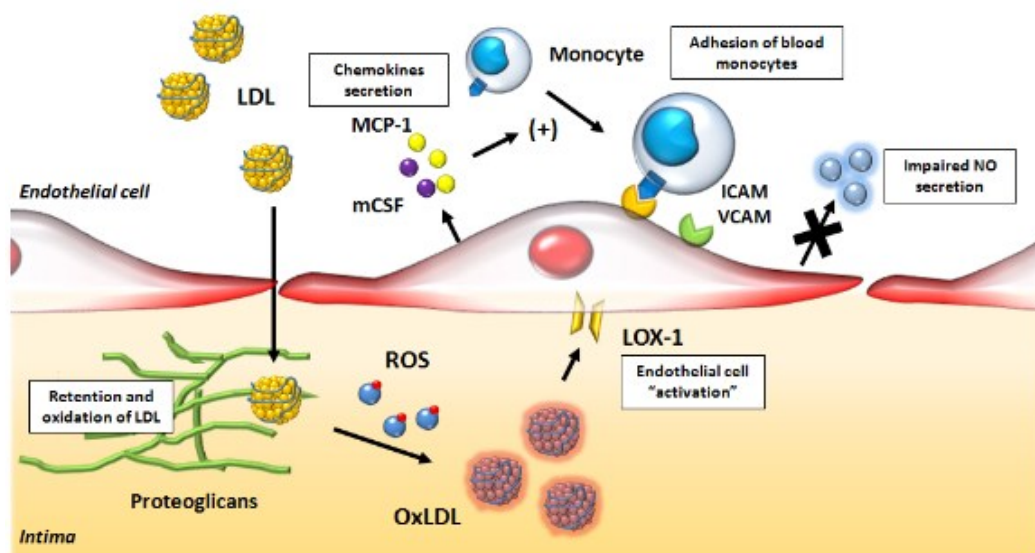
Účinek oxLDL

OxLDL se podílí na iniciaci tvorby aterosklerózy různými účinky. Nejprve stimuluje migraci monocytů a makrofágů do subendotelové oblasti stěny cévy (Yamada, 2001). Vazba oxLDL na receptor endotelových buněk a makrofágů vede k expresi monocytových chemotaktických proteinů a adhezních molekul (Delfino et al., 2011). Uvádí se, že oxLDL indukuje expresi ICAM-1 a VCAM-1, což zvyšuje adhezní vlastnosti endotelu (Leiva et al., 2015). A za druhé, oxLDL interferuje s pohybem monocytů směrem ven a udržuje je uvnitř cévní stěny, přestože monocyty a makrofágy jsou schopny migrace zpět, tedy mimo stěnu cévy (Yamada, 2001).

OxLDL také hraje důležitou roli při diferenciaci makrofágů do pěnových buněk. Dalším aspektem působení oxLDL je lysolecitin přítomný uvnitř oxLDL, který indukuje poškození endotelových buněk a podílí se na iniciaci tvorby aterosklerózy (Yamada, 2001).

NO je důležitou kardiovaskulární ochrannou molekulou. NO produkce je inhibována oxLDL, vzhledem k tomu, že je schopen indukovat depleci cholesterolu v plazmatických membránách, což způsobuje translokaci proteinu cav a eNOS z membránových domén. Kromě toho byly navrženy další mechanismy pro vysvětlení inhibičního účinku oxLDL na produkci NO v endotelových buňkách. Bylo zjištěno, že oxLDL vede k zvýšenému oxidačního stresu v endotelových buňkách, produkuje se značné množství $O_2^{\cdot-}$, který chemicky inaktivuje NO tvorbou $ONOO^-$ (Leiva et al., 2015). Inhibice NO vede k endotelové dysfunkci a apoptóze, což dále vede k oxidačnímu stresu a zánětu, a tím k podpoře aterogeneze (Delfino et al., 2011).

LOX-1, identifikovaný jako primární oxLDL receptor v endotelových buňkách, je exprimován v několika prozánětlivých stavech a zdá se, že hraje rozhodující roli v endotelové dysfunkci vyvolané oxLDL. V lidských aterosklerotických lézích byla skutečně hlášena nadměrná exprese LOX-1, zvláště v počáteční fázi tvorby plaků (Leiva et al., 2015).



Obrázek 13 Role oxLDL v endotelové dysfunkci (převzato z: Leiva et al., 2015)

Endothelial cell – endotelové buňky, LDL – lipoprotein o nízké hustotě, Chemokines secretion – sekrece chemokinů, MCP-1- monocytný chemotaktický protein 1, mCSF- faktor stimulující kolonie makrofágů, Monocyte- monocyty, Adhesion of blood monocyte – adheze monocytnů z krve, ICAM – intercelulární adhezní molekula, VCAM – vaskulární buněčná adhezní molekula, Impaired NO secretion – poškození sekrece oxidu dusnatého, Retention and oxidation of LDL – retence a oxidace LDL, Proteoglycans – proteoglykany, oxLDL – oxidovaný LDL, ROS – reaktivní formy kyslíku, LOX-1 – lektinu podobný oxLDL, Endothelial cell activation – aktivace buněk endotelu

2.5. Myší modely aterosklerózy

Zvířecí modely jsou rozsáhle používány pro studium lidských kardiovaskulárních onemocnění. Díky své malé velikosti a snadné genetické manipulaci jsou nejčastěji používanými modely ve výzkumu aterosklerózy modely myši (Lee et al., 2017).

Myši a lidé se liší v několika parametrech, které mohou ovlivnit aterogenezi. Většina myších modelů nevykazuje nestabilní aterosklerotický plát s nadměrnou trombózou. Jejich léze typicky nevytvářejí vláknitý uzávěr pozorovaný u chronické lidské aterosklerózy. U lidí se léze vyskytují nejčastěji v koronárních tepnách, karotidě a periferních cévách, zatímco u myši jsou omezeny na kořen aorty a aortální oblouk. Nicméně mnoho rysů aterosklerotického procesu je společných (Getz a Reardon, 2012). Výhody a nevýhody myších modelů jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2 Výhody a nevýhody myších modelů pro studium aterosklerózy (převzato a upraveno z: Lee et al., 2017)

Výhody	Nevýhody
Snadné genetické manipulace	Toxická strava potřebná k vyvolání aterosklerózy
Nízké náklady na údržbu	Odlíšný metabolismus lipidů ve srovnání s lidmi: vysoký HDL, nevykazují CETP
Méně časově náročné na výzkumné projekty	Rozdílná kardiovaskulární anatomie a fyziologie s různou predispozicí místa vývoje aterosklerózy
Široká dostupnost	Malá velikost těla omezuje častý odběr krve a zvyšuje obtížnost pitvy drobných tepen

Tzv. „wild-type“, tedy geneticky nemodifikované myši jsou relativně rezistentní na aterosklerózu v důsledku vysokých hladin antiaterosklerotického HDL a nízkých hladin proaterogenních LDL a lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) (Zadelaar et al., 2007; Emini Veseli et al., 2017). Všechny současné modely myši pro aterosklerózu jsou proto založeny na poruchách metabolismu lipoproteinů prostřednictvím dietních nebo genetických manipulací (Zadelaar et al., 2007).

Myši s vypnutými geny pro apolipoprotein E (apoE) a LDLR jsou dnes nejpoužívanějšími modely pro výzkum hyperlipidémie a aterosklerózy. ApoE a LDLR jsou důležité pro odstranění cholesterolu a lipoproteinových částic bohatých na triglyceridy z krve. ApoE je plazmatický glykoprotein na povrchu většiny lipoproteinů - VLDL, lipoproteinů se střední hustotou a chylomikronů. LDLR je jeden z receptorů buněčného povrchu jaterních buněk, který se váže na apoE. LDLR se také váže na LDL částici prostřednictvím interakce s apoB (Yeadon, 2015).

Myši geneticky upravené pak vykazují zvýšené hladiny cholesterolu v plazmě, rozvíjí se u nich aterosklerotické pláty v různé míře za specifických dietních podmínek (Yeadon, 2015), které jsou srovnatelné s lidskými lézemi (Getz a Reardon, 2012).

U lidí je mutace v LDLR a apoE spojena s několika dědičnými hyperlipidemickými poruchami (Yeadon, 2015).

2.5.1. ApoE deficientní myší model

Mezi nejpoužívanější modely aterosklerózy patří myši s deficiencí apoE. ApoE je syntetizován v játrech, mozku, ale i v makrofázích a má řadu důležitých antiaterogenních

funkcí. Je složkou plazmatických lipoproteinů a slouží jako ligand pro lipoproteinové receptory na povrchu buněk, čímž se podporuje odplavení aterogenních částic z oběhu (Zadelaar et al., 2007; Leiva et al., 2015; Emini Veseli, et al., 2017). V důsledku homozygotní delece genu pro apoE u myši dochází k výraznému zvýšení plazmatických hladin LDL a VLDL. Cílená delece genu pro apoE tedy vede k těžké hypercholesterolémii a spontánní ateroskleróze. K vývoji aterosklerotických lézí dokonce dochází i při potravě, která má nízký obsah tuku a neobsahuje cholesterol. Tento proces může být silně urychlen stravou s vysokým obsahem cholesterolu (Zadelaar et al., 2007).

Přestože tento model myši používá mnoho výzkumných skupin, má určitá omezení. ApoE je multifunkční protein, který má vliv na zánět, oxidaci, zpětný transport cholesterolu, proliferaci a migraci hladkého svalstva. Tyto funkce mohou ovlivnit vývoj aterosklerotického plátu u myši apoE^{-/-} nezávisle na hladinách lipidů v plazmě (Getz a Reardon, 2009; Emini Veseli et al., 2017). Hlavním nedostatkem nepřítomnosti apoE proteinu je skutečnost, že většina cholesterolu v plazmě je omezena na VLDL, nikoliv na částice LDL, jako je tomu u lidí (Leiva et al., 2015).

2.5.2. LDLR deficientní myší model

LDLR je membránový receptor, který zprostředkovává endocytózu LDL bohatého na cholesterol, a tím udržuje jeho plazmatickou hladinu. Rovněž usnadňuje buněčné vychytávání lipoproteinů obsahujících apoB a apoE (Emini Veseli et al., 2017).

LDLR deficientní modely vykazují jen mírně zvýšené hladiny cholesterolu v plazmě a při standartní dietě nevyvolávají žádnou nebo jen mírnou aterosklerózu (Ishibashi et al., 1994; Emini Veseli et al., 2017). Ateroskleróza se vyvine zejména při podávání diety bohaté na lipidy (Zadelaar et al., 2007; Emini Veseli et al., 2017). Stojí za to poznamenat, že vypnutím genu pro LDLR, a tedy vysokými hladinami LDL v plazmě, se tyto myši liší od myši apoE^{-/-}, u kterých je primárně nahromaděn cholesterol v lipoproteinových částicích, jako jsou zbytky chylomikronu, VLDL a IDL (Ishibashi et al., 1994; Emini Veseli et al., 2017).

Modely LDLR^{-/-} myši mají některé výhody ve srovnání s myšmi apoE^{-/-} deficientními. Za prvé, plazmatický cholesterol je většinou přenášen částicemi LDL, který vytváří lipidový profil. Za druhé, nepřítomnost LDL nemá vliv na zánět ve srovnání s nedostatkem apoE. Vývoj aterosklerotického plátu v tomto modelu myši je tedy založen výhradně na zvýšených hladinách lipidů v plazmě a není způsoben jinými funkcemi

spojenými s receptorem LDL (Getz a Reardon, 2012; Emini Veseli et al., 2017). Za třetí, LDLR^{-/-} myší model sdílí charakteristiky pozorované u lidské familiární hypercholesterolemie, která je způsobena absencí funkčních LDL receptorů (Lee et al., 2017).

2.5.3. ApoE/LDLR deficientní myší model

Tyto myši mají vypnuté oba dva geny - jak pro apoE, tak pro LDL receptor (apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}). Tento model myši rozvíjí těžkou hyperlipidémií a aterosklerózu. Bylo zjištěno, že i u standartní diety je progresse aterosklerózy obvykle výraznější než u myši apoE^{-/-} deficientních. Proto jsou tedy vhodným modelem pro studium antiaterosklerotického účinku různých molekul, aniž by bylo nutné zvířata krmit aterogenní dietou (Jawieñ et al., 2004; Leiva et al., 2015; Emini Veseli et al., 2017).

2.5.4. Myší model ApoE*3-Leiden

V mnoha studiích se používají i myši ApoE*3-Leiden (Emini Veseli et al., 2017). ApoE*3-Leiden mutace je vzácná mutace v lidském genu *APOE3* a je spojena s familiární dysbetalipoproteinémií u lidí. ApoE*3-Leiden transgenní myši byly vytvořeny vložením lidského *APOE*3-Leiden* genu do C57BL/6 myši. Kromě genu *APOE*3-Leiden* obsahuje tento segment také gen *APOC1* a promotor, který reguluje expresi *APOE* a *APOC1* genů (Zadelaar et al., 2007). Tyto myši mohou být také použity jako model pro aterosklerózu, ale ve srovnání s deficientními myšmi apoE^{-/-} a LDLR^{-/-} vykazují při podávání standartní diety spíše nízké hladiny celkového cholesterolu a triglyceridů v plazmě. Přesto jsou tyto myši vysoce citlivé na dietu obsahující tuky, cukry a cholesterol, což vede k silně zvýšeným hladinám lipoproteinů (Zadelaar et al., 2007; Emini Veseli et al., 2017). Bez ohledu na vývoj lézí, u myši ApoE*3-Leiden nedochází k prasknutí plátu, tvorbě trombů a nebo hemoragii, což jsou jevy, které mají velký význam v lidské ateroskleróze (Emini Veseli et al., 2017).

Výhodou je, že myši ApoE*3-Leiden mají schopnost syntetizovat funkční apoE. To nabízí možnost studovat účinek zvýšených hladin lipidů v plazmě bez narušení zánětlivých procesů, což je důležité omezení "klasického" modelu apoE^{-/-} myši. Používají se jako model k objasnění faktorů podílejících se na metabolismu apoE a zejména na etiologii familiární dyslipidémie (Emini Veseli et al., 2017).

3 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo porovnat a kvantifikovat expresi vybraných molekul oxidačního stresu v srdeční aortě u dvou skupin myší. Pro porovnání exprese byla použita skupina myší s vypnutými geny pro apolipoprotein E a LDL receptor a skupina normocholesterolemických myší (C57BL/6J). Obě skupiny myší byly krmeny standardní laboratorní dietou pro hlodavce. Pro porovnání exprese vybraných molekul oxidačního stresu v aortě myší byla zvolena metoda Western blot. Hodnocení exprese markerů oxidačního stresu v aortě bylo doplněno o hodnocení hladin dusičnanů a dusitanů v plazmě za použití metody HPLC.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitá zvířata

V experimentu byly použity dvě skupiny myši – sledovaná a kontrolní skupina. Sledovanou skupinou byli samci myši s vypnutými geny pro apoE a LDL receptor ve věku 2 měsíců (n=7, vzorky označeny AM). Tyto myši s vypnutými geny laskavě poskytl prof. Stefan Chlopicki (Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Krakow, Polsko)

Kontrolní skupinou byly stejně staří samci normocholesterolemického myšního kmene C57BL/6J (n=7, vzorky označeny CM). Tyto myši byly zakoupeny ve společnosti Charles River Laboratories (Německo).

Všechna zvířata byla individuálně umístěna v místnosti s kontrolovanou teplotou a vlhkostí, kde byl udržován cyklus 12 hodin tma/12hodin světlo. Myši měly volný přístup k potravě a pitné vodě. Obě skupiny myši byly krmeny standartní dietou pro hlodavce.

Všechny experimenty týkající se těchto zvířat byly provedeny v souladu se směrnicí Evropské unie o ochraně zvířat.

Rozdělení zvířat do skupin:

- skupina 1: n=7 - kontrolní skupina myši C57BL/6J(CM)
- skupina 2: n=7 - sledovaná skupina myši apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}(AM)

4.2. Postup pro metodu HPLC

Vzorky krve byly odebírány do zkumavek s antikoagulantem EDTA a centrifugovány při otáčkách 1000 za minutu po dobu 10 minut při 4°C. Získané vzorky plazmy byly hluboce zmrazeny (-80 °C) a uloženy pro vlastní analýzu.

Vyhodnocení koncentrací dusitanů a dusičnanů v plazmě bylo provedeno pomocí HPLC s post-kolonovou derivatizací za použití Griessova činidla na analyzátoru ENO-20-NOx (Eicom Corp., Kyoto, Japonsko).

Ke stanovení koncentrací dusitanů a dusičnanů byl vzorek plazmy vysrážen metanolem (v poměru 1: 1) a centrifugován při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Pro analýzu byl použit supernatant. Dusičnany a dusitany byly odděleny od jiných

látek na koloně NO-PAK (Eicom., Corp.). Dusičnany byly zredukovány na dusitany, které se smísily s Griessovým činidlem v reakční cívce za vzniku fialového azobarviva. Absorbance vzniklého azobarviva byla měřena při vlnové délce 540 nm.

Veškeré analýzy byly provedeny ve spolupráci s prof. Stefanem Chlopicki (Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Jagiellonian University, Krakow, Polsko). Statistická analýza výsledků byla provedena v programu GraphPad Prism 7.0 pomocí Mann-Whitneyhot-testu s hladinou statistické významnosti $p \leq 0,05$.

4.3. Postup Western blot analýzy

Western blot je důležitá technika používaná v buněčné a molekulární biologii. Pomocí této metody lze identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů (Mahmood a Yang, 2012).

Western blot technika využívá tři následující kroky:

- rozdělení proteinů podle velikosti gelovou elektroforézou
- jejich přenos na pevný nosič – membránu
- detekci cílového proteinu za použití vhodné primární a sekundární protilátky pro vizualizaci

Kvůli dobrému rozlišení a identifikaci se velikost signálu srovnává s proteinovými standardy tzv. markery o známé molekulové hmotnosti (Mahmood a Yang, 2012).

4.3.1. Příprava vzorků

Western blot analýza se využívá k identifikaci proteinu ze vzorku, který je nejčastěji ve formě buněčných lyzátů. Vzorky myších tkání, v našem případě aorty, se zvážily a následně daly do mikrozkumavek. Poté byl přidán RIPA pufr (Radio Immuno Precipitation Assay buffer), který umožnil efektivní lýzu buněk a rozpouštění proteinů. Aby nedošlo k rozkladu vzorku vlastními enzymy, součástí lyzačního pufru proto byly inhibitory proteáz a fosfatáz. Na 1g tkáně se použilo 20 ml RIPA pufru (na 1ml RIPA - 10 μ l inhibitorů proteáz). Po dobu zpracování tkáně se muselo pracovat při nízkých teplotách, aby se zabránilo denaturaci a degradaci bílkovin.

Takto připravený obsah zkumavek jsme nejprve nastříhali nůžkami a poté pomocí rotor - statoru rozmixovali do homogenní tekutiny. Vzniklý homogenát byl dále centrifugován. Centrifugu bylo nutné zapnout 30 min před použitím a nastavit na 10 000

RPM (Revolution per minute) otáček při 4°C na 10 minut. Vzniklý supernatant se odsál a vzniklé vzorky se následně rozpipetovaly do předem vychlazených mikrozkuumavek.

4.3.2. Určení koncentrace proteinů

Pro porovnání exprese ve vzorcích je nutné stanovit koncentraci vyizolovaných proteinů. Ta byla stanovena bicinchoniovou metodou, kdy výsledkem reakce je vznik barevného produktu, jehož množství se určí spektrofotometricky, tj. změřením absorbance.

Nejdříve se stanovila kalibrační křivka albuminu, kdy byly použity standartní roztoky o známé koncentraci (tj. s ředící řadou roztoku bovinního sérového albuminu). Roztok albuminu se naředil redestilovanou vodou dle stoupající koncentrace. Pro naředění vzorku se z každé skupiny vybral vzorek referenční. Vzorek a naředěný roztok albuminu se aplikovaly do první jamky mikrotitrační destičky. Veškerá stanovení byla prováděna v duplikátu. Aby došlo k zahájení enzymatické reakce, do každé jamky byl přidán reagent (roztok standardu A a B). Vzorky byly řádně promíchány a nechaly se 30 minut při 37°C inkubovat v termostatu. Po inkubaci se proměřila kalibrační řada jamek pomocí spektrofotometru za vzniku kalibrační křivky. Dle intenzity zbarvení středu kalibrační křivky byla nalezena barevná reakce vzorku - purpurové zbarvení, které je přímo úměrné množství bílkoviny a detekovatelné při 562 nm. Z daných výsledků bylo vybráno ředění 10x.

Stejným způsobem se postupovalo i v případě ostatních analyzovaných vzorků napipetovaných na druhé mikrotitrační destičce. Ze vzniklé kalibrační křivky pomocí aplikace Microsoft Office Excel přístroj přepočítal ředění a hodnotu koncentrace proteinů ve vzorku v mg/ml.

Tabulka 3 Ředící řada vzorků

	Koncentrace proteinu	Aplikovaný protein	Aplikovaný objem	Připravený objem	Ředění vzorku	Ředění vzorku
	mg/l	μl	μl	μl	vzorek μl	voda μl
A M1	4,28	20	12	25	19,45	5,55
A M2	4,22	20	12	25	19,75	5,25
A M3	4,73	20	12	25	17,61	7,39
A M4	3,63	20	12	25	22,95	2,05
A M5	4,83	20	12	25	17,26	7,74
A M6	4,24	20	12	25	19,67	5,33
A M7	4,56	20	12	25	18,26	6,74
C M1	5,15	20	12	25	16,17	8,83
C M3	4,82	20	12	25	17,30	7,70
C M4	6,43	20	12	25	12,96	12,04
C M5	6,85	20	12	25	12,17	12,83
C M6	5,94	20	12	25	14,03	10,97
C M7	5,59	20	12	25	14,90	10,10
C M8	6,77	20	12	25	12,30	12,70

AM – sledovaná skupina, CM – kontrolní skupina

Dle Tabulky 3 byly vzorky naředěny do zásoby a připravené tak na několik použití pro analýzu. Naředěné a označené vzorky byly ihned uskladněny v hlubokomrazicím boxu s -80°C.

4.3.3. Gelová elektroforéza

Pro separaci proteinů se využívá tzv. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.

Příprava gelů

Prvním krokem elektroforézy je příprava separačního a zaostřovací gelu. Elektroforetická aparatura se skládala ze stojanu a držáku skel, kam se umístila čistá a řádně osušená skla. Skla se položila na sebe a zasunula do držáku, a to kratším sklem

směrem dopředu. Stojan se upevnil do průhledné aparatury (Obrázek 14). Těsnost aparatury se zkontrolovala nalitím menšího množství destilované vody.



Obrázek 14 Elektroforetická aparatura

(převzato z:

http://www.biorad.com/webroot/web/images/lsr/products/electrophoresis/product_detail/global/lsr_mini_protean_tetra_cell_system.jpg) [cit. 2017-08-04]

Na základě molekulové hmotnosti proteinu (kDa) jsme vybrali koncentraci separačního gelu. V našem případě jsme zvolili koncentrovanější gel (8% a 10%), jelikož menší proteiny rychleji a snadněji procházejí gelem. Molekulové hmotnosti jednotlivých sledovaných proteinů a použité koncentrace separačního gelu jsou uvedeny níže.

- **Protein 25 – 200 kDa → 8% gel; 15 – 100 kDa → 10% gel; 10 – 70 kDa → 12% gel; 12 – 45 kDa → 15% gel; 4 – 40 kDa → 20% gel**
 - SOD-3 (35 kDa) 10%
 - CAT (cca 55 kDa) 10%
 - HO-1 (33 kDa) 10%
 - iNOS (130 kDa) 8%

Pro přípravu gelů jsme užili polymer polyakrylamidu, persulfát amonný (dodává volné radikály), tetrametylendiamin (katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného), dodecylsírán sodný (denaturuje proteiny, které získávají negativní náboj) a pufrů pro zaostřovací a separační gel (Tabulka 4).

Tabulka 4 Složení gelů

Uvedené množství je vždy pro přípravu dvou gelů.

Milli Q – redestilovaná voda, SDS - sodiumdodecylsulfát, dodecylsíran sodný; APS - ammonium persulfát, peroxidisíran sodný; TEMED - N, N, N', N' – tetrametyletylendiamin

	Separační gel		Zaostřovací gel
	8%	10%	5%
Milli Q	10,800	9,800	6,150
Pufř pro separační gel	5,000	5,000	/
Pufř pro zaostřovací gel	/	/	2,500
Akrylamid	4,000	5,000	1,250
10% SDS	0,200	0,200	0,100
10% APS	0,060	0,060	0,030
TEMED	0,030	0,030	0,015

Smísením všech potřebných složek dle Tabulky 4 jsme nejdříve připravili směs pro separační gel. Takto připravený roztok jsme pipetovali do připravené aparatury mezi skla asi 1,5 cm pod horní okraj kratšího skla. Gel se následně převrstvil malým množstvím separovaného isobutanolu, aby se odstranily bubliny a vyrovnala se hladina gelu. Polymerace gelu trvala přibližně 30 min. Kontrolou ztuhnutí gelu nám sloužil zbytek gelu v kádince. Po ztuhnutí gelu jsme isobutanol vylili, několikrát propláchli destilovanou vodou a osušili gázou.

Dalším krokem byla příprava zaostřovacího gelu - jeho koncentrace byla pro všechny separační gely stejná (5%). Postup přípravy byl stejný jako u separačního gelu. Připravený zaostřovací gel se nanasel pipetou na vrstvu separačního gelu. Poté jsme do gelu vložili teflonový hřeben, se kterým se po vložení nesmělo hýbat. Díky tuhnutí docházelo ke snižování hladiny, proto bylo nutné doplňovat gel po okrajích, aby se odstranily vzniklé vzduchové bubliny. Gel se nechal tuhnout přibližně hodinu a půl. Kontrolou dostatečného ztuhnutí nám opět byl zbylý gel v kádince.

Příprava vzorků

Během tuhnutí krycího gelu bylo nutné připravit vzorky. Naředěné vzorky jsme smíchali s nanášecím pufrem (Laemmler Sample buffer) v poměru 1:1. Bylo nutné

pracovat co nejrychleji, aby nedošlo k degradaci. Součástí nanášecího Laemmliho pufru jsou složky SDS, který jednak zajišťuje denaturaci proteinů a udává negativní náboj proteinů, dále β -merkaptoetanol sloužící k odstranění disulfidických můstků v proteinu. V nanášecím pufru je přítomná také barva bromfenolová modř, která umožní vizualizaci vzorku při nanášení a při vlastní separaci. Tato směs se zvortexovala a povařila 5 min při 95°C v termobloku. Takto připravené vzorky se nechaly vychladnout na pokojovou teplotu a poté se zcentrifugovaly.

Aplikace vzorků a elektroforéza

Po dostatečném ztuhnutí gelu jsme opatrně vysunuli hřeben a vzniklé jamky propláchli elektroforetickým pufrem, abychom odstranili zbytky gelu. Skla vyjmutá ze stojanu se vložila do elektroforetické vany, a to tak, aby kratší směřovalo směrem dovnitř. Do vzniklého prostoru vany se nalil pufr.

Do první jamky jsme nanесли marker molekulových hmotností o objemu 5 μ l, do dalších jamek jsme pipetovali vzorky o objemu 12 μ l. Poté jsme pufr doplnili po rysku, odstranili vzduchové bubliny a vanu uzavřeli víkem s elektrodami, které se připojily ke zdroji.

Na přístroji se nastavily podmínky pro elektroforetickou separaci proteinů:

- konstantní napětí – 200 V
- maximální proud – 30 mA
- doba elektroforézy (1h 15 min)

Spustila se elektroforéza a vana se obložila ledem k zajištění dostatečně nízké teploty.

Po skončení elektroforézy se zdroj odpojil, skla se vyndala z aparatury a opatrně od sebe oddělila. Gel na skle se očistil, po stranách nařízl a přenesl do misky s transferovým pufrem, kde se od skla odlepil.

4.3.4. Blotování

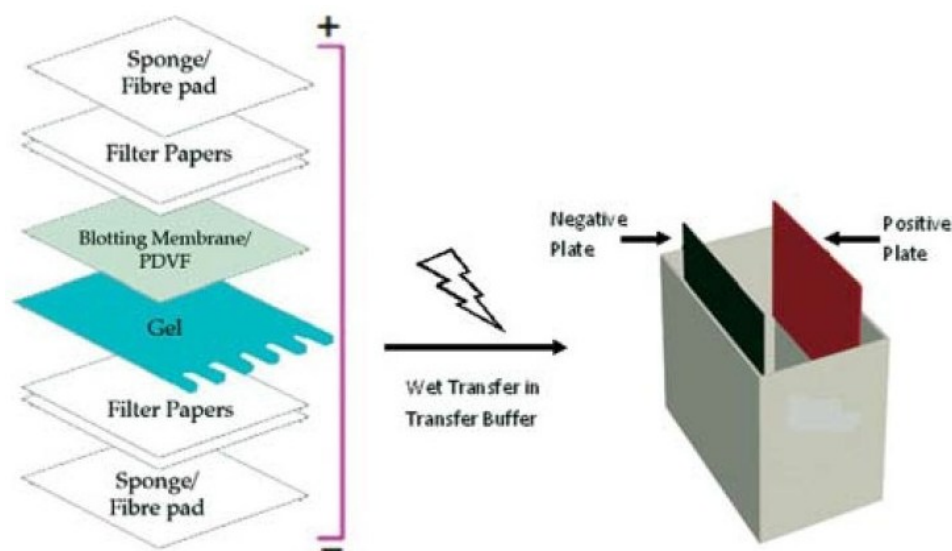
Po elektroforetické separaci jsou proteiny elektroforetický přeneseny na membránu, čímž se imobilizují separované proteiny. Pro přenos proteinů z gelu lze užít tzv. polosuchou, či mokrou cestu. V našem případě jsme použili mokrou cestu. Po celou dobu blotování jsme museli všechny použité složky namáčet a zvlhčovat v transferovém pufru.

Pro blotování je možno použít polyvinyliden difluoridovou membránu (PVDF) nebo nitrocelulózovou membránu. V našich experimentech byla použita PVDF membrána, kterou bylo nutné před použitím aktivovat 15 sekund v roztoku metanolu a poté 2 minuty v destilované vodě.

K blotování jsme použili přístroj Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Pro přenos proteinů bylo nutné vytvořit tzv. sendvič. Pěnové podložky a filtrační papíry jsme smočili v blotovacím pufru a položili na dno kazety. Na filtrační papír jsme opatrně přenesli gel a na něj co nejpřesněji položili membránu. Další vrstvou byl opět filtrační papír, po němž se několikrát přejelo válečkem, aby se vytlačili vzduchové bubliny. Nakonec se přidala pěnová podložka a kazeta se uzavřela. Takto vytvořený sendvič se vložil do vany blotovacího zařízení, kterou jsme naplnili blotovacím pufrům a přidali jsme chladicí jednotku.

Pro blotování se nastavily tyto podmínky:

- konstantní napětí – 130 V
- maximální proud – 300 mA
- doba blotování – 1 h 30 min



Obrázek 15 Schéma tzv. sendviče (převzato z: Mahmood a Yang, 2012)

Sponge/Fibre pad – pěnová podložka, Filter Papers – filtrační papír, Blotting membrane/PDVF – blotovací membrána/polyvinylidifluoridová membrána, Gel – gel, Wet transfer in transfer buffer – mokrá cesta v transferovém pufru, Negative plate – negativní deska, Positive plate – pozitivní deska

Po skončeném procesu blotování jsme odpojili zdroj a membránu s přenesenými proteiny opatrně vyjmuli ze sendviče. Membránu jsme ponořili do destilované vody, aby

došlo k projasnění a aby membrána nevyschla. Poté jsme ji nastříhali na proužky dle molekulových hmotností separovaných proteinů.

4.3.5. Imunodetekce a vyhodnocení

Třetím a zároveň posledním krokem analýzy je imunodetekce, kdy je cílový protein detekován pomocí specifických protilátek (primárních a sekundárních). Sekundární protilátka je obvykle značená enzymem křenovou peroxidázou (HRP), která přemění substrát na produkt, který produkuje signál odpovídající pozici cílového proteinu.

Imunodetekce zahrnuje několik kroků:

Blokování nespecifických vazebných míst

Membrány využívané pro Western blot mají obvykle vysokou afinitu k proteinům, a tedy i k protilátkám. Proto je nutné provést tzv. blokování membrány, kdy se zaplní volná místa na membráně a protilátka se váže pouze na svůj specifický antigen. K blokaci jsme si připravili 5% roztok netučného mléka s obsahem TBS s 0,05% TWEEN-20 (TBS-T). Nastříhané proužky membrány jsme nechali v tomto roztoku blokovat hodinu při pokojové teplotě na třepačce.

Inkubace s primární protilátkou

Během hodinové inkubace jsme si připravili vaničky z parafilmu dle velikosti nastříhaných membrán a naředili si primární protilátky 5% roztokem netučného mléka v TBS-T na potřebné koncentrace (Tabulka 5). K potvrzení jednotné nanášky proteinů byla použita monoklonální protilátka – mouse monoclonal anti- β -aktin v ředění (Sigma-Aldrich).

Po skončení blokace jsme membrány opatrně přendali do parafilmových vaniček s naředěnými protilátkami, umístili do lednice a nechali přes noc inkubovat za stálého kývání při 4°C.

Tabulka 5 Nastavení primárních protilátek

Molekula	Firma	Katalog. Číslo	Ředění	Typ
SOD-3	Abcam	ab83108	1:500	Rabbit polyclonal anti-SOD-3
CAT	Abcam	ab16731	1:2000	Rabbit polyclonal anti-CAT
HO-1	Abcam	ab13243	1:2000	Rabbit polyclonal anti-HO-1
iNOS	Cell Signaling	13120	1:500	Rabbit polyclonal anti-iNOS
β -aktin	Sigma-Aldrich	A5316	1:2000	Mouse monoclonal anti- β -aktin

Inkubace se sekundární protilátkou

Druhý den se membrány daly do nádobek s TBS-T roztokem, 3x se promyly rychle, a poté se nechaly promývat hodinu na kývačce. Výměna roztoku TBS-T probíhala 6x po 10 minutách. Nedostatečné promytí má za následek zvýšení nechtěného pozadí, které je způsobené nespecifickým navázáním protilátek. Naopak příliš intenzivní promývání může vést ke ztrátě citlivosti detekce.

Protože primární protilátky nelze obvykle přímo vizualizovat, je třeba použít značenou sekundární protilátku, která se váže na primární protilátku. Sekundární protilátka je konjugována se značenou sloučeninou nebo enzymem, který umožňuje následnou detekci. V našem případě byla konjugována s HRP.

Během promývání jsme si připravili nové vaničky z parafilmu a naředili si sekundární protilátky značené HRP v 5% roztoku netučného mléka v TBS-T.

Nastavení sekundárních protilátek:

- SOD-3: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam) v ředění 1:2000
- CAT: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam) v ředění 1:4000
- HO-1: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam) v ředění 1:2000
- iNOS: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam) v ředění 1:2000
- β -aktin: HRP conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) v ředění 1:5000

Po promytí se membrány přenesly do vaniček se sekundární protilátkou a nechaly se inkubovat hodinu při pokojové teplotě na kývačce. Po inkubaci následovalo opět promývání v TBS-T ve stejném sledu jako u primárních protilátek.

Chemiluminiscenční detekce

V minulosti se pro detekci hojně využívaly radioizotopy, nicméně v současné době je detekce založena nejčastěji na enzymatických reakcích a také fluorescenci. Hojně je využíván chemiluminiscenční systém, kdy enzym reaguje s chemiluminiscenčním substrátem a přeměňuje jej na nestabilní produkt, který vyzářuje světlo a vzniká tak chemiluminiscenční signál. Množství signálu je přímo úměrné množství detekovaného proteinu.

Jako detekční činidla jsme použili roztoky dvou různých intenzit, tzv. Pico (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific) a tzv. Femto (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate; Thermo Scientific). Složky detekčního kitu se smíchaly v poměru 1:1 v dostatečném množství a činidlo se důkladně promíchalo. Následně jsme si připravili tvrdou podložku, na kterou jsme položili pásy z neprůhledných folií, které sloužily jako podložka pro membrány. Po skončeném promývání se každá membrána přenesla opatrně na pás na připravené podložce. Na ni se naněs předem stanovený objem detekčního činidla, a to tak, aby membrána byla celá pokrytá roztokem. Musel se přesně dodržet čas doby působení detekčního činidla (Tabulka 6). Přebytečné detekční činidlo se odsálo gázou, membrány se ihned umístily do průhledné folie a uzavřely do připravené kazety. V kazetě se upevnily lepicí páskou a gázou se vytlačily vzniklé vzduchové bubliny.

Tabulka 6 Doba působení detekčního činidla

Femto – Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Pico - Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate

Molekula	Činidlo	Doba působení
SOD-3	Pico	5 minut
CAT	Femto	5 sekund
HO-1	Pico	5 minut
iNOS	Femto	5 sekund
β-aktin	Pico	1 minuta

Dále se pracovalo jen v temné komoře. Jak již bylo zmíněno výše, enzym HRP přeměňuje chemiluminiscenční substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje

vyzářením světla. Uvolňované světlo bylo v našem případě detekováno přiložením RTG filmu (Forma, Czech Republic), který se nechal se exponovat. Doba první expozice trvala přibližně 10-15 sekund. Dle intenzity bandů jsme přizpůsobili dobu pro další expozice. Takto připravené RTG filmy byly připraveny k vyhodnocení.

Filmy byly vyhodnoceny semikvantitativně, a to denzitometrickou metodou. Pro vyhodnocení výsledků jsme použili tzv. Mann-Whitney t-test v programu GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., USA), kterým jsme zjistili hodnotu statistické významnosti, tedy hodnotu p . Pokud je hodnota $p \leq 0,05$, jsou rozdíly mezi skupinami významné. V grafu jsou tyto hodnoty označeny symbolem „*“, kde platí: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Stripping membrány

V případě, že je nutné na membráně zopakovat imunodetekci s libovolnou primární protilátkou, je možno provést tzv. stripping membrány. Membrána se ponoří do tzv. stripping pufru a nechá se inkubovat po dobu 30 minut při 55°C. Po inkubaci se promyje v TBS-T a nechá se vysušit. Membránu je možno skladovat v lednici při teplotě 2-8°C. My tohoto případu využili pro ověření jednotné nanášky proteinů na membráně, tedy pro detekci β -aktinu.

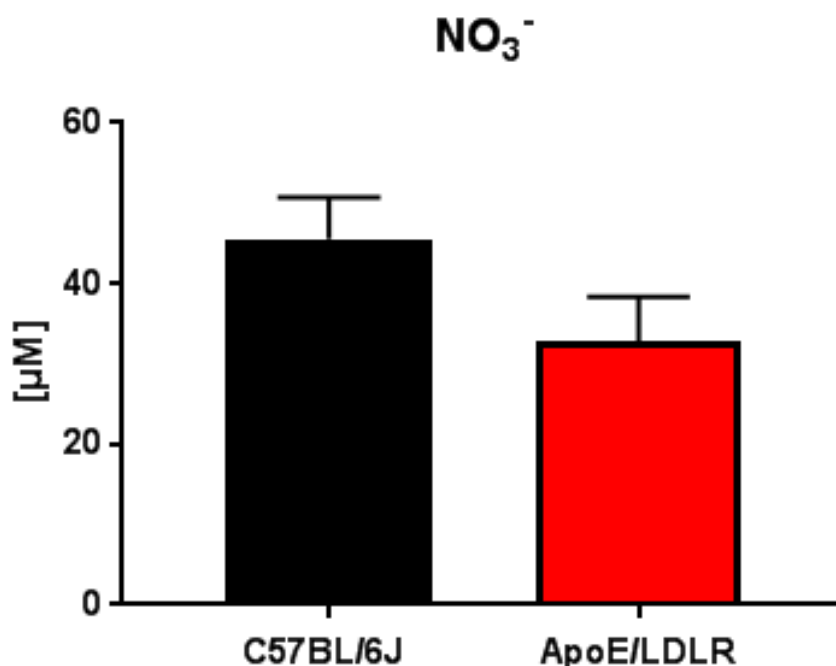
5 VÝSLEDKY

5.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Pomocí metody HPLC byly vyhodnoceny koncentrace dusičnanů a dusitanů u obou skupin myši v plazmě. V hodnotách plazmatických koncentrací dusičnanů nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi sledovanou ($apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$) a kontrolní (C57BL/6J) skupinou ($32,82 \pm 5,52$ vs. $45,58 \pm 5,16$; $p=0,165$). Výsledky koncentrací dusitanů také neprokázaly signifikantní rozdíl mezi skupinami ($0,35 \pm 0,08$ vs. $0,36 \pm 0,06$; $p=0,833$). Obě skupiny se tedy z hlediska množství nitrátů a nitritů v plazmě mezi sebou neliší. Koncentrace nitrátů a nitritů v mikromolech znázorňují Grafy č. 1 a č. 2.

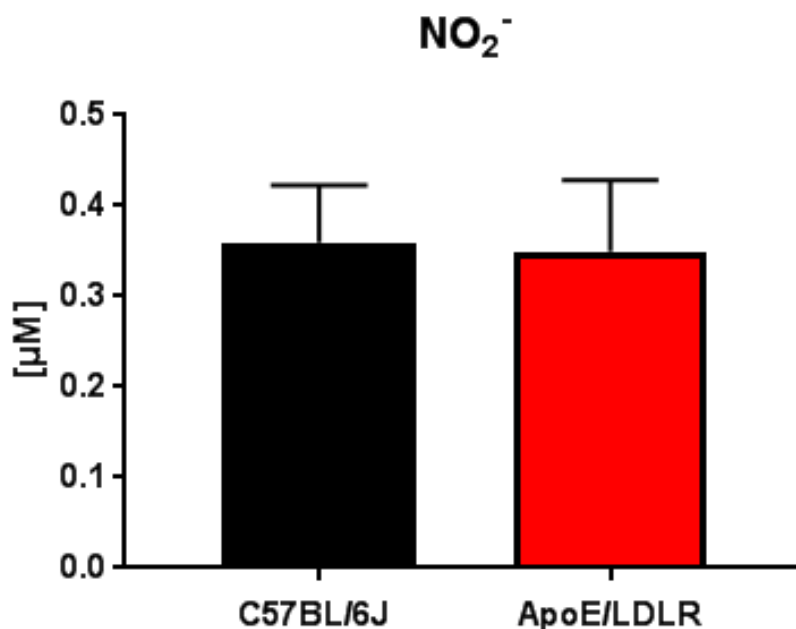
Graf 1 Plazmatické hladiny NO_3^- u obou skupin myši

Sloupec 1 znázorňuje hladinu NO_3^- u skupiny myši kontrolních (C57BL/6J) a sloupec 2 hladinu NO_3^- u myši sledovaných ($apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$) v plazmě.



Graf 2 Plazmatické hladiny NO_2^- u obou skupin myši

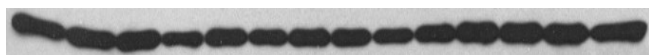
Sloupec 1 znázorňuje hladinu NO_2^- u skupiny myši kontrolních (C57BL/6J) a sloupec 2 hladinu NO_2^- u myši sledovaných ($\text{apoE}^{-/-}/\text{LDLR}^{-/-}$) v plazmě.



5.2. Western blot analýza

Metodou Western blot byla vyhodnocena exprese vybraných molekul oxidačního stresu ve vzorcích hrudní aorty dvou skupin myši. K potvrzení jednotné nanášky proteinů jsme využili β -aktin (Obrázek 16).

Obrázek 16 Foto RTG snímku - detekce β -aktinu



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

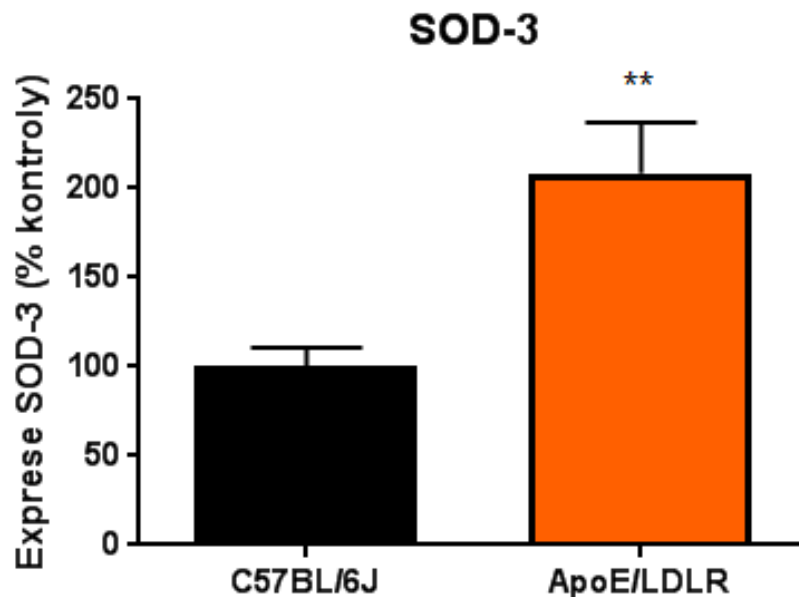
Vzorky č. 1-7 – kontrolní skupina, vzorky č. 8-14 - sledovaná skupina $\text{apoE}^{-/-}/\text{LDLR}^{-/-}$.

5.2.1. Exprese molekuly SOD-3

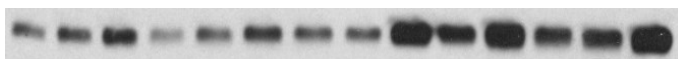
Naše měření prokázalo statisticky významný nárůst exprese SOD-3 u skupiny myši $\text{apoE}^{-/-}/\text{LDLR}^{-/-}$ ve srovnání s kontrolní skupinou myši. Hladiny exprese proteinu byly u sledované skupiny v průměru dvakrát vyšší oproti skupině kontrolní ($208,39 \pm 28,55$ vs. $100,00 \pm 10,81$; $p = 0,007$ - Graf 3). Foto RTG snímku s bandy proteinů z chemiluminiscenční detekce je na Obrázku 17.

Graf 3 Western blot analýza exprese SOD-3 (%)

Sloupec 1 znázorňuje expresi SOD-3 u skupiny myši kontrolních (C57BL/6J) a sloupec 2 expresi SOD-3 u myši sledovaných ($\text{apoE}^{-/-}/\text{LDLR}^{-/-}$). Ve srovnání se skupinou kontrolní došlo u skupiny myši $\text{apoE}^{-/-}/\text{LDLR}^{-/-}$ k signifikantnímu zvýšení exprese SOD-3 v hrudní aortě (** $p \leq 0,01$).



Obrázek 17 Foto RTG snímku SOD-3 (35 kDa)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

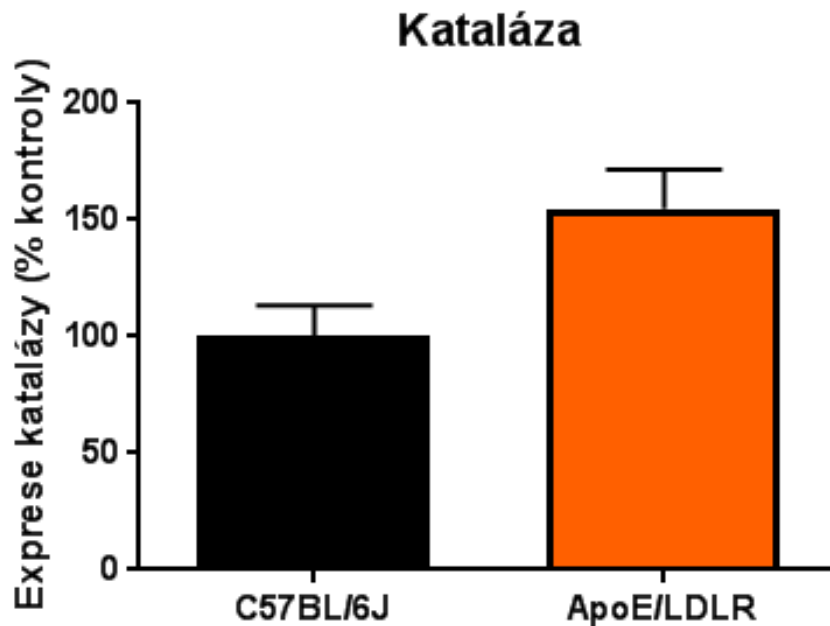
Vzorky č. 1-7 – kontrolní skupina, vzorky č. 8-14 - sledovaná skupina $\text{apoE}^{-/-}/\text{LDLR}^{-/-}$.

5.2.2. Exprese molekuly kataláza

Analýza exprese molekuly CAT neprokázala signifikantní rozdíl mezi sledovanou ($apoE^{-}/LDLR^{-}$) skupinou a kontrolní skupinou myší ($154,70 \pm 16,94$ vs. $100,00 \pm 13,46$; $p=0,530$ - Graf 4). Foto RTG snímku s bandy proteinů z chemiluminiscenční detekce je na Obrázku 18.

Graf 4 Western blot analýza exprese CAT (%)

Sloupec 1 znázorňuje expresi CAT u skupiny myší kontrolních (C57BL/6J) a sloupec 2 expresi CAT u myší sledovaných ($apoE^{-}/LDLR^{-}$).



Obrázek 18 Foto RTG snímku CAT (cca 55 kDa)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

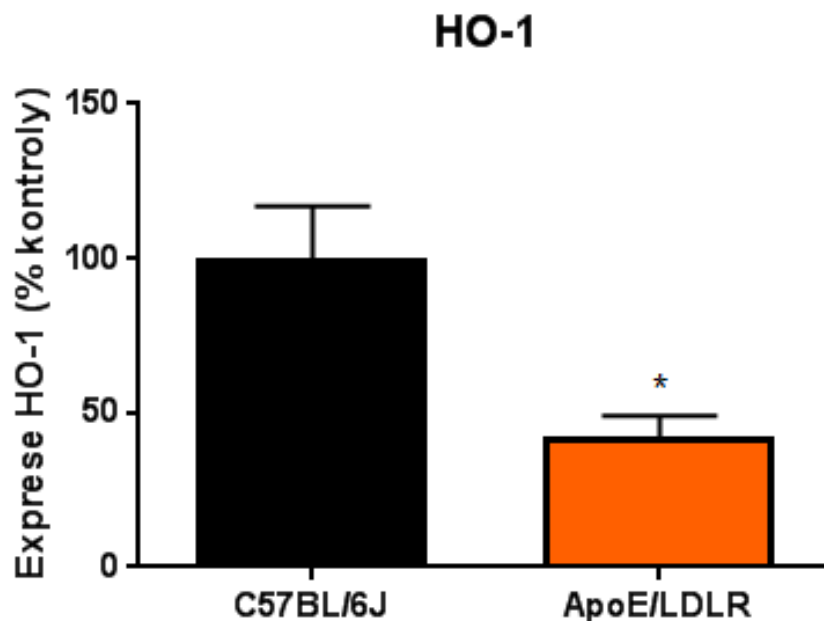
Vzorky č. 1-7 – kontrolní skupina, vzorky č. 8-14 - sledovaná skupina $apoE^{-}/LDLR^{-}$.

5.2.3. Exprese molekuly HO-1

Naopak analýza enzymu HO-1 prokázala statisticky významné snížení exprese u skupiny myši $apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$ ve srovnání s kontrolní skupinou myši ($42,22 \pm 6,81$ vs. $100,00 \pm 16,77$; $p=0,026$ - Graf 5). Foto RTG snímku s bandy proteinů z chemiluminiscenční detekce je na Obrázku 19.

Graf 5 Western blot analýza exprese HO-1 (%)

Sloupec 1 znázorňuje expresi HO-1 u skupiny myši kontrolních (C57BL/6J) a sloupec 2 expresi HO-1 u myši sledovaných ($apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$). Ve srovnání se skupinou kontrolní došlo u skupiny myši $apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$ k signifikantnímu snížení exprese HO-1 v hrudní aortě (* $p \leq 0,05$).



Obrázek 19 Foto RTG snímku HO-1 (33 kDa)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

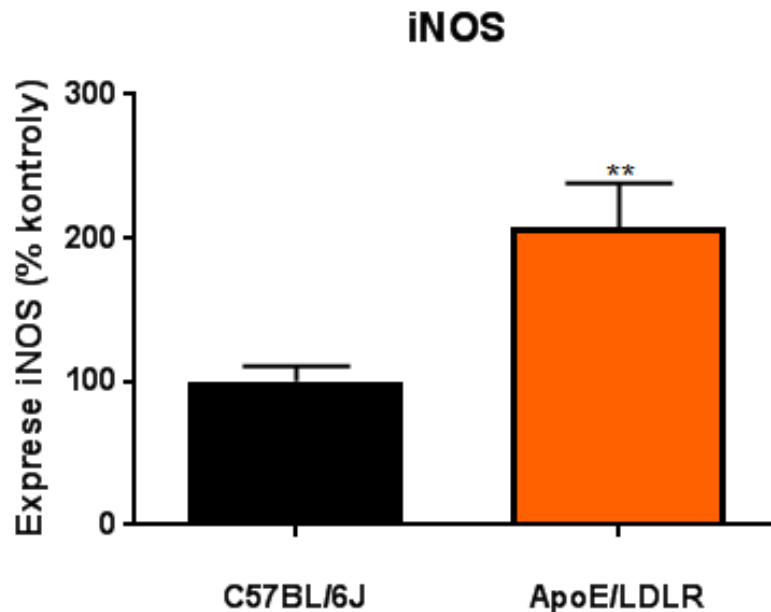
Vzorky č. 1-7 – kontrolní skupina, vzorky č. 8-14 - sledovaná skupina $apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$.

5.2.4. Exprese molekuly iNOS

Jako u enzymu SOD-3, také u proteinu iNOS došlo u skupiny myši apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} ve srovnání s kontrolní skupinou k signifikantnímu nárůstu exprese. Hladiny exprese proteinu byly u sledované skupiny také v průměru dvakrát vyšší oproti skupině kontrolní (207,62 ± 30,82 vs. 100,00 ± 10,86; p= 0,007 - Graf 6). Foto RTG snímku s bandy proteinů z chemiluminiscenční detekce je na Obrázku 20.

Graf 6 Western blot analýza exprese iNOS (%)

Sloupec 1 znázorňuje expresi iNOS u skupiny myši kontrolních (C57BL/6J) a sloupec 2 expresi iNOS u myši sledovaných (apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}). Ve srovnání se skupinou kontrolní došlo u skupiny myši apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} k signifikantnímu zvýšení exprese iNOS v hrudní aortě (** p ≤ 0,01).



Obrázek 20 Foto RTG snímku iNOS (130 kDa)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Vzorky č. 1-7 – kontrolní skupina, vzorky č. 8-14 - sledovaná skupina apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}.

6 DISKUZE

Ateroskleróza a související kardiovaskulární onemocnění představují zvýšený oxidační stres a zánět charakterizovaný akumulací makrofágů, produktů oxidace lipidů a proteinů v postižených cévách. Řada studií podporuje hypotézu oxidační modifikace u aterosklerózy, podle níž oxidace LDL je časným jevem a přispívá k progresi aterogeneze (Wu et al., 2006).

Nadprodukce ROS za patofyziologických podmínek, včetně dyslipidémie, hypertenze, diabetes mellitus a kouření, je nedílnou součástí vývoje CVD. ROS uvolněné ze všech typů cévních buněk regulují různé signalizační cesty, které zprostředkovávají nejen vaskulární zánět v aterogenezi, ale také antioxidační a protizánětlivé odpovědi. Jedním takovým ochranným a stresem indukovaným proteinem je HO (Morita, 2005). Z výsledků řady studií vyplývá, že systém HO-1/CO hraje prospěšnou roli při ateroskleróze (Abraham a Kappas, 2008). Induktorem exprese této molekuly je oxidační stres, zánětlivé mediátory a hypoxie (Ryter a Choi, 2006). OxLDL, hlavní determinant v patogenezi aterosklerózy, je silným induktorem HO-1 ve vaskulárních buňkách. Ve vaskulárních endotelových buňkách, buňkách hladkého svalstva a makrofázích je exprese HO-1 výrazně zvýšena vlivem oxLDL. Zdá se, že klíčovou složkou v oxLDL, která je odpovědná za indukci HO-1, jsou oxPL obsahující kyselinu arachidonovou (Abraham a Kappas, 2008). Bylo prokázáno, že nadměrná exprese HO-1 inhibuje tvorbu aterosklerotických lézí inhibicí peroxidace lipidů a ovlivněním metabolismu NO. Tyto údaje naznačují, že HO-1 jako vnitřní antioxidant hraje důležitou roli při aterogenezi. Je však stále neznámé, které prozánětlivé molekuly indukují/stimulují činnost HO-1 (Kawamura et al., 2005).

Vysoké hladiny NO, které produkují aktivované makrofágy (a pravděpodobně i neutrofilů a jiné buňky), mohou být nejen toxické pro nežádoucí mikroby, parazity nebo nádorové buňky, ale pokud jsou uvolněny na nesprávném místě, mohou také poškodit zdravé buňky (Förstermann a Sessa, 2012). NO, který produkuje endotelový buněčný enzym eNOS, je spojen s prevencí dysfunkce endotelových buněk, což může být prospěšné při ateroskleróze. Naproti tomu iNOS je vysoce výkonným enzymem, který může po dlouhou dobu produkovat velké množství NO, který ve velkých množstvích může potenciálně poškodit tkáň. Poškození buněk a tkání *in vivo* může souviset se samotným radikálem oxidu dusnatého nebo interakcí NO s $O_2^{\cdot -}$ vedoucí k tvorbě

peroxinitritu. Tento adukt má zvýšenou oxidační kapacitu a je schopen modifikovat buněčné proteiny a lipidy (Detmers et al., 2000). Jak iNOS, tak produkty ONOO⁻ byly lokalizovány v lidské ateromatózní tkáni. iNOS byl identifikován v makrofázích, buňkách hladkých svalů a lymfocytech v lidských lézích. Detmers et al. prokázali, že iNOS je exprimována v oblastech bohatých na pěnové buňky aterosklerotických lézí u apoE^{-/-} myši. NO může mít sice prospěšné, protizánětlivé vlastnosti pro aterosklerózu, avšak produkce velkého množství NO pomocí iNOS bývá zpravidla prozánětlivá v aterosklerotickém prostředí a může přispět ke vzniku lézí (Detmers et al., 2000).

Endotelová dysfunkce je fenomén, který se objevuje na počátku progresu onemocnění, zejména při ateroskleróze, jejíž přítomnost se projevuje snížením vaskulární odpovědi a nižšími hladinami NO₂⁻ a NO₃⁻ v plazmě. Khambata et al. prokázali obecné snížení hladin NO₃⁻, nikoliv však NO₂⁻ u apoE^{-/-} modelu myši. Podkladem tohoto jevu je snížení aktivity eNOS. Na rozdíl od Khambata et al., některé studie naznačují, že snížené hladiny NO₂⁻ v plazmě, a nikoli NO₃⁻, přesněji odrážejí závažnost onemocnění a odpovědi vaskulárního tonu (Kleinbongard et al., 2003; Rassaf et al., 2010). Je však obecně uznáno, že dominantní cesta metabolismu NO nastává skrze jeho oxidaci hemoglobinem přímo na dusičnany, spíše než dusitany (Khambata et al., 2017).

Nedávné studie ukazují, že NO₃⁻ stabilizují aterosklerotický plát *in vivo* a poskytují zdroj NO, který působí příznivě na kardiovaskulární systém, včetně snížení zánětlivých reakcí. Potlačuje akutní a chronický zánět tím, že se zaměřuje na nábor neutrofilů, a že tento účinek přinejmenším částečně vede k následnému snížení zánětlivého stavu ateromatózního plátu (Khambata et al., 2017).

Další sledovanou molekulou v našem experimentu byla SOD-3, což je homotetramerní glykoprotein vykazující vysokou afinitu pro heparin a jiné sulfatované glykosaminoglykany. Je vysoce exprimována v plicích, ledvinách, děloze a krevních cévách. SOD-3 je umístěna v modulu extracelulární matrix a je známo, že je jediným antioxidantem, který odstraňuje O₂^{•-} v extracelulárním prostoru. Také bylo dokázáno, že SOD-3 chrání mozek, plíce a další tkáně před oxidačním stresem (Weydert a Cullen, 2010). SOD-3 je považována za důležitý endogenní regulátor oxidačního stresu (Qin et al., 2008).

Několik poznatků naznačuje, že exprese SOD-3 v makrofázích je stimulována během pohlcení lipidů a jejich přeměny na pěnovou buňku. Zvýšená exprese SOD-3

v aterosklerotických cévách, zejména pěnovými buňkami, může mít několik důležitých důsledků. Zřejmým vysvětlením je to, že exprese SOD-3 se zvyšuje v reakci na oxidační prostředí makrofágů a aterosklerotické cévy. To by představovalo kompenzační adaptivní funkci. Je možné, že aktivity tohoto enzymu slouží k odstranění $O_2^{\cdot-}$ produkovaných aktivovaným makrofágem (Fukai et al., 1998). SOD-3 je lokalizována ve vysokých koncentracích mezi endotelem a hladkým svalem, kde NO zajišťuje stimulaci hladkého svalstva. SOD-3 tedy hraje roli při ochraně NO před $O_2^{\cdot-}$ v extracelulární prostoru (Fukai et al., 2002).

Poslední studovanou molekulou byla kataláza. Buňky hladkého svalstva mohou migrovat, proliferovat nebo umírat v reakci na oxidační stres. U buněk hladkého svalstva hraje důležitou roli kataláza. Indukce genu pro tento enzym mírným oxidačním stresem (necytotoxické stavy) může být ateroprotektivní *in vivo*. Transfekce buněk hladkého svalstva katalázovým genem inhibuje produkci intracelulárního H_2O_2 indukovaného oxidačním stresem. Tyto transfekované buňky, které nadměrně exprimují katalázu, také vykazovaly sníženou hypertrofii vyvolanou angiotensinem II (Meilhac et al., 2000). Zvýšená katalázová aktivita byla identifikována v pěnových buňkách z králičích aortálních lézí. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese katalázy zpomaluje progresi aterosklerózy a u $apoE^{-/-}$ myší (Kang a Kang, 2013).

Důkazy *in vivo* naznačují, že antioxidační enzymy mohou být za patologických podmínek regulovány přímo v arteriální stěně. Oxidační stres, který se vyskytuje v subintimální oblasti, může vyvolat antioxidační odpověď z vaskulárních buněk. Oxidace, katalyzovaná myeloperoxidázou nebo kovem, je zodpovědná za oxidaci LDL v arteriální intimě. Indukce katalázy peroxidy lipidů před vývojem lézí tak může být důležitým ochranným mechanismem zabraňujícím oxidaci LDL v intimě (Meilhac et al., 2000).

Naše studie se zaměřila na hodnocení exprese několika enzymů souvisejících s oxidačním stresem u $apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$ samců myší ve věku dvou měsíců v porovnání se skupinou samců kontrolního kmene C57BL/6J téhož věku. Potenciální změny v expresi těchto enzymů byly zaznamenány v případě molekuly SOD-3, jejíž zvýšená exprese u $apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$ myší může poukazovat na výše diskutovanou reakci na peroxidační prostředí aterosklerotické cévy, rovněž detekovaná zvýšená exprese iNOS u $apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$ myší naznačuje vyšší přítomnost oblastí bohatých na pěnové buňky, oproti skupině kontrolní. Naopak, exprese molekuly HO-1, která by u $apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}$ myší

mohla být stimulována vlivem vyšších hladin oxLDL, byla signifikantně zvýšena u skupiny myši kontrolních. Expres molekuly kataláza se mezi oběma skupinami nelišila. Také doplňující hodnocení plazmatických hladin dusitanů a dusičnanů neprokázala signifikantní rozdíly mezi skupinou u apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} myši a myších kontrolních.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit a kvantifikovat expresi molekul oxidačního stresu (SOD-3, katalázy, HO-1 a iNOS) v hrudní aortě dvou skupin myší pomocí Western blot analýzy. Pro hodnocení hladin nitritů a nitrátů v plazmě těchto myší byla užitá metoda HPLC. Sledovaná skupina měla vypnuté geny pro apoE a LDLR, v porovnání se skupinou kontrolní (C57BL/6J). Obě skupiny myší byly krmeny standardní dietou pro hlodavce, tudíž samotná dieta nemohla ovlivnit expresi těchto genů.

Měření prokázalo výrazný nárůst exprese proteinu SOD-3 a iNOS u sledované skupiny myší apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}, a to v průměru dvakrát vyšší oproti skupině kontrolní. Naopak, u molekuly HO-1 byla exprese u sledované skupiny signifikantně nižší. Analýza exprese molekuly katalázy neprokázala signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami myší. Metoda HPLC nitrátů a nitritů v plazmě rovněž neprokázala statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami myší.

Výsledky naší studie tedy neprokázaly jednoznačné zvýšení oxidačního stresu u apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} myší oproti skupině C57BL/6J myší, jak by se dle odborné literatury očekávalo. Pro učinění finálních závěrů však bude potřeba studii rozšířit o další analýzy, například stereologickou analýzu velikosti aterosklerotických plátů, případně biochemický profil hladin cholesterolu u obou skupin myší.

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Oxidační a antioxidační systémy.....	24
Tabulka 2 Výhody a nevýhody myších modelů pro studium aterosklerózy	47
Tabulka 3 Ředící řada vzorků.....	54
Tabulka 4 Složení gelů	56
Tabulka 5 Nastavení primárních protilátek	60
Tabulka 6 Doba působení detekčního činidla	61

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma obecné stavby cévní stěny	14
Obrázek 2 Fyziologické funkce endotelové buňky	16
Obrázek 3 Mechanismy endotelové dysfunkce indukované oxidačním stresem u kardiovaskulárních onemocnění	18
Obrázek 4 Schéma tvorby NO katalyzované kofaktory a NO syntázou	19
Obrázek 5 Generování ROS	26
Obrázek 6 Některé zdroje a důsledky oxidačního stresu	30
Obrázek 7 Řetězová reakce způsobující peroxidaci lipidů	31
Obrázek 8 Schéma antioxidačních enzymů	35
Obrázek 9 Schematické znázornění degradační cesty hemu	36
Obrázek 10 Způsoby ochrany buněk arteriální stěny zprostředkované HO-1	39
Obrázek 11 Schéma ateromového plátu	40
Obrázek 12 Mechanismy onemocnění při ateroskleróze a obezitě	43
Obrázek 13 Role oxLDL v endotelové dysfunkci	46
Obrázek 14 Elektroforetická aparatura	55
Obrázek 15 Schéma tzv. sendviče	58
Obrázek 16 Foto RTG snímku - detekce β -aktinu	64
Obrázek 17 Foto RTG snímku SOD-3 (35 kDa)	65
Obrázek 18 Foto RTG snímku CAT (cca 55 kDa)	66
Obrázek 19 Foto RTG snímku HO-1 (33 kDa)	67
Obrázek 20 Foto RTG snímku iNOS (130 kDa)	68

10 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Plazmatické hladiny NO_3^- u obou skupin myši	63
Graf 2 Plazmatické hladiny NO_2^- u obou skupin myši	64
Graf 3 Western blot analýza exprese SOD-3 (%)	65
Graf 4 Western blot analýza exprese CAT (%)	66
Graf 5 Western blot analýza exprese HO-1 (%)	67
Graf 6 Western blot analýza exprese iNOS (%)	68

11 POUŽITÁ LITERATURA

ABRAHAM, N. G. a KAPPAS, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological reviews*. 2008, **60**(1), s. 79-127.

AHLUWALIA, A., GLADWIN, M., COLEMAN, G. D., et al. Dietary nitrate and the epidemiology of cardiovascular disease: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. *Journal of the American Heart Association*. 2016, **5**(7), s. e003402.

ALDERTON, W. K., COOPER, CH. E., KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001, **357**(3), s. 593-615.

ALLEN, J. D., MILLER, E. M., SCHWARK, E., et al. Plasma nitrite response and arterial reactivity differentiate vascular health and performance. *Nitric Oxide*. 2009, **20**(4), s. 231-237.

ALLEN, J. D., GIORDANO, T., KEVIL, C. G. Nitrite and nitric oxide metabolism in peripheral artery disease. *Nitric Oxide*. 2012, **26**(4), s. 217-222.

ARAUJO, J. A., ZHANG, M., YIN, F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Frontiers in pharmacology*. 2012, **3**, s. 119.

BIRBEN, E., SAHINER, U. M., SACKESSEN, C., et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012, **5**(1), s. 9-19.

CAI, H. a HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000, **87**(10), s. 840-844.

COLMAN, R. W., MARDER, V. J., CLOWES, A. W., et al. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 5. vyd. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*. 2006. 1822 s. ISBN 9780781749961.

ČIHÁK, R., DRUGA, R., GRIM, M. Anatomie, třetí upr. a dopl. vyd. *Praha: Grada*. 2016. 832 s. ISBN 9788024756363.

DEANFIELD, J. E., HALCOX, J. P., RABELINK, T. J. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation*. 2007, **115**(10), s. 1285-1295.

DELFINO, R. J., STAIMER, N., VAZIRI, N. D. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. *Air Quality, Atmosphere & Health*. 2011, **4**(1), s 37-52.

- DETMERS, P. A., HERNANDEZ, M., MUDGETT, J., et al. Deficiency in Inducible Nitric Oxide Synthase Results in Reduced Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*. 2000, **165**(6), s. 3430-3435.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002, **82**(1), s. 47-95.
- DYLEVSKÝ, I. Funkční anatomie. *Praha: Grada*. 2009. 544 s. ISBN 9788024732404.
- ELAHI, M. M., KONG, Y. X., MATATA, B. M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009, **2**(5), s. 259-269.
- EMINI VESELI, B., PERROTTA, P., GREGORY, R. A., et al. Animal models of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2017 [cit. 2017-08-12]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.010. ISSN 00142999. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299917303205>.
- ESPER, R. J., NORDABY, R. A., VILARIÑO, J. O., et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular diabetology*. 2006, **5**(1), s. 4.
- FARACI, F. M. a DIDION, S. P. Vascular Protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004, **24**(8), s. 1367-1373.
- FÖRSTERMANN, U. a SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2012, **33**(7), s. 829-837.
- FUKAI, T., GALIS, Z. S., MENG, X. P., et al. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1998, **101**(10), s. 2101.
- FUKAI, T., FOLZ, R. J., LANDMESSER, U., et al. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2002, **55**(2), s. 239-249.
- FUKAI, T. a USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011, **15**(6), s. 1583-1606.
- GETZ, G. S. a REARDON, C. A. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver and artery wall. *Journal of lipid research*. 2009, **50**, s. S156-S161.

- GETZ, G. S. a REARDON, C. A. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. 2012, **32**(5), s. 1104-1115.
- GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, **115**(3), s. 500-508.
- HADI, H. A, CARR, C. S., AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy and outcome. *Vascular health and risk management*. 2005, **1**(3), s. 183-198.
- HAJJAR, D. P. a GOTTO, A. M. Biological Relevance of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Arterial Diseases. *The American Journal of Pathology*. 2013, **182**(5), s. 1474-1481.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006, **141**(2), s. 312-322.
- HECK, D. E., SHAKARJIAN, M., KIM, H. D., et al. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010, **1203**(1), s. 120-125.
- HO, Y. S., XIONG, Y. E., WANCHAO, M. A., et al. Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**(31), s. 32804-32812.
- HO, E., GALOUGAHI, K. K., LIU, C. C., et al. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox biology*. 2013 **1**(1), 483-491.
- HLÚBIK, P., STRÍTECKÁ, H., FAJFROVÁ, J. Antioxidanty v klinické praxi. *Praktické lékařství*. 2007, **2**(6), s. 254-256.
- CHERUBINI, A., VIGNA, G. B., ZULIANI, G., et al. Role of anti-oxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Current pharmaceutical design*. 2005, **11**(16), s. 2017-2032.
- CHMÁTALOVÁ, Z. a SKOUMALOVÁ, A. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2014, **22**(4), s. 189-195.
- IDRISS, N. K., BLANN, A. D., LIP, G. Y. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008, **52**(12), s. 971-978.
- ISHIBASHI, S., HERZ, J., MAEDA, N., et al. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein

receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, **91**(10), s. 4431-4435.

JABOR, A., FENCLOVÁ, E., FRANEKOVÁ, J., et al. Vnitřní prostředí. *Praha: Grada*. 2008. 530 s. ISBN 9788024712215.

JAWIEN, J., NASTALEK, P., KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology*. 2004, **55**(3), s. 503-517.

KABEL, A. M. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. 2014, **2**(3), s. 35-38.

KANG, D. H. a KANG, S. W. Targeting cellular antioxidant enzymes for treating atherosclerotic vascular disease. *Biomolecules Therapeutic*. 2013, **21**(2), s 89-96.

KARÁSEK, D., VAVERKOVÁ, H., HALENKA, M., et al. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*. 2004, **9**, s. 450-453.

KARETOVÁ, D. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína*. 2002, **3**, s. 119-122.

KAWAMURA, K., ISHIKAWA, K., WADA, Y., et al. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. 2005, **25**(1), s. 155-160.

KHAMBATA, R. S., GHOSH, S. M., RATHOD, K. S., et al. Antiinflammatory actions of inorganic nitrate stabilize the atherosclerotic plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, **114**(4), s. E550-E559.

KLEINBONGARD, P., DEJAM, A., LAUER, T., et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003, **35**(7), s. 790-796.

KUHLENCORDT, P. J., CHEN, J., HAN, F., et al. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2001, **103**(25), s. 3099-3104.

LEE, Y. T., LIN, H. Y., CHAN, Y. W. F., et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids in health and disease*. 2017, **16**(1), s. 12.

- LEIVA, E., WEHINGER, S., GUZMÁN, L., et al. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis. In *Hypercholesterolemia* [online]. 2015 [cit. 2017-06-14]. DOI: 10.5772/59375. ISBN 9789535121695. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/hypercholesterolemia/role-of-oxidized-ldl-in-atherosclerosis>.
- LI, H., HORKE, S., FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014, **237**(1), s. 208-219.
- LIDDER, S. a WEBB, A. J. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *British journal of clinical pharmacology*. 2013, **75**(3), s. 677-696.
- LIN, Q., WEIS, S., YANG, G., et al. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(28), s. 20621-20633.
- LUKÁŠ, K. a ŽÁK, K. Chorobné znaky a príznaky 2: 35 vybraných znakov, príznakov a niektorých dôležitých laboratorných ukazateľů v 32 kapitolách s prologem a epilogem. *Praha: Grada*. 2011. 328 s. ISBN 9788024737287.
- LUNDBERG, J. O., GLADWIN, M. T., AHLUWALIA, A., et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol*. 2009, **5**(12), s. 865–869.
- MAHMOOD, T. a YANG, PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 2012, **4**(9), s. 429-434.
- MEILHAC, O., ZHOU, M., SANTANAM, N., et al. Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *Journal of Lipid Research*. 2000, **41**(8), s. 1205-1213.
- MERKUNOVÁ, A. a OREL, M. Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory. *Praha: Grada*. 2008. 304 s. ISBN 9788024715216.
- MERTENS, A. N. N. a HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB journal*. 2001, **15**(12), s. 2073-2084.
- MICHIELS, C. Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology*. 2003, **196**(3), s. 430-443.

- MORITA, T. Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. 2005, **25**(9), s. 1786-1795.
- OMAR, S. A., WEBB, A. J., LUNDBERG, J. O., et al. Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of internal medicine*. 2016, **279**(4), s. 315-336.
- PHAM-HUY, L. A., HE, H., PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2008, **4**(2), s. 89-96.
- PIŤHA J. Rizikové faktory aterosklerózy u žen. *Interní Medicína*. 2011, **13**(6), s. 241–243.
- QIN, Z., RESZKA, K. J., FUKAI, T., et al. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Translational Research*. 2008, **151**(2), s. 68-78.
- RACEK, J. a HOLEČEK, V. Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy*. 1999, **93**, s. 774-780.
- RACEK, J., EISELT, J., FRIEDECKÝ, B., et al. Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd. *Praha: Galén*. 2006. 329 s. ISBN 8072623249.
- RAHMAN, T., HOSEN, I., ISLAM, M. T., et al. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012, **3**(07), s. 997-1019.
- RAJENDRAN, P., RENGARAJAN, T., THANGAVEL, J., et al. The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*. 2013, **9**(10), s. 1057-1069.
- RASSAF, T., HEISS, C., MANGOLD, S., et al. Vascular formation of nitrite after exercise is abolished in patients with cardiovascular risk factors and coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010, **55**(14), s. 1502-1503.
- ROCHA, V. Z. a LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2009, **6**(6), s. 399-409.
- ROSENSON, R. S. a STAFFORINI, D. M. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *Journal of lipid research*. 2012, **53**(9), s. 1767-1782.

- RYTER, S. W. a CHOI, A. J. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological reviews*. 2006, **86**(2), s. 583-650.
- SHAH, A. M. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2000, **45**(1), s. 148-155.
- SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S., et al. Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany* [online]. 2012 [cit. 2017-06-27]. DOI: 10.1155/2012/217037. ISSN 2090-0120. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/>.
- SHU, X., KELLER, T. S., BEGANDT, D., et al. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cellular and molecular life sciences*. 2015, **72**(23), s. 4561-4575.
- SCHULZE, P. CH. a LEE, R. T. Oxidative stress and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2005, **7**(3), s. 242-248.
- SCHNABEL, R. a BLANKENBERG, S. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease: Successful Translation From Bench to Bedside? *Circulation*. 2007, **116**(12), s. 1338-1340.
- SINGH, U. a JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*. 2006, **13**(3), s. 129-142.
- SOYDINÇ, S., ÇELİK, A., DEMIRYÜREK, S., et al. The relationship between oxidative stress, nitric oxide, and coronary artery disease. *European Journal of General Medicine*. 2007, **4**(2), s. 62-66.
- STOCKER, R. a KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*. 2004, **84**(4), s. 1381-1478.
- STOCKER, R. a PERRELLA, M. A. Heme oxygenase-1. *Circulation*. 2006, **114**(20), s. 2178-2189.
- TROJAN, S., LANGMEIER, M., HRACHOVINA, V., et al. Lékařská fyziologie. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 2003. 772 s. ISBN 8024705125.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*. 2003, **552**(2), s. 335-344.
- VOHNOUT, B. a RAŠLOVÁ, K. Rizikové faktory rozvoja aterosklerózy: lipidy a ich vzťah k ateroskleróze. *Via pract.* 2009, **6**(3), s. 116-119.

VOGIATZI, G., TOUSOULIS, D., STEFANADIS, CH. "The role of oxidative stress in atherosclerosis." *Hellenic J Cardiol.* 2009, **50**(5), s. 402-409.

VRABLÍK, M., JANOTOVÁ, M., MOTYKOVÁ, E., et al. Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Medicína pro praxi.* 2011, **8**(3), s. 119-122.

WANG, C. Y. a CHAU, L. Y. Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Chang Gung Med J.* 2010, **33**(1), s. 13-24.

WEVER, R. M., LÜSCHER, T. F., COSENTINO, F., et al. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 1998, **97**(1), s. 108-112.

WEYDERT, CH. J., CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols.* 2010, **5**(1), s. 51-66.

WHEELER, J. B., JONES, J. A., IKONOMIDIS, J. S. Aortic extra cellular matrix (ECM) remodeling. *Cardiac Regeneration and Repair* [online]. 2014 [cit. 2017-08-12]. DOI: 10.1533/9780857096715.3.315. ISBN 9780857096593. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978085709659350013X>.

WU, B. J., KATHIR, K., WITTING, P. K., et al Antioxidants protect from atherosclerosis by a heme oxygenase-1 pathway that is independent of free radical scavenging. *Journal of Experimental Medicine.* 2006, **203**(4), s. 1117-1127.

YAMADA, N. Atherosclerosis and Oxidative Stress. *Journal of the Japan Medical Association.* 2001, **44**(12), s. 529-534.

YEADON J. Which JAX mouse model is best for atherosclerosis studies: Apoe or Ldlr knockout mice? [online]. 2015 [cit. 2017-06-15]. Dostupné z: https://www.jax.org/news-and-insights/jax_blog/2013/november/which-jax-mouse-model-is-best-for-atherosclerosis-studies-apoe-or-ldlr-knoc.

YOSHIKAWA, T. a NAITO, Y. What is oxidative stress? *Japan medical association journal.* 2002, **45**(7), s. 271-276.

ZADELAAR, S., KLEEMANN, R., VERSCHUREN, L., et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2007, **27**(8), s. 1706-1721.

ZEGARAC, J. P. Oxidative Stress: Effects on Lipids, Proteins, and DNA [online]. 2015 [cit. 2017-06-10]. Dostupné z: <https://brunswicklabs.com/blog/oxidative-stress-effects-on-lipids-proteins-and-dna/>.

ZEMAN, K. a POPIŠIL, L. Ateroskleróza dnes. *Universitas*. 2003. **1**, s. 37-45.