

Středoškolská odborná činnost

Role L-argininu v regulaci produkce oxidu dusnatého
u vaskulárních endoteliálních buněk

Monika Rozehnalová

Brno 2012

Středoškolská odborná činnost

Obor 06 – Zdravotnictví

Role L-argininu v regulaci produkce oxidu dusnatého
u vaskulárních endoteliálních buněk

*(The role of L-arginine in regulation nitric oxide production
in vascular endothelial cells)*

Autor: Monika Rozehnalová

Škola: Gymnázium, Brno-Řečkovice, Terezy Novákové 2,

Brno - 621 00, Terezy Novákové 2

Konzultant: Mgr. Michaela Pekarová, Ph.D.

Brno 2012

Kraj Jihomoravský

Prohlašuji, že jsem práci vykonala samostatně pod vedením konzultantky Mgr. Michaely Pekarové, Ph.D. a v seznamu literatury jsem uvedla veškerou použitou literaturu a další informační zdroje.

V Brně dne 20. února 2012

Podpis:

V první řadě bych ráda poděkovala Mgr. Michaele Pekarové, Ph.D. z Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně za vstřícný přístup a ochotu při konzultacích méjí Středoškolské odborné činnosti. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Haně Martiškové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Michalu Kuňákovi, Ph.D. za vstřícný přístup a podnětné připomínky při zpracování méjí práce.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.

Anotace

Jednou ze základních funkcí vaskulárních endoteliálních buněk je produkce oxidu dusnatého, který reguluje řadu fyziologických procesů spojených zejména s udržením vaskulární homeostáze. Do tohoto procesu je zapojena aminokyselina L-arginin, která slouží jako jediný známý substrát pro syntézu oxidu dusnatého a tedy pro tvorbu oxidu dusnatého v endoteliálních buňkách. V případě, že dochází k snížení produkce oxidu dusnatého a také redukcí jeho biologické dostupnosti, může v organismu docházet ke vzniku endoteliální dysfunkce.

Cílem práce bylo přinést nové informace o roli L-argininu v regulaci fyziologických i patofyziologických funkcí vaskulárních endoteliálních buněk spojených se vznikem endoteliální dysfunkce jak na orgánové úrovni (myší aorty), tak na úrovni buněčné (lidské endoteliální buňky).

V myším modelu byl sledován vliv různých koncentrací L-argininu a zánětlivé stimulace na vybrané parametry, zejména na produkci oxidu dusnatého (Griessova metoda), expresi a aktivaci syntézy oxidu dusnatého a expresi receptorů spojených s aktivací endoteliálních buněk (Western blot). Experimenty byly poté doplněny pomocí *in vitro* modelu lidských endoteliálních buněk, u kterých byly sledovány stejné parametry.

Experimenty ukázaly, že samotné zvýšení koncentrace L-argininu u myší nemá za následek zvýšení produkce oxidu dusnatého v plasmě. K významnému nárůstu produkce oxidu dusnatého dochází pouze při spolupůsobení bakteriálního endotoxinu. U lidských endoteliálních buněk se tato data potvrdila s použitím acetylcholinu jako aktivátoru. U myších aort se navíc prokázalo, že expozice endoteliálních buněk zvýšené koncentraci L-argininu má za následek ovlivnění exprese receptorů spojených s G-proteinem.

Práce dokumentuje unikátní roli L-argininu v regulaci fyziologických funkcí endoteliálních buněk, zejména u myšího modelu. Na základě prezentovaných výsledků lze říci, že tento efekt L-argininu je částečně nezávislý na produkci oxidu dusnatého.

Klíčová slova: L-arginin, oxid dusnatý, endoteliální buňky, eNOS, endoteliální funkce

Annotation

Endothelial cells play a key role in regulating blood flow by producing nitric oxide. Nitric oxide regulates variety of physiological functions, which are associated with regulation of endothelial homeostasis. L-arginine, as the only know substrate for nitric oxide synthesis, is also directly involved in these processes. Generally, it is accepted that the majority of functional defects of vascular endothelium are associated with impaired activity of endothelial nitric oxide synthase activity. This process is followed by reduced generation of nitric oxide and deregulation of endothelial functions.

The aim of this study is to characterize molecular mechanism involved in L-arginine mediated regulation of endothelial cell physiology and to settle the controversy over whether L-arginine plays a key role in endothelial dysfunction on the level of organ (mice aortas) and on the level of cells (human endothelial cells).

In this study, mice model of peritoneal inflammation was used. L-arginine was applied in drinking water and several parameters were evaluated. In the first experiments Griess method was used for detection of nitric oxide production. Expression and activation of endothelial nitric oxide synthase, and expression of different receptor and adhesion molecules associated with activation of endothelial cells, was detected using Western blot technique. The same parameters were measured in human endothelial cells.

Our data proved that increased concentration of L-arginine was not able to potentiate the production of NO in mice. This process was shown to be dependent on the co-activation of endothelial cells by bacterial endotoxin. Similar data were documented for human endothelial cells, where L-arginine was able to increase the NO production only in the combination with acetylcholine. Moreover, L-arginine increased the expression of adhesion molecule and receptors that are connected with G-protein.

This work documents unique role of L-arginine in regulation of physiological function of vascular endothelial cells, which is partially independent on production of NO and stimulation of cells by bacterial endotoxin or acetylcholine.

Key words: L-arginine, nitric oxide, endothelial cells, eNOS, endothelial functions

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vaskulární endoteliální buňky jako součást oběhového systému	10
2.1	Funkční organizace oběhového systému	10
2.2	Funkce a anatomie cév	10
2.3	Úlohy oběhové soustavy	13
3	Regulace fyziologických funkcí endoteliálních buněk	14
3.1	Charakteristika a funkce vaskulárního endotelu	14
3.2	Endoteliální dysfunkce.....	17
4	Metabolismus L-argininu a oxidu dusnatého ve vztahu k regulaci vaskulárních endoteliálních buněk.....	18
4.1	Princip vzniku oxidu dusnatého	18
4.2	NO-synthasy	19
4.3	L-arginin nejen jako substrát pro NO-synthasy	20
4.4	Biologické účinky oxidu dusnatého v organismu	21
5	Hypotéza	23
6	Cíle práce	24
7	Materiál.....	25
7.1	Použité pufry	25
7.2	Seznam použitých přístrojů	26
7.3	Biologický materiál.....	26
7.3.1	Izolace aort z myši C57BL/6J.....	26
7.3.2	<i>In vitro</i> kultivace lidských endoteliálních buněk (HUVEC).....	27
7.3.3	Ovlivnění lidských endoteliálních buněk L-argininem a Acetylcholinem	28
8	Metody	29
8.1	Stanovení koncentrace nitritů Griessovou metodou	29
8.1.1	Postup měření koncentrace nitritů/nitrátů	30
8.2	Stanovení koncentrace proteinů a příprava vzorků.....	30
8.2.1	Příprava vzorků pro stanovení koncentrace proteinů	30
8.2.2	Postup měření koncentrace proteinů.....	31
8.3	Stanovení exprese proteinů pomocí SDS PAGE a Western blotu	31
8.3.1	Příprava gelů.....	32
8.3.2	SDS PAGE.....	32

8.3.3	Western Blot	33
8.4	Statistické zpracování naměřených dat	34
9	Výsledky	35
9.1	L-arginin ovlivňuje produkci NO u myšičího modelu a lidských endoteliálních buněk pěstovaných <i>in vitro</i>	35
9.2	L-arginin neovlivňuje koncentraci proteinů u aort izolovaných z myši ani u lidských endoteliálních buněk	37
9.3	L-arginin ovlivňuje expresi a aktivaci eNOS u myšičích aort a lidských endoteliálních buněk.....	38
9.4	L-arginin ovlivňuje expresi proteinů důležitých pro regulaci fyziologické odpovědi endoteliálních buněk.....	40
10	Shrnutí	42
11	Závěr	44
12	Seznam použitých zkratk.....	45
13	Seznam použité literatury	47
14	Internetové zdroje	49
15	Přílohy.....	50
15.1	Použité chemikálie	50
15.2	Výstupy projektu.....	52

1 Úvod

Endoteliální buňky hrají důležitou roli v regulaci průtoku krve cévami. I když je známo mnoho mediátorů, které mohou ovlivňovat tento proces, za jeden z nejdůležitějších je považován oxid dusnatý, který je v endoteliu primárně produkován pomocí endoteliální synthasy oxidu dusnatého. Oxid dusnatý dále reguluje proliferaci vaskulární hladké svaloviny a inhibuje interakci cirkulujících krevních elementů s povrchem cév. Narušením produkce oxidu dusnatého dochází ke vzniku endoteliální dysfunkce, která může být spojena s rozvojem závažných onemocnění, jako jsou srdeční selhání, ateroskleróza a diabetes.

Aminokyselina L-arginin hraje důležitou roli v procesu regulace produkce oxidu dusnatého. Jelikož je jediným doposud známým substrátem pro syntasu oxidu dusnatého a tedy i produkci oxidu dusnatého, můžeme předpokládat jeho význačné postavení v procesu vzniku endoteliální dysfunkce. Klinické studie prokázaly, že L-arginin je významně zapojen do regulace dýchacích cest, kardiovaskulárního a imunitního systému. Důležitým faktem je, že molekulární mechanismy zapojené v regulaci endoteliálních buněk L-argininem, zůstávají i nadále neobjasněny.

2 Vaskulární endoteliální buňky jako součást oběhového systému

2.1 Funkční organizace oběhového systému

Srdce s cévami vytváří jednotný kardiovaskulární oběhový systém. Skládá se z velkého (systémového, periferního) a malého (plicního, centrálního) krevního oběhu. Velký krevní oběh je poháněn levou komorou a je složen z řady paralelně zapojených okruhů, vyživujících jednotlivé orgány - srdce, mozek, ledviny, svalstvo, žaludek a střeva. Minutový průtok krve se tedy rozděluje mezi tyto orgány. Malý krevní oběh je poháněn pravou komorou. Z pravé komory se krev plicní tepnou dostává do plic, kde se okysličuje. Díky zapojení do série s velkým krevním oběhem, dostává malý krevní oběh minutový průtok krve celý (Vácha a kol., 2002).

Některé orgány, jako jsou mozek a srdce, mají při zásobení krví prioritu. Dostatečné zásobení mozku je udržováno konstantním průtokem krve. Jde o životně důležitý orgán, který je zvláště citlivý na nedostatek kyslíku. Prokrvení srdečního svalu koronárními cévami se musí přizpůsobit aktuální situaci, při fyzické zátěži se prokrvení několikanásobně zvyšuje. Jinak by nastalo selhání celého oběhového systému. Proto při oběhovém selhání může být dočasně omezeno prokrvení kůže, ledvin či střeva ve prospěch srdce a mozku (Vácha a kol., 2002).

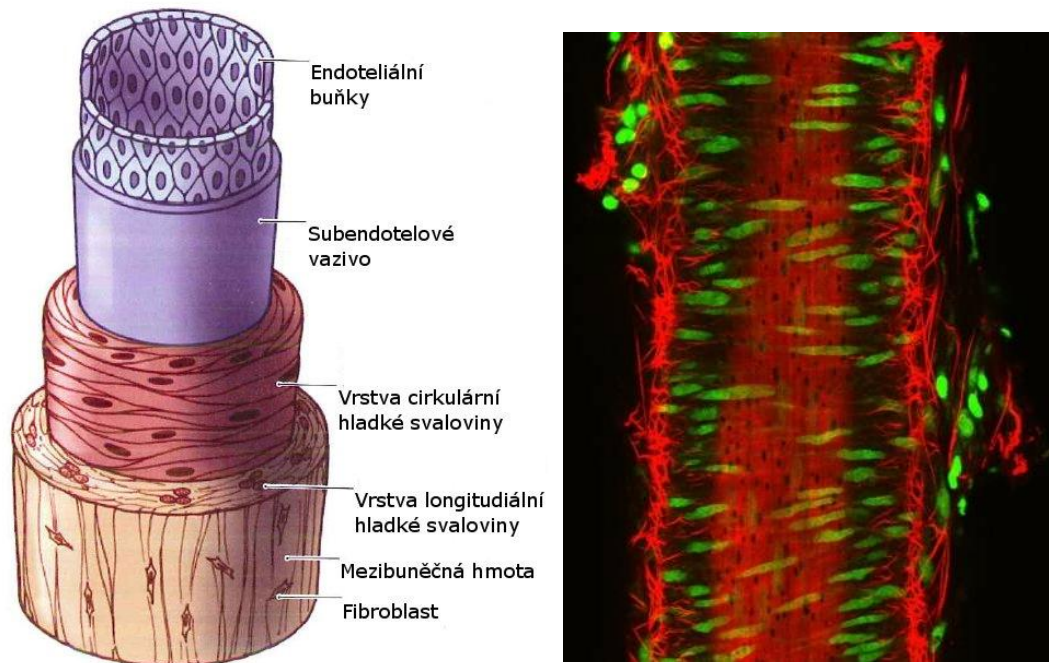
2.2 Funkce a anatomie cév

Cévy představují uzavřenou soustavu pružných trubic různého průsvitu, kterými je rozváděna krev do celého těla. Cévy dělíme na tepny (*arterie*), žíly (*veny*) a vlásečnice (*kapiláry*) (Prachařová, 2006). Z anatomického pohledu rozlišujeme ve stěnách cév tři vrstvy, jejichž zastoupení a mocnost se liší podle typu cévy (Vácha a kol., 2002). Rozvoj jednotlivých struktur cévní stěny je pak dán funkčními faktory, které jsou pro jednotlivé úseky cévního řečiště odlišné (Prachařová, 2006).

Jednotlivé vrstvy cévní stěny:

- **vnější vrstva** (*tunica externa*) je tvořena adventicií a zevní elastickou membránou. Adventicie je vazivová vrstva tvořená sítí elastických a kolagenových vláken, která mají význam pro mechanické vlastnosti cévní stěny a pro pružné zakotvení cévy v jejím okolí (*Trojan a kol., 2003*).
- **střední vrstva** (*tunica media*) je tvořena převážně hladkou svalovinou. Změnou tonu hladké svaloviny se mění průsvit cévy (vazodilatace a vazokonstrikce) (*Trojan a kol., 2003*).
- **vnitřní vrstva** (*tunica intima*) je tvořena hladkou vrstvou endotelových buněk, které jsou vystavené přímému mechanickému působení krevního proudu. Endotel umožňuje plynulé a nerušené proudění krve, působí antitromboticky. Součástí vnitřní vrstvy je také subendotelové vazivo, které zabraňuje jejímu odtržení vlivem proudění krve (*Horký a Čech, 1999*).

Jednotlivé vrstvy cévy jsou schematicky znázorněny na obr. č. 1 vlevo. Na obr. č. 1 vpravo je mikroskopický preparát cévy se zeleně označenými endoteliálními buňkami. Obrázek č.1 vpravo byl pořízen pomocí konfokálního mikroskopu.



Obr. č. 1: Struktura cévy. (vlevo) Schematické znázornění jednotlivých vrstev cévy (upraveno podle *Lippincott Williams & Wilkins, 2011*). (vpravo) Obrázek z konfokálního mikroskopu znázorňující aortu izolovanou z myši. Červenou fluorescenční barvou je označený elastin, zelenou fluorescenční barvou jsou zobrazeny endoteliální buňky (převzato z *URL 1*).

Arterioly se skládají z endotelové výstelky a tenké vrstvy hladké svaloviny. Výrazně se podílejí na regulaci periferního odporu, a proto v nich krevní tlak a průtok značně kolísají. Arterioly jsou schopny výrazně měnit svůj průsvit (díky aktivitě hladké svaloviny ve stěnách) a tím aktivně zasáhnout do řízení prokrvení tkání (vazomotorické řízení). Vasomotorické řízení využívá vazodilatace (uvolnění a rozšíření cévy) a vazokonstrikce (stažení, zmenšení průměru). Průsvit arterioli určuje aktuální průtok krve kapilární sítí, která navazuje na arterioly, a tím i určuje prokrvení jednotlivých orgánů a celkovou distribuci krve v těle.

Kapiláry se skládají pouze z jednovrstevného endotelu. Představují styčnou plochu mezi krví a tkáněmi. Probíhá zde přesun plynů a živin z krve do intersticia (mezibuněčných prostor) a naopak. Průtok krve je zde konstantní, což je pro výměnu látek důležité.

Žíly jsou kapacitní cévy, které díky roztažnosti a velkému průsvitu mohou pojmout značný objem krve. Slouží jako rezervoár krve, který je nutný k vyrovnávání kolísajícího krevního tlaku v uzavřeném cirkulačním systému (Vácha a kol., 2002).

2.3 Úlohy oběhové soustavy

Hlavními úkoly oběhového systému je zajišťovat rychlý transport látek na větší vzdálenosti (Trojan a kol., 2003). Je to zejména transport kyslíku a živin do tkání, odstranění oxidu uhličitého a dalších metabolitů ze tkání, rozvod signálních molekul (hormonů), tepla a podpora obranných reakcí krevních elementů (fagocytóza mikroorganismů) (Vácha a kol., 2002). Navíc, oběhový systém zabezpečuje komunikaci mezi jednotlivými buňkami a tkáněmi v organismu a zprostředkovává i jejich efektivní spojení s okolním prostředím. Tímto se oběhový systém podílí na udržení stálosti vnitřního prostředí buněk i orgánů (Vácha a kol., 2002).

V průběhu evoluce se u obratlovců vyvinuly regulační mechanismy, které se specializovaly na zabezpečení místních požadavků na průtok krve nebo na funkci oběhového systému jako celku. Tyto mechanismy lze rozdělit podle oblasti působení na místní a centrální.

Rozdělení regulačních mechanismů:

- **místní:** hladká svalovina arteriol reaguje na lokální podmínky a podměty, tím je podle místních potřeb řízen průtok krve jednotlivými tkáněmi a orgány
- **centrální:** hladká svalovina reaguje na pokyny celkových regulačních mechanismů z mozku a tak udržuje stálý tlak krve při neustálých změnách průtoku jednotlivými orgány v důsledku změn jejich potřeby prokrvení (Trojan a kol., 2003).

3 Regulace fyziologických funkcí endoteliálních buněk

3.1 Charakteristika a funkce vaskulárního endotelu

Endotel, tvořený endoteliálními buňkami, je rozsáhlý a velmi aktivní endokrinní orgán, který udržuje homeostázi ve vnitřním prostoru cév a zabezpečuje tak neporušený tok krve (Karásek a kol., 2004). Jednou z jeho hlavních funkcí je regulace průsvitu tepny v závislosti na aktuálních nárocích vyživovaných tkání na dodávku kyslíku, živin a odplavení vznikajícího oxidu uhličitého a dalších metabolitů. Například při intenzivní fyzické aktivitě dochází i k několikanásobnému zvýšení průtoku krve kosterními svaly, což má za následek zvýšení lineární rychlosti toku krve. Tyto okolnosti vedou k tzv. vazodilataci (rozšíření cévy), která je zprostředkována cévním endotelem. Endotel následně začne produkovat různé vazodilatační působky (Horký a Čech, 1999; Karásek a kol., 2004). Nejdůležitější vazodilatační a vazokonstrikční působky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

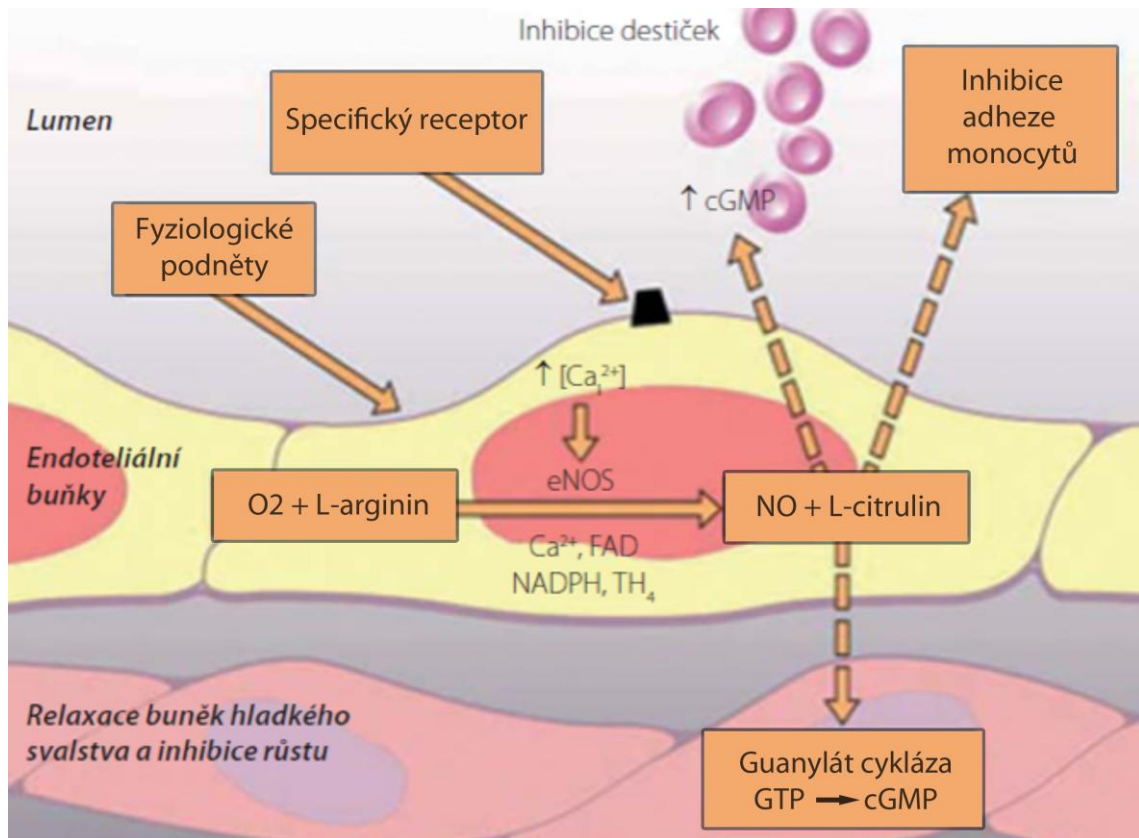
Působek	Účinek
NO	Vazodilatace
Prostacyklin	Vazodilatace, zabraňuje agregaci trombocytů
Endotelin-1	Vazokonstrikce
Enzym konvertující angiotensin	Vazokonstrikce
tPA	Ovlivňuje fibrinolýzu
Tromboxan A2	Vazokonstrikce, agregace trombocytů
Cytokiny, adhezní molekuly	Regulace zánětlivých a imunitních procesů
Trombomodulin	Kontrola srážení
Von Willbrandův faktor	Protrombotický efekt
PDGF, FGF, CSF, TNF- α	Stimulátory růstu (cév a hladkého svalu)

Tab. č. 1: Působky ovlivňující fyziologii kardiovaskulárního systému. tPA, tissue plasminogen aktivátor; PDGF, platelet-derived growth factor; FGF, fibroblast growth factor; CSF, colony-stimulating factor, TNF- α

Neméně důležitým úkolem endotelu je regulace adheze imunitních buněk. Endoteliální buňky na svém povrchu totiž za specifických podmínek mohou exprimovat tzv. cytoadhezivní molekuly (jako je např. I-CAM, intracellular adhesion molecule 1), které usnadňují přestup leukocytů z krve do tkání. Aktivním pootevřením mezibuněčných spojů mohou endoteliální buňky posléze umožnit průchod imunitních buněk i různých makromolekul do intersticia. Tento proces nastává za určitých specifických podmínek, kdy dochází k aktivaci endoteliálních buněk například v přítomnosti cizorodých organismů, ale také po působení různých prozánětlivých mediátorů, jako jsou cytokiny, produkované aktivovanými imunitními buňkami (*Hořejší a Bartůňková, 2005*).

Na povrchu endotelu se navíc nachází celá řada receptorů, které po aktivaci mohou výrazným způsobem zasahovat do spouštění intracelulárních drah souvisejících i s produkcí oxidu dusnatého (NO) (např. calcium sensing receptor, CaSR; G-protein coupled receptor 6A, GPCR6A; endotelinový receptor typu A, ET_A; endotelinový receptor typu B, ET_B). Kromě toho se endoteliální buňky podílejí na koagulačních a trombolytických pochodech, secernací prokoagulačních a antikoagulačních a trombolytických působků. Další funkcí endoteliálních buněk je produkce růstových faktorů v embryonálním období, které podporují angiogenezi (*Malík a Šimek, 2003*).

Důležitá situace nastává v případě deregulace výše uvedených mechanismů, které poté mohou vést ke vzniku endoteliální dysfunkce, popsané podrobněji v další kapitole.

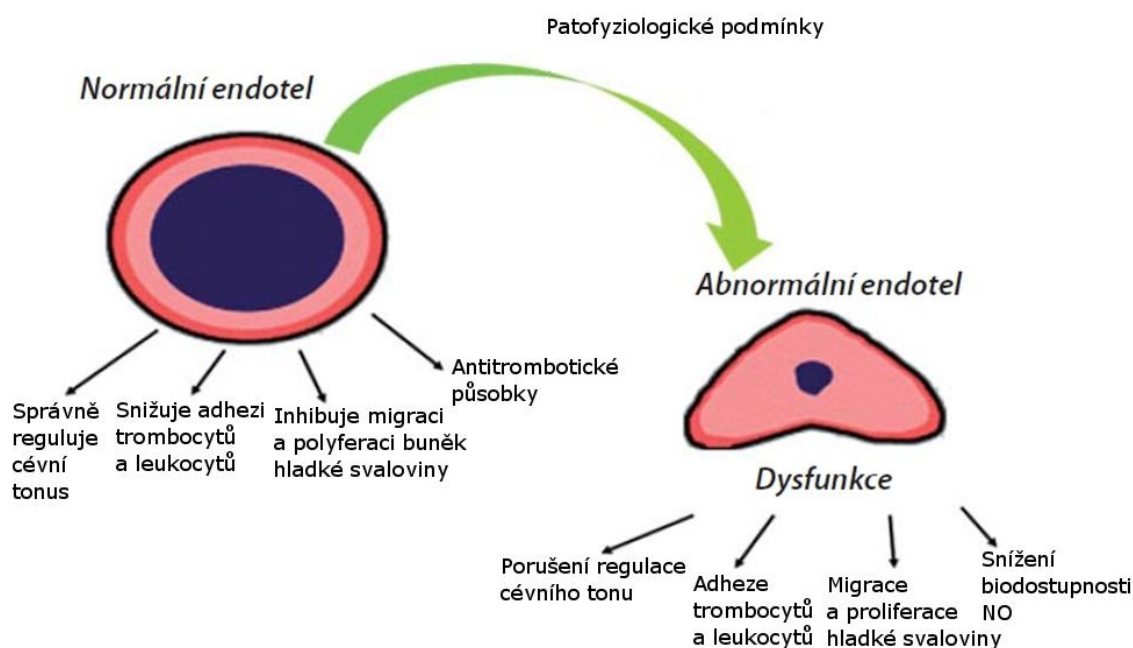


Obr.č.2: Základní fyziologické funkce endoteliálních buněk.

Endoteliální buňky v cévě reagují na různé fyziologické podněty, což může vést ke změnám v produkci NO. Zvýšením jeho produkce se endoteliální buňky podílí na relaxaci hladké svaloviny, inhibici agregace destiček a adheze monocytů (flavin adenine dinucleotide, FAD; flavin mononucleotide, FMN; tetrahydrobiopterin, BH₄; guanozín-5'-trifosfát, GTP; cyklický guanozín-3',5'-monofosfát, cGMP) (upraveno podle Vrablík a kol., 2011).

3.2 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční postižení vaskulárního endotelu, které vede ke vzniku nerovnováhy mezi vazokonstrikčními mechanizmy a hemokoagulačními působky. Výsledkem je převaha vazokonstrikčních, protrombotických a aterogenních mechanismů, které nežádoucím způsobem zvyšují propustnost cévní stěny (Karásek a kol., 2004). Klíčovým faktorem je snížení biologické dostupnosti NO (důležitého pro relaxaci cév), které je komplementárně spojeno s rozvojem endoteliální dysfunkce. Známa je celá řada příčin, které mohou vést k rozvoji dysfunkce (např. inhalace tabákového kouře, nedostatek kyslíku v organismu, působení cytostatik a ionizujícího záření). (obr. č. 3). K poškození endotelu rovněž přispívají různé patofyziologické stavy jako vysoký krevní tlak, turbulentní proudění v tepnách, infiltrace endotelu imunokomplexy a poruchy vzniklé nadměrným hromaděním organických látek (Šípek a kol., 2000).



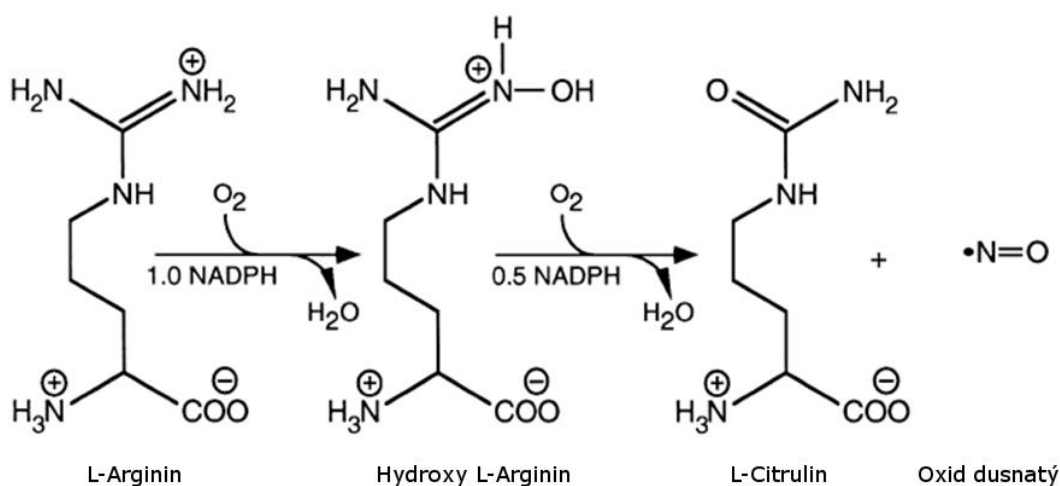
Obr. č. 3: Vznik a důsledky endoteliální dysfunkce. Endoteliální dysfunkce nastává za podmínek nerovnováhy vazokonstrikčních a vazodilatačních látek. Tato nerovnováha způsobena působením různých faktorů se projevuje sníženou biologickou dostupností NO, což je spojeno s nedostatečnou relaxací cév, zvýšenou adhezí trombocytů a leukocytů na její povrch, migrací a nadměrnou proliferací hladké svaloviny (upraveno podle Vrablík a kol., 2011).

4 Metabolismus L-argininu a oxidu dusnatého ve vztahu k regulaci vaskulárních endoteliálních buněk

4.1 Princip vzniku oxidu dusnatého

NO je v endoteliálních buňkách produkován zejména jako faktor indukující relaxaci cév. Z tohoto důvodu sehrává velmi podstatnou roli při vzniku patofyziologických stavů, které jsou spojeny rozvojem endoteliální dysfunkce a snížením jeho biologické dostupnosti. Proto je tato kapitola věnována podrobnějšímu popisu metabolismu NO a také metabolismu L-argininu, který je prozatím jediným známým substrátem pro jeho tvorbu.

NO je radikál, který vzniká z guanidinové skupiny přítomné na L-argininu (Obr.č.4). Je rozpustný ve vodě i v lipidech a díky tomu se snadno dostává přes cytoplazmatické membrány (Hořejší a Bartůňková, 2005). Má jeden volný elektron a je velice reaktivní, biologický poločas je 4 sekundy (Murray a kol., 2002). Převážná část buněk lidského i zvířecího organismu je schopna syntetizovat NO. I když se NO může v některých tkáních tvořit při redukci NO_2^- , převážně vzniká při proměně L-argininu na L-citrulin (Krejčová, 2005).



Obr. č. 4: Chemická rovnice popisující tvorbu NO. Schéma popisuje oxidaci L-argininu na meziprodukt Hydroxy-L-arginin a následně vznik konečných produktů reakce, L-citrulinu a NO (upraveno podle Andrew a Mayer, 1999).

NO může v buňkách cév vznikat z esterů kyseliny dusičné nebo dusité a toho se využívá při léčbě ischemické srdeční choroby. Mnohé často používané látky při léčbě angina pectoris (např. glyceroltrinitrát) způsobují zvýšení tvorby NO, který zprostředkuje vasodilataci (*Táborská a kol., 2003*).

Za fyziologických podmínek se NO tvoří v organismu v nízkých koncentracích (pM), a v tomto případě převládá spíše jeho regulační působení (aktivace enzymu guanylát cyklázy a zvyšování koncentrace cyklického guanozín-3',5'-monofosfátu (cGMP) v cílových buňkách, inhibice syntézy DNA, regulace metabolismu železa) (*Ledvina a kol., 2006*).

V případě aktivace imunitních buněk (zejména pak profesionálních fagocytů) je NO produkován v relativně vysokých koncentracích (μM) a účastní se protizánětlivých, antibakteriálních, antivirálních a antioxidačních procesů (*Gallová, 2001*).

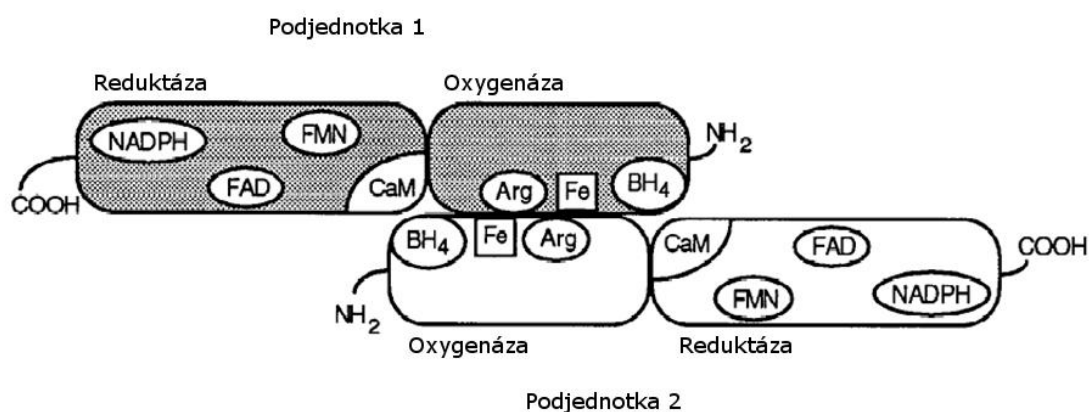
4.2 NO-synthasy

Tvorba NO odvozená od L-argininu je katalyzovaná orgánově i buněčně specifickými enzymy, NO-synthasami. Jednotlivé podtypy NO-synthas jsou rozdělovány zejména podle druhu buněk, ve které k syntéze NO dochází.

Typy NO-synthas:

1. indukovatelná NO-synthasa (iNOS) – je exprimována zejména v imunitních buňkách, NO takto produkován má za úkol zejména ochranu organismu před patogenem
2. endoteliální NO-synthasa (eNOS) – je exprimována v cévním, plicním, i renálním epitelu, v kardiomyocytech, v trombocytech a hipokampu, úloha NO produkováného eNOS je regulace vazodilatace
3. neuronová NO-synthasa (nNOS) - se nachází zejména v nervové tkáni a v kosterní svalovině, NO produkováný tímto podtypem synthasy slouží převážně k mezibuněčné komunikaci (*Krejčová, 2005*).

NO-synthasy se navíc rozdělují podle jejich závislosti na změně intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů. Zatímco eNOS a nNOS jsou v buňkách exprimovány konstitutivně a jejich aktivace je závislá na zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů, iNOS jako indukovatelná forma NO-synthasy je na tomto procesu nezávislá (Ledvina a kol., 2006). Všechny NO-synthasy vyžadují pro svou správnou funkci přítomnost několika kofaktorů znázorněných na obr. č. 5. eNOS i ostatní NO-synthasy, jsou stereospecifická (substrátem může být pouze L-arginin) (Murray a kol., 2002; Dostál a kol., 2004).



Obr.č.5: Schématický obrázek struktury NO-synthasy. Enzym je funkční jako dimer a každá podjednotka se skládá z reduktázy a oxygenázy. Na obrázku jsou patrné kofaktory (calmodulin, CaM; flavin adenine dinucleotide, FAD; flavin mononucleotide, FMN; tetrahydrobiopterin, BH₄) a substrát (L-arginin, Arg), které jsou nutné k jeho správnou funkci (upraveno podle Andrew a Mayer, 1999).

4.3 L-arginin nejen jako substrát pro NO-synthasy

L-arginin je nejbazičtější aminokyselina a obsahuje guanidinovou skupinu. Jak již bylo výše zmíněno, jeho přítomnost v organismu je klíčová pro tvorbu NO. Zajímavé je, že pro lidský organismus je esenciální pouze v období růstu, jinak je u savců syntetizován metabolickou dráhou z prolinu, glutaminu nebo glutamátu. Hojně se nachází v rostlinách, které mají schopnost jej syntetizovat ve větším množství než lidský organismus.

Za různých patofyziologických podmínek (např. endoteliální dyfunkce, astma, sepse), kdy endogenní syntéza L-argininu nepokrývá metabolickou potřebu organismu, se příjem potravy stává jeho primárním zdrojem. Proto je L-arginin označován jako semiesenciální aminokyselina (*Wu a Morris, 1998*).

L-arginin se významně podílí na syntéze proteinů, navíc jej jako substrát (kromě NO-synthas) využívá celá řada enzymů, jako jsou arginasa, arginin:glycin aminotransferasa a arginin dekarboxyláza (*Wu a Morris, 1998*). L-arginin tedy představuje potenciální nástroj, kterým lze v organismu ovlivňovat různé fyziologické funkce jak endoteliálních, tak i ostatních typů buněk.

4.4 Biologické účinky oxidu dusnatého v organismu

NO, syntetizovaný endoteliálními buňkami, byl v minulosti označován jako endotelový relaxační faktor (EDRF – endothel derived relaxing factor). Princip spouštění jeho tvorby je založen na působení různých vazodilatačních působků (např. acetylcholinu, bradykininu), které navozují relaxaci hladkých svalů cévních stěn. Tyto působky však na hladkou svalovinu nepůsobí přímo (*Murray a kol., 2002*).

V prvním kroku dochází k jejich interakci s vaskulárními endoteliálními buňkami pomocí specifických receptorů. Receptory jsou spojeny s fosfatidylinositolovým cyklem, který vede k uvolnění Ca^{2+} iontů, což má za následek aktivaci eNOS a zvýšení produkce NO. Ten difunduje do hladké svaloviny v tunica media arteriol a aktivuje cytosolovou guanylát cyklázu, zvyšující nitrobuněčnou hladinu cyklického cGMP. Pomocí působení cGMP dochází k aktivaci proteinkinasy, které následnou fosforylací specifické svalové bílkoviny způsobují relaxaci hladkých svalů (*Murray a kol., 2002*). Zvyšováním koncentrace cGMP působí NO jako inhibitor agregace a adheze krevních destiček (*Murray a kol., 2002*).

Snížená koncentrace NO je jednou z příčin hypertenze a erektilní dysfunkce. Koncentrace NO hraje roli v patofyziologii bronchiálního astmatu. Sledování hladiny vydechovaného NO se používá při kontrole bronchiálního astmatu – vysoké hodnoty NO jsou známkou zánětu v důsledku nedostatku inhibitorů iNOS. Nitrosylační činidla, vznikající autooxidací NO, mohou poškozovat deaminaci báze DNA a vyvolat tak mutace způsobující autoimunitní onemocnění diabetes 1. typu. (*Kupková a Beneš, 2004*). Aktivita NO se vysoce zvyšuje při bakteriální sepsi. Snížení NO zvyšuje cévní tonus a tím přispívá k rozvoji aterosklerózy (*Ledvina a kol., 2006*).

5 Hypotéza

L-arginin je velice důležitá aminokyselina, jejíž metabolismus je přímo spojen s nejdůležitějšími fyziologickými procesy, které se dějí v rámci vaskulárního endotelia. Jeho efekt je spojován zejména s regulací produkce oxidu dusnatého (L-arginin je jediným známým prekurzorem při jeho tvorbě), jenž kontroluje dilataci cév, zpuštění koagulační dráhy a funkci imunitních buněk. V nedávné době bylo potvrzeno, že efekt L-argininu na buněčné procesy v endoteliálních i imunitních buňkách nemusí být zprostředkován jen produkcí oxidu dusnatého. Hypotézou je, že L-arginin je schopen regulovat aktivaci specifických receptorů a spouštění různých intracelulárních signálních drah, které jsou dále spojeny se změnou exprese molekul klíčových pro funkci endoteliálních buněk.

6 Cíle práce

- 1. Sledovat efekt L-argininu na produkci NO u *in vivo* a *in vitro* modelu vaskulárních endoteliálních buněk.**
- 2. Popsat efekt L-argininu na expresi různých proteinů, které jsou významné pro základní funkce endoteliálních buněk.**
- 3. Zjistit, zda exprese proteinů a změny v buněčných procesech závisí na změně produkce NO.**

7 Materiál

Všechny použité materiály, jejich optimální koncentrace a celkové objemy reakčních směsí byly zvoleny a dále připravovány na podkladě výsledků experimentů uskutečněných v Laboratoři patofyziologie volných radikálů (BFÚ AV ČR, v.v.i.).

7.1 Použité pufrы

Lyzační pufr 6,05 g TRIS (50 mM) 10 g SDS (1%) 5,84 g NaCl (100 mM) 2 mL 0,5 M EDTA 100 ml glycerolu upravíme pH na 7,4 doplníme destilovanou vodou na 1000 ml	3x Laemli 200 mM TRIS-HCl pH 6,8 3% SDS 30% glycerol 3% β -mercaptoethanol 0,03% bromphenolová modř 200 mM dithiotriethol (DTT)	1,5 TRIS, pH 8,8 90,825 g TRIS upravíme pH na 8,8 doplníme destilovanou vodou na 500 ml uchováváme při 2-8 °c
0,5 M TRIS, pH 6,8 30,275 g TRIS upravíme pH na 6,8 doplníme destilovanou vodou na 500 ml uchováváme při 2-8 °c	5x Running pufr 15,25 g TRIS 72,1 g glycinu 5 g SDS upravíme pH na 8,3 doplníme destilovanou vodou na 1000 ml před použitím 5x naředíme	10x Transfer pufr 144,9 g glycinu 30,3 g TRIS 5 g SDS doplníme destilovanou vodou na 1000 ml před použitím 10x naředíme
10x TRIS+Tween (TBS-T) 80 g NaCl 2 g KCl 30 g TRIS 5 mL Tween-20 upravíme pH na 7,6 doplníme destilovanou vodou na 1000 ml před použitím 10x naředíme	Barvicí roztok 0,5 g amidoblack rozpustíme ve 200 mL odbarvovacího roztoku	Odbarvovací roztok 400 mL methanolu 100 mL kyseliny octové doplníme destilovanou vodou na 1000 ml

Tab. č. 2: Přehledný seznam roztoků a pufrů. Uvedené roztoky a pufrы byly použity při zpracování vzorků (elektroforéza, Western blot).

7.2 Seznam použitých přístrojů

HERA Cell CO₂ Inkubátor (Heraeus, Německo)

SPECTRA Rainbow Thermo (SLT, Rakousko)

Aparatura pro SDS-elektroforézu a Western blot (BioRad, USA)

Světelný mikroskop (Olympus, Japonsko)

Při práci bylo dále použito běžné laboratorní vybavení.

7.3 Biologický materiál

K experimentům byl využit *in vivo* model aort izolovaných ze samců myši C57BL/6J (Masarykova Univerzita, Česká republika). Myši byly chovány ve standardních podmínkách. Experimenty probíhaly v souladu s protokolem schváleným etickou komisí a v souladu s evropskými pokyny o používání laboratorních zvířat. V druhé fázi byly k *in vitro* experimentům využity lidské umbilikální žilní endoteliální buňky, HUVEC (ECACC, Velká Británie).

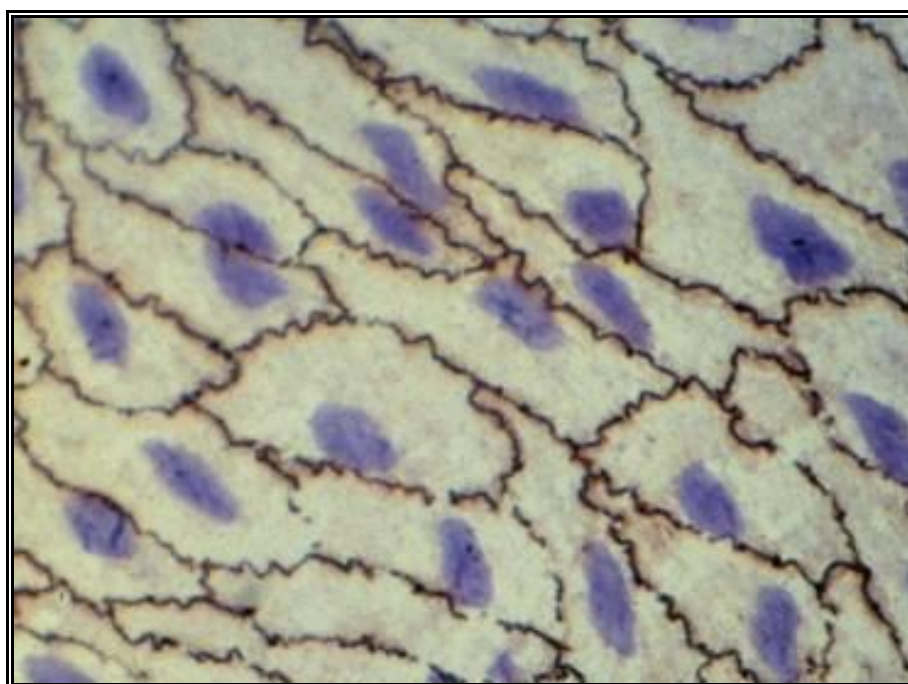
7.3.1 Izolace aort z myši C57BL/6J

Pro všechny pokusy byly využity myši (10-14 týdnů) o hmotnosti 25-30 g. Myši byly rozděleny do čtyř skupin po třech jedincích. Při experimentech byl využit model simulující bakteriální zánět v břišní dutině myši. Na tyto účely byl použit roztok Lipopolysacharidu (LPS) z *E. coli* (serotype 026:B6), který byl pro experimentální účely rozpuštěn v PBS (phosphate buffer saline).

- I. První skupina byla kontrolní. Po dobu sedmi dnů dostávala standardní dietu a poté jim byl do břišní dutiny injikován roztok PBS (1 ml).
- II. Druhou skupinu tvořily myši, které měly standardní dietu po dobu sedmi dnů. Následně jim byl do břišní dutiny injikován LPS (1 ml), aby byla dosažena koncentrace 0,3 mg/kg 1 h po aplikaci.
- III. Třetí skupina myši měla standardní dietu doplněnou o 30 mg/ml L-argininu rozpuštěného v pitné vodě. Po sedmi dnech jim byl do břišní dutiny injikován roztok PBS (1 ml).

IV. Poslední skupina myší měla standardní dietu doplněnou o 30 mg/ml L-argininu rozpuštěného v pitné vodě a po sedmi dnech jim byl do břišní dutiny injikován roztok LPS rozpuštěn v PBS (1 ml).

Po čtyřech hodinách od aplikace PBS či LPS byly všechny myši usmrceny oxidem uhličitým. Poté jim byla odebrána krev, vnitřní orgány a mimo jiné i aorty (které byly promyty, okamžitě zamrazeny v tekutém dusíku a dále skladovány při -80°C). Aorty byly dále zpracovány pro stanovení exprese vybraných proteinů pomocí standardní metody (popsané v metodice). Na obr. č. 6 je zachycen endotel u myší aorty.



Obr. č. 6: Endotelová vrstva u myší aorty. Endoteliální buňky mají tloušťku 1-2 μm a jsou 10-20 μm dlouhé. Buněčná jádra jsou umístěna především ve středu buňky (na obrázku jsou nabarveny na modro). Tmavě jsou zvýrazněny intracelulární spoje, jejichž existence je klíčová pro udržení integrity cév. Obrázek byl pořízen pomocí světelného mikroskopu (zvětšení 20 x) (převzato z *URL 2*).

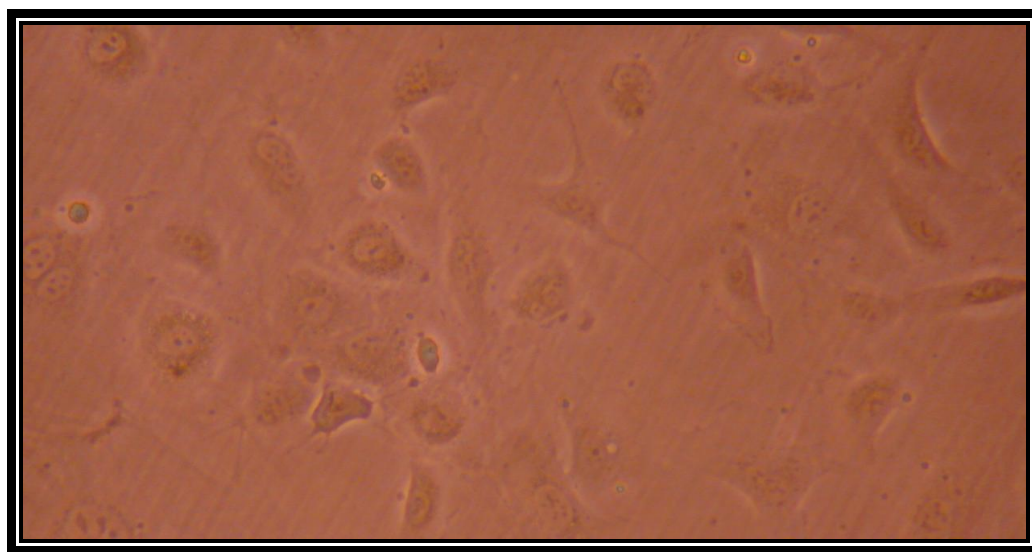
7.3.2 *In vitro* kultivace lidských endoteliálních buněk (HUVEC)

Buňky byly pěstovány v kultivačním médiu (ECL médium + růstové faktory, PAA, USA) a dvakrát týdně přeneseny do nových kultivačních nádob (75 cm^2 , PAA, USA). Při pasážování bylo nejdříve odsáto staré kultivační médium a následně byl přidán 1% trypsin + EDTA.

Po zhruba 5–10 min inkubace při 37°C, bylo k uvolněným buňkám přidáno malé množství kultivačního média. Buňky byly spočítány a po stanovení jejich životnosti, byly nasazeny do kultivačních nádob nebo vysazeny na 6 jamkové desky v koncentraci $1,5 \times 10^3$ buněk/jamka.

7.3.3 Ovlivnění lidských endoteliálních buněk L-argininem a Acetylcholinem

Po přesazení na 6 jamkové desky byly buňky dále pěstovány, dokud nedosáhly úplné konfluence (obr. č. 7). Tento proces většinou trval 2-3 dny. Po tuto dobu byly buňky nadále inkubovány v kultivačním médiu. Po dosažení konfluence bylo buňkám vyměněno médium a do některých jamek byl přidán L-arginin (1 mM). Takto vysazené buňky byly ponechány 24 h v CO₂ inkubátoru a některé z nich byly aktivovány Acetylcholinem (1 μM). Aktivace probíhala v časovém rozmezí 0-10 min. Následně byly buňky zlyzovány na ledě pomocí lyzačního roztoku a desky zamraženy na -80°C.

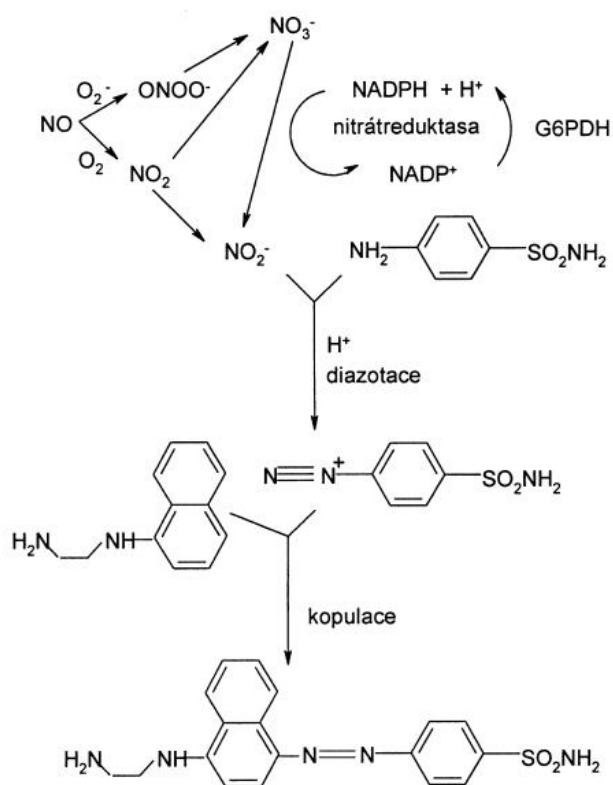


Obr. č. 7: Lidské endoteliální buňky (HUVEC). Buňky v den po vysazení na 6 jamkové desky. Obrázek byl pořízen pomocí světelného mikroskopu (zvětšení 20 x).

8 Metody

8.1 Stanovení koncentrace nitritů Griessovou metodou

NO je *in vivo* a *in vitro* tvořen v malém množství a rychle reaguje s kyslíkem, thioley, hemoglobinem a jinými látkami za tvorby jeho konečných metabolitů (nitritů a nitrátů). V práci byla využita zejména metoda nepřímého stanovení, která je založena na spektrofotometrickém stanovení nitritů po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s N-(1-naftyl)ethylendiaminem s detekcí při oblasti 540 nm (*Kupková a Beneš, 2004*) (viz obr. č. 8). V biologických vzorcích musí být nitráty, vzniklé reakcí NO s hemoglobinem, zpět redukovány na nitrity, čímž zajistíme stanovení celkové hladiny oxidačních produktů NO.



Obr. č. 8: Oxid dusnatý při Griessově reakci. Autooxidací NO vznikají nitrity, které podléhají diazotaci a kopulaci (převzato z *Kupková a Beneš, 2004*).

8.1.1 Postup měření koncentrace nitritů/nitrátů

Připravíme zásobní roztok NaNO_2 ($520 \mu\text{M}$). Pro vytvoření kalibrační křivky zásobní roztok zředíme 10x, a poté vytvoříme 8 ředění v rozmezí $52 \mu\text{M}$ - $0,203 \mu\text{M}$. Supernatant ze vzorků pipetujeme na 96 jamkovou mikrotitrační destičku ($150 \mu\text{l}$ vzorku nebo kalibračního roztoku).

Do roztoku přidáme $150 \mu\text{l}$ Griessova činidla a inkubujeme mikrotitrační destičku po dobu 15 min, v temnu při pokojové teplotě.

Následně změříme absorbanci při 540 nm (SPECTRA Rainbow). Z kalibrační křivky vypočítáme regresní rovnici a z ní stanovíme koncentrace nitritů pro všechny testované vzorky.

8.2 Stanovení koncentrace proteinů a příprava vzorků

Pomocí spektrofotometrické metody BCA Protein assay stanovíme ve všech vzorcích koncentrace proteinů. Metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA), která komplexuje ionty Cu^+ tvořené reakcí peptidové vazby s Cu^{2+} . Činidlo se připravuje smíšením roztoků sodné soli BCA v alkalickém prostředí a CuSO_4 . Změna absorbance se měří při 562 nm .

8.2.1 Příprava vzorků pro stanovení koncentrace proteinů

Po ukončení inkubace opláchneme buňky v PBS. Poté buňky zlyzujeme na ledě pomocí lyzačního roztoku a pečlivě seškrábeme z destiček. Vzorky napipetujeme do mikrozkušavek Eppendorf s bezpečnostním uzávěrem a dáme je povařit na 15-20 min při 99°C . Potom vzorky centrifugujeme a následně 2x homogenizujeme pomocí sonikátoru. Homogenizované vzorky dáme znovu povařit na 10-15 min při 99°C . Před samotným stanovením proteinů vzorky ještě jednou krátce centrifugujeme, abychom do mikrozkušavek dostali i tekutinu, která v důsledku vaření ulpěla na víčku.

8.2.2 Postup měření koncentrace proteinů

Pro stanovení proteinů použijeme komerčně dostupnou metodu BCA protein assay. Homogenizované a povařené vzorky napipetujeme do mikrotitrační destičky. Pro přípravu kalibrační křivky použijeme zásobní roztok bovinního albuminu (BSA) rozpuštěného v lyzačním pufru o koncentraci 10 mg/ml. Provedeme 9 ředění v rozmezí 10 – 0,0625 mg/ml. Dále postupujeme podle protokolu dodaného od výrobce kitu.

Na 96 jamkovou mikrotitrační destičku pipetujeme 5 µl vzorku nebo kalibračního roztoku v paralelách, 200 µl reagentu A+B, inkubujeme 15 min v temnu při 37°C a poté změříme absorbanci při 562 nm. Sestavíme kalibrační křivku (podle kalibračních vzorků) s regresní rovnicí, kterou použijeme pro výpočet koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Vzorky naředíme na požadovanou koncentraci a přidáme Laemliho pufr, se kterým vzorky opětovně povaříme a nakonec zamrazíme.

8.3 Stanovení exprese proteinů pomocí SDS PAGE a Western blotu

Ke stanovení exprese proteinů se běžně využívá SDS PAGE elektroforéza, která je následována metodou Western blot. SDS PAGE slouží k analytické separaci proteinů a pro určení jejich molekulové hmotnosti. SDS poskytuje proteinům uniformní náboj, takže jsou v polyakrylamidovém gelu separovány na základě své molekulové hmotnosti a hustoty gelu. Nevýhodou SDS PAGE je nutnost denaturace proteinů (*Rumlová a kol.,2006*).

Metoda Western blot je nejpoužívanější imunochemickou metodou. Využívá specifických protilátek, které rozpoznávají antigenní strukturu hledaného denaturovaného proteinu ve vzorku. Proteiny rozdělené pomocí SDS PAGE jsou přeneseny na vhodný nosič (v našem případě na polyvinylidene fluoride, PVDF membránu). Výhodou metody je její sensitivita a specificita. (*Rumlová a kol.,2006*)

Před samotnou elektroforézou, musíme vyrobit gel, ve kterém budeme rozdělovat proteiny (tab. č. 3).

8.3.1 Příprava gelů

Rozdělovací gel 1,5 mm 10% (4 gely)	[ml]	Hřebínkový gel (4 gely)	[ml]
H ₂ O	6,90	H ₂ O	12,296
1,5 TRIS, 8.8 pH	5,50	0,5 TRIS, 6.8 pH	6,00
Acryl amid	7,20	Acryl amid	3,16
SDS	2,20	SDS	2,40
APS (0.05g/500uL)	0,20	APS (0.05g/500uL)	0,18
TEMED	0,06	TEMED	0,06

Tab. č. 3: Přehledný seznam přípravy roztoků gelů určených pro elektroforézu.

Sklička důkladně dočistíme 80% etanolem. Na spodní část nalévacího stojanu umístíme gumovou podložku. Sklička přiložíme k sobě a nasadíme do stojanu. Nachystáme gely vhodné hustoty (10 %), přičemž TEMED a APS přidáváme těsně před naléváním. Po napipetování rozdělovacího gelu zakapeme povrch destilovanou vodou a necháme gel utuhnout (přibližně 30 min). Před pipetováním hřebínkového gelu odsajeme vodu ubrouskem. Poté napipetujeme hřebínkový gel a vložíme hřeben, který v gelu vytvoří jamky. Hřebínkový gel nechám zatuhnout (přibližně 20-30 min). Nachystané gely vložíme do Running pufru a necháme přes noc zakryté fólií v chladničce.

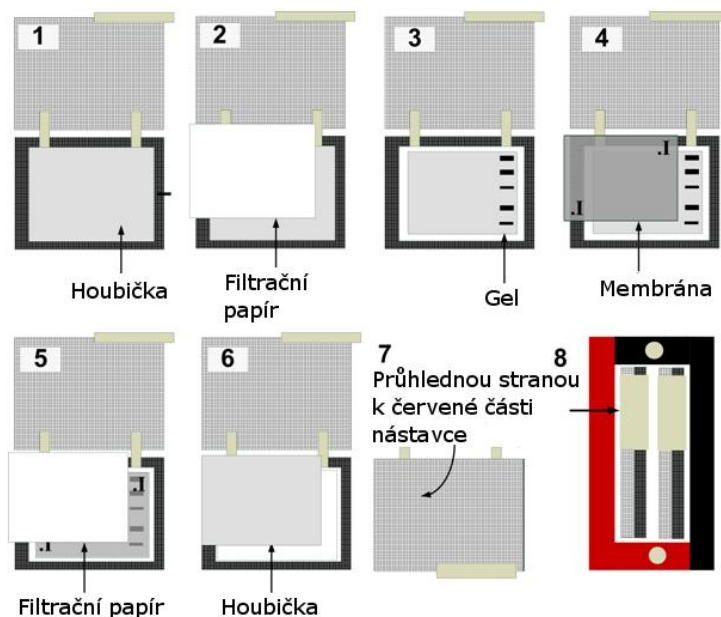
8.3.2 SDS PAGE

Složíme aparaturu potřebnou pro elektroforézu. Opatrně vytáhneme z gelů hřebeny, aniž bychom poškodili jamky a vypláchneme je destilovanou vodou. Gely vložíme do aparatury a nalijeme Running pufr po okraj skel. Považené vzorky (10-15 minut) krátce centrifugujeme a následně je pipetujeme do jednotlivých jamek podle předem stanoveného rozpisu. Na nádobu s gely nasadíme víko, které současně zapojíme do zdroje napětí. Elektroforézu spustíme na 100 V a čekáme, než vzorky vstoupí do hřebínkového gelu a seřadí se do jedné linie podél rozdělovacího gelu. Nyní zvýšíme napětí zdroje na 130 V a necháme probíhat elektroforézu přibližně 2 h. Po vyjetí tzv. čela (modrý pruh tvořený Laemliho pufrům a zbytkem proteinů) z gelu ukončíme elektroforézu a vytáhneme gely z aparatury. Nyní nachystáme aparaturu na Western blot a současně necháme gely namočené v Running pufru, aby nevyschly.

8.3.3 Western Blot

Do vaničky nalijeme Transfer pufr a poté nachystáme kazety s gely a membránami. Příprava kazet je dokumentována na obr. č. 9. Aparaturu s gely a membránami zalijeme čerstvým Transfer pufr. Do nástavce přiložíme ledový bloček, zapojíme aparaturu do zdroje a spustíme přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu (Immobilon®-P, MILLIPORE, USA) a to při 280 mA/2-3h.

Po ukončení přenosu proteinů vytáhneme membrány a vložíme je do blokovačím roztoku obsahujícího proteiny (odtučené mléko). Po 1 hodině vložíme membrány do primárních protilátek a necháme je inkubovat přes noc při 4°C. Primární protilátky slijeme, membrány vytáhneme a promyjeme 3x po dobu 15-20 min v TBS-T. Následně vložíme membrány do sekundární protilátky a inkubujeme je po dobu 1 h při pokojové teplotě. Po 1 h inkubace membrány opět 3x promyjeme v TBS-T po dobu 15-20 minut.



Obr. č. 9: Příprava kazet při metodě Western blot. Jako první vložíme do aparatury houbičku, na kterou položíme filtrační papír. Oba komponenty musíme dostatečně navlhčit v Transfer pufru. Nyní opatrně vložíme gel. Následně přidáme membránu, kterou předem namočíme v koncentrovaném metanolu, aby mohla proběhnout vazba proteinů na membránu. Dále dáme navlhčený filtrační papír a houbičku. Nyní aparaturu vložíme do nástavce (upraveno podle *protokolu poskytnutého BFU, AVČR*).

Ředění všech protilátek pro jednotlivé proteiny je uvedeno v tab. č. 4. Membrány vyvoláváme standardním způsobem pomocí chemiluminiscenčního (CL) kitu. Nejprve membrány inkubujeme s vhodně zvoleným substrátem 10-15 min. Po uplynutí doby inkubace CL signál vyvoláme na radiografické filmy (Agfa, Belgie), na kterých jsou viditelné hledané proteiny. Poté filmy naskenujeme a analyticky určíme optickou hustotu jednotlivých proužků (GIMP 2 a ImageJ).

Typ primární protilátky	Ředění PP	Typ SP	Ředění SP
eNOS (140kDa) - rabbit	1 : 1000	Anti-rabbit IgG	1 : 2000
P- eNOS (S1177) (140kDa) - rabbit	1 : 1000	Anti-rabbit IgG	1 : 2000
CaSR (130kDa) - mouse	1 : 1000	Anti-mouse IgG	1 : 2000
GPCR6A (110 kDa) - rabbit	1 : 1000	Anti-rabbit IgG	1 : 2000
I-CAM (CP54) (85-115 kDa) - mouse	1 : 1000	Anti-mouse IgG	1 : 2000
ETB (50kDa) - mouse	1 : 1000	Anti-mouse IgG	1 : 2000
ETA (50 kDa) - mouse	1 : 1000	Anti-mouse IgG	1 : 2000
β-actin (42 kDa) - mouse	1 : 1000	Anti-mouse IgG	1 : 5000

Tab. č. 4: Ředění použitých protilátek pro proteiny detekované metodou Western blot. Ke každému proteinu uvedenému v tabulce je zaznamenáno ředění jeho primární protilátky (PP) a druh zvířete, ve kterém byla vyprodukována. Na pravé straně tabulky je popsán typ a ředění sekundární protilátky (SP), která byla použita pro jednotlivé proteiny.

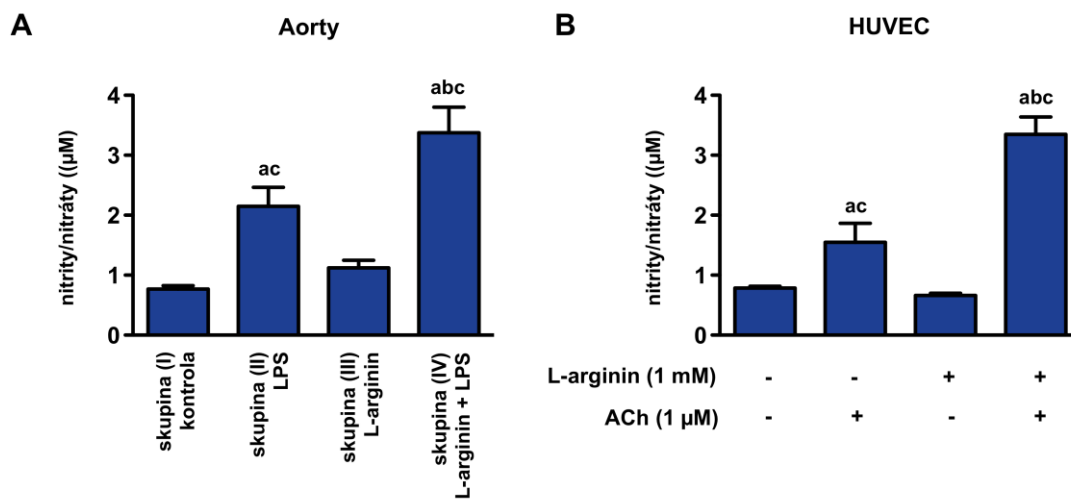
8.4 Statistické zpracování naměřených dat

Data byla statisticky zpracována pomocí softwaru Statistica pro Windows, přičemž byla využita metoda jednocestní analýzy rozptylu (ANOVA). Všechna data v grafech jsou zobrazena jako průměrné hodnoty + S.E.M. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou. Pro zjednodušené zobrazení statistické významnosti je tato hodnota uvedena v grafech podle následujícího klíče: písmenem **a** je označen každý sloupec v grafu, který byl statisticky významný oproti prvnímu sloupci v řadě. Písmenem **b** je označen ten sloupec, který byl významný oproti sloupci druhému, **c** oproti třetímu a **d** oproti čtvrtému sloupci.

9 Výsledky

9.1 L-arginin ovlivňuje produkci NO u myšího modelu a lidských endoteliálních buněk pěstovaných *in vitro*

Jako první model pro stanovení produkce NO byly použity myši, z kterých byla část ovlivněna zvýšenou koncentrací L-argininu v pitné vodě. Byly sestaveny čtyři skupiny, které jsou podrobně specifikovány v kapitole 7.3.1. Izolace aort z myši C57BL/6J. Produkce NO byla stanovena v plasmě myši a reprezentuje akumulaci nitritů a nitrátů, konečných produktů metabolismu NO. Jak je patrné z grafu č. 1, oproti kontrolní skupině (skupina I.), nevykazovaly myši ovlivněné L-argininem (skupina III.) zvýšenou produkci NO. Teprve ve skupině, kde byl injikován roztok LPS (endotoxin) (skupina II.), došlo k výraznému zvýšení koncentrace NO. Zajímavým zjištěním bylo, že ve srovnání s kontrolní skupinou injikovanou LPS (skupina II.), u myši ovlivněných L-argininem a injikovaným LPS (skupina IV.) došlo téměř k zdvojnásobení této koncentrace. Pro další analýzu produkce NO byl použit model lidských endoteliálních buněk (HUVEC). Vybrané skupiny buněk byly ovlivněny zvýšenou koncentrací L-argininu (1 mM) a acetylcholinu (1 μ M), jak bylo podrobně popsáno v kapitole 7.3.3. Ovlivnění lidských endoteliálních buněk L-argininem a Acetylcholinem. Bylo zjištěno, že samotný L-arginin nedokázal ovlivnit produkci NO u endoteliálních buněk. Teprve po stimulaci buněk pomocí acetylcholinu (1 μ M) došlo k signifikantní změně, která byla výraznější v případě buněk, které byly pěstovány v přítomnosti zvýšené koncentrace L-argininu (Obr. č. 1B).

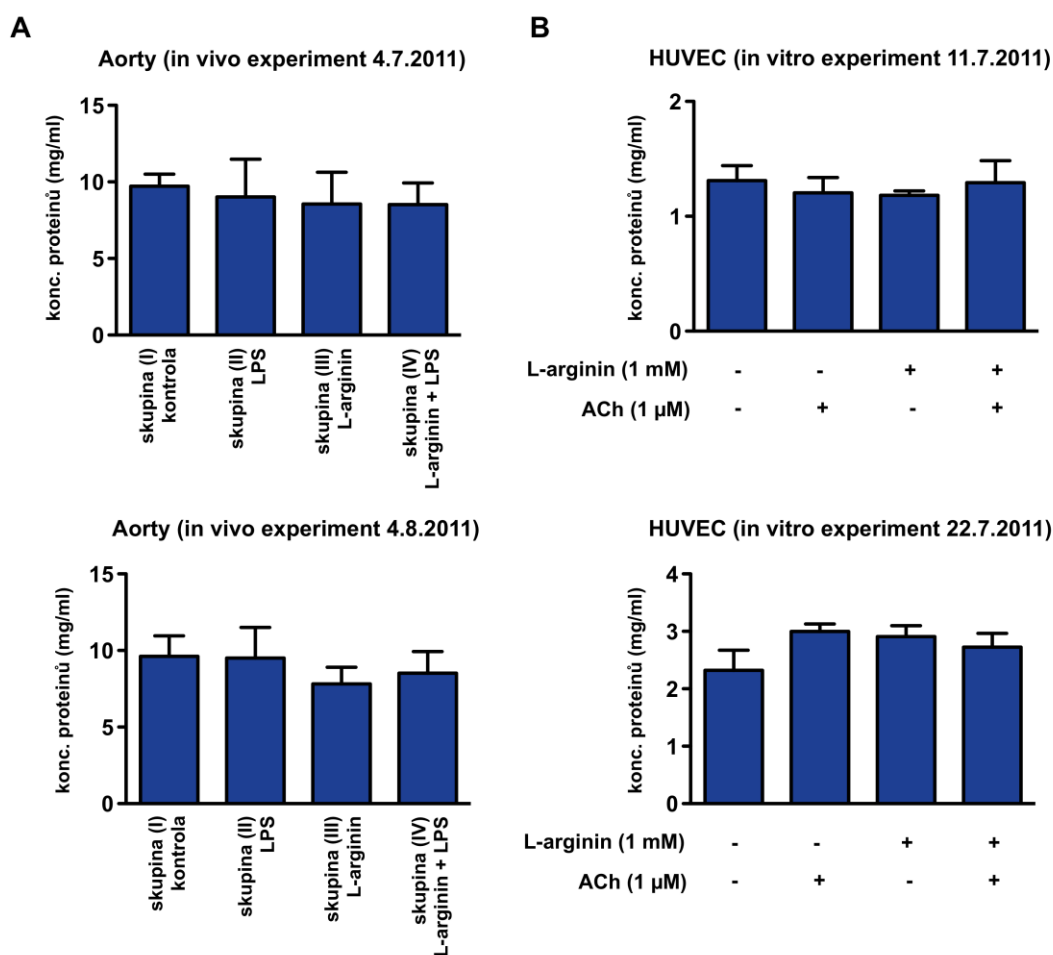


Graf č. 1: Produkce NO u myší a lidských endoteliálních buněk.

(A) Produkce NO naměřená pro jednotlivé skupiny v plasmě myší. (B) Produkce NO u lidských endoteliálních buněk (HUVEC) naměřená v kultivačním médiu po 24 h inkubace buněk v přítomnosti rozdílných koncentrací L-argininu.

9.2 L-arginin neovlivňuje koncentraci proteinů u aort izolovaných z myší ani u lidských endoteliálních buněk

Po homogenizaci myších aort a lýze lidských endoteliálních buněk bylo potvrzeno stanovení koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Bylo zjištěno, že v žádné sledované skupině myší nebyly patrné významné změny v koncentraci proteinů stanovených pro homogenizované aorty (graf č. 2A). Podobné závěry byly zjištěny pro lidské endoteliální buňky, u kterých nedošlo k zásadním změnám koncentrace proteinů v jednotlivých experimentálních skupinách (graf č. 2B).

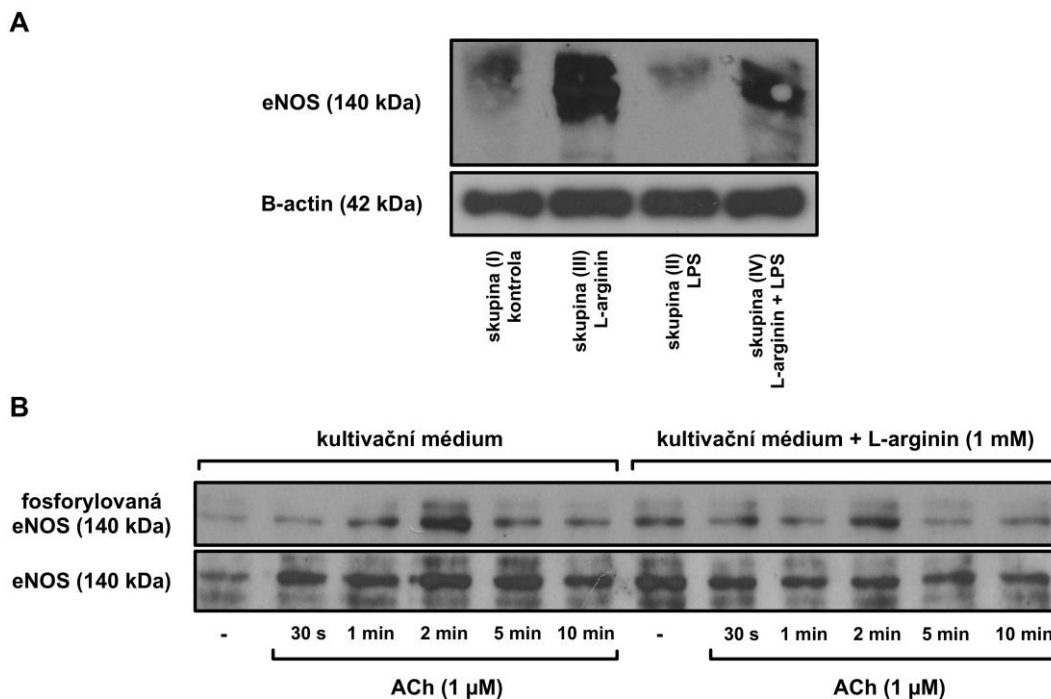


Graf č. 2: Koncentrace proteinů detekovaná ve vzorcích.

(A) Proteiny byly stanoveny ve vzorcích izolovaných aort, které byly nejdříve homogenizovány s lyzačním pufrem. (B) Koncentrace proteinů byla stanovena ve vzorcích lidských endoteliálních buněk, inkubovaných po dobu 24 h s různými koncentracemi L-argininu a poté aktivovaných 10 min pomocí Acetylcholinu (ACh, 1 μl).

9.3 L-arginin ovlivňuje expresi a aktivaci eNOS u myších aort a lidských endoteliálních buněk

Jedním z nejdůležitějších ukazatelů produkce NO u endoteliálních buněk je exprese a aktivace endoteliální NO-synthasy. V experimentech bylo zjištěno, že exprese eNOS je výrazně podpořena jen v případě aort vystavených zvýšené koncentrací L-argininu (Graf č. 3A). Tato exprese navíc nebyla závislá na přítomnosti LPS. V případě vzorků z aort se nepodařilo stanovit fosforylovanou formu eNOS a tudíž nelze potvrdit, zda zvýšená exprese eNOS měla za následek i její zvýšenou aktivitu. U lidských endoteliálních buněk byla stanovena jak totální exprese eNOS, tak její fosforylovaná forma (Graf č. 3B). Bylo zjištěno, že L-arginin neměl výrazný efekt na expresi eNOS ani na její maximální aktivaci, zaznamenané v druhé minutě po aktivaci buněk Acetylcholinem (1 μ M). Z obrázku je ale patrné malé zvýšení aktivace eNOS u skupiny buněk inkubovaných s L-argininem (1 mM) již před aplikací Acetylcholinu.

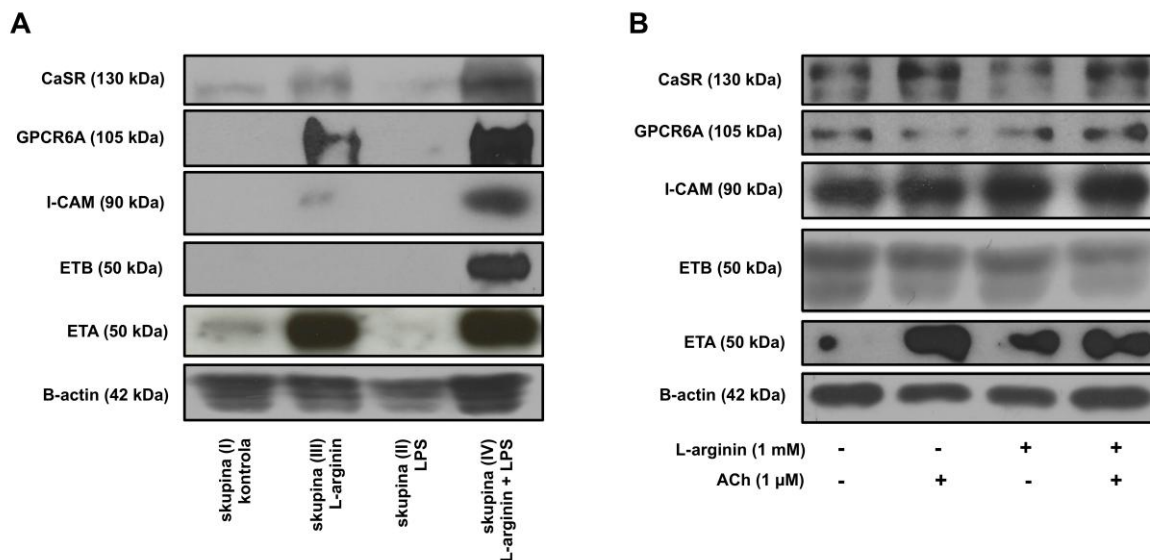


Graf č. 3: Expres a aktivace eNOS u aort a lidských endoteliálních buněk. (A) Aorty z jednotlivých skupin myši byly homogenizovány a exprese eNOS byla stanovena pomocí Western blotu. Expres β -actinu sloužila jako kontrola pro totální množství proteinu ve všech vzorcích. (B) Buňky HUVEC byly ovlivněny různými koncentracemi L-argininu po dobu 24 h a poté byly aktivovány pomocí Acetylcholinu (ACh, 1 μ l) a inkubovány v časovém rozmezí 0-10 min. Expres fosforylované formy eNOS reprezentuje aktivaci enzymu. Expres nefosforylované formy eNOS slouží jako kontrola stejného množství proteinu ve všech vzorcích. Všechny obrázky reprezentují jedno z tří opakování.

9.4 L-arginin ovlivňuje expresi proteinů důležitých pro regulaci fyziologické odpovědi endoteliálních buněk

V experimentech byly dále sledovány exprese proteinů, které hrají klíčovou roli při regulaci fyziologických odpovědí vaskulárního endotelia. Byla to adhezivní molekula I-CAM a různé typy receptorů (CaSR, GPCR6A, ET_B, ET_A), jejichž aktivace vede ke změnám v intracelulární signalizaci u endoteliálních buněk. Jak je patrné z grafu č. 4, přítomnost těchto receptorů byla sledována jak u myších aort, tak u lidských endoteliálních buněk.

U myších aort výsledky jednoznačně potvrdily, že L-arginin výrazným způsobem podporuje expresi všech sledovaných receptorů (graf č. 4A). Zajímavé je zjištění, že kromě proteinu pro ET_A, byly tyto změny částečně závislé na spolupůsobení LPS. Přičemž samotné LPS nedokázalo vyvolat téměř žádnou změnu v expresi sledovaných proteinů. U lidských endoteliálních buněk byly výsledky méně jednoznačné. V experimentech byly zaznamenány změny exprese proteinů pro CaSR a ET_A, jenž byly ale spojeny s přítomností Acetylcholinu (1 μM). U ostatních proteinů nenastaly žádné výrazné změny v jejich expresi (graf č. 4B).



Graf č. 4: Expres různých proteinů u aort a lidských endoteliálních buněk. (A) Aorty z jednotlivých skupin myši byly homogenizovány a exprese CaSR, GPCR6A, I-CAM, ET_B, ET_A byla stanovena pomocí metody Western blot. (B) Buňky HUVEC byly ovlivněny různými koncentracemi L-argininu po dobu 24 h, a poté byly 10 min aktivovány pomocí Acetylcholinu (ACh, 1 μl). Následně u nich byla stanovena exprese CaSR, GPCR6A, I-CAM, ET_B, ET_A. Expres β-actinu byla stanovena pro kontrolu stejného množství totálního proteinu ve všech vzorcích. Všechny obrázky reprezentují jedno z tří opakování.

10 Shrnutí

Byla zjištěna důležitá fakta, která potvrzují unikátní roli L-argininu v regulaci fyziologických funkcí vaskulárních endoteliálních buněk. Byl ověřen již známý fakt, že zvýšením koncentrace L-argininu (jediného známého substrátu pro NO-synthasu), dochází ke zvýšené tvorbě NO. Bylo zjištěno, že tato produkce musí být nejdříve vyvolána spolupůsobením faktorů, jež efektivně spouštějí aktivaci eNOS. Úplně novým poznatkem práce je, že L-arginin výrazným způsobem zasahuje do regulace exprese jak samotné eNOS, tak i adhezivní molekuly I-CAM a různých receptorů (CaSR, GPCR6A, ET_A, ET_B), které jsou považovány za důležitou součást normálních endoteliálních funkcí.

Při posuzování správné funkce vaskulárních endoteliálních buněk je produkce a biologická dostupnost NO považována za jeden z klíčových faktorů. Vycházíme-li z tohoto předpokladu, je zřejmé, že jakýkoliv podnět regulující produkci NO, může mít za následek vznik či prohloubení endoteliální dysfunkce, která je dále spojena s rozvojem závažných onemocnění (např. srdečné selhání, diabetes, sepse) (*Karásek a kol, 2004*). Jako první se pozornost obrací na L-arginin, který je doposud jediný známý substrát pro endoteliální NO-synthasu a tedy produkci NO v rámci vaskulárního endotelia.

V experimentech u myšího modelu bylo prokázáno, že samotné zvýšení koncentrace L-argininu v organismu, nebo v kultivačním médiu nezpůsobuje zásadní zvýšení produkce NO. Pro účely stimulace endoteliálních buněk a navození patofyziologického stavu byl v experimentech využit model peritoneálního zánětu indukovaného pomocí bakteriálního endotoxinu. Tyto podmínky v kombinaci se zvýšením koncentrace L-argininu, měli za následek signifikantní nárůst produkce NO detekovaného v plasmě.

Podobných výsledků bylo dosaženo i pro lidské endoteliální buňky, kde byl pro jejich aktivaci využit acetylcholin. L-arginin v kombinaci s acetylcholinem zvýšil produkci NO. Tato data jsou ale v rozporu s výsledkem dostupným ze stanovení fosforylace eNOS, kde se ukázalo, že L-arginin neměl na tento proces zásadní vliv. Vysvětlením může být zvýšení basální produkce NO, která byla stanovena pro vzorky plasmy. Bohužel se nepodařilo fosforylaci eNOS stanovit u vzorků myších aort.

Na základě všech těchto experimentů můžeme konstatovat, že samotný L-arginin výrazně zvyšuje expresi eNOS. Tato exprese, ale není spojena se zvýšenou produkcí NO. Teprve spolupůsobení aktivátoru, jako je LPS nebo acetylcholin, a zvýšené koncentrace L-argininu má za následek signifikantní zvýšení produkce NO.

Zajímavým výstupem práce je, že samotný L-arginin může regulovat nejen expresi eNOS, ale také expresi různých proteinů, vesměs receptorů, které mohou spolu regulovat aktivaci endoteliálních buněk. Bez spolupůsobení endotoxinu dochází pod vlivem L-argininu ke zvýšení exprese GPCR6A, ET_A a částečně i CaSR. Naopak exprese I-CAM a ET_B je závislá jak na přítomnosti LPS, tak na zvýšené koncentraci L-argininu. V případě lidských endoteliálních buněk se tyto pozorování nepotvrdily. Zdá se, že experimenty mohou být do velké míry ovlivněny použitím speciálního kultivačního média, které je uzpůsobeno na pěstování tohoto typu buněk. Médium obsahuje vyšší koncentraci L-argininu, než je jeho fyziologické rozmezí pro savce (40-120 μM) a současně růstové faktory, které mohou zásadním způsobem ovlivňovat fyziologické funkce endoteliálních buněk.

11 Závěr

Práce potvrdila důležitost aminokyseliny L-argininu nejenom z hlediska produkce NO vaskulárními endoteliálními buňkami, ale také z hlediska jím zprostředkované regulace exprese povrchových receptorů a proteinů důležitých pro fyziologické procesy v rámci vaskulárního endotelu. Výsledky uvedené v práci jsou unikátní a částečně přispívají k objasnění dějů, které jsou klíčové pro potenciální využití L-argininu v terapeutických přístupech určených k léčbě různých onemocnění, prokazatelně spojených se sníženou biologickou dostupností NO.

Práce navazuje na předešlé experimenty, které byly a dále jsou prováděny na oddělení Patofyziologie volných radikálů na Biofyzikálním ústavě AVČR.

12 Seznam použitých zkratek

APS	ammonium persulfáte
BSA	bovinní albumin
CaSR	calcium sensing receptor
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
EDHF	hyperpolarizující faktor
EDRF	endotelový relaxační faktor (endothel derived relaxing factor)
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
eNOS	endotelová synthasa oxidu dusnatého
ETA	endotelinový receptor typu A
ETB	endotelinový receptor typu B
GPCR6A	protein coupled receptor
I-CAM	intracellular adhesion molecule
INF- γ	interferon gamma
iNOS	indukovatelná synthasa oxidu dusnatého
LPS	lipopolysacharid
nNOS	neuronová synthasa oxidu dusnatého
NO ⁺	nitrosonium
NO ⁻	nitrosyl
NO-synthasa	synthasa oxidu dusnatého
PBS	phosphate buffer saline

PGI ₂	prostacyklin
TEMED	tetramethylethylenediamine
TH1	T-lymfocyty (subpopulace „helpers“)
TNF	tumor necrosis factor

13 Seznam použité literatury

ANDREW, J. a P. MAYER. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Reserch*. 1999, č. 43, s. 521-531.

DOSTÁL, Jiří a Petr KAPLAN. A KOLEKTIV. *Lékařská chemie II*. 1.vyd. Brno: Vydavatelství MU, 2004. Lékařská chemie. ISBN 80-210-2731-2.

GALLOVÁ, Lucie. *Reaktivní metaboliky kyslíku a dusíku produkované fagocyty*. Brno, 2001. Diplomová práce. Masarykova universita, Přírodovědecká fakulta.

HORKÝ, Drahomír a Svatopluk ČECH. *Mikroskopická anatomie*. 1.vyd. Brno: Vydavatelství MU, 1999. ISBN 80-210-2208-6.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-7254-686-4.

KARÁSEK, David, Helena VAVERKOVÁ, Milan HALENKA a Martin HUTYRA. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*. 2004, roč. 9, s. 450-453. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2004/09/06.pdf>

KREJČOVÁ, Daniela. *Fyziologické účinky oxidu dusnatého*. Brno, 2005. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné zoologie. Vedoucí práce doc. RNDr. Antonín Lojek, CSc.

KUPKOVÁ, Zdeňka a Luděk BENEŠ. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické listy*. 2004, č. 2, s. 116-122. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_03_01.pdf

LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. 1.vyd. Praha: Karolium, 2006. Biochemie pro studující medicíny, 80-246-0851-0. ISBN 80-246-0849-9.

MALÍK, Jan a Jan ŠIMEK. Cévní stěna, endoteliální dysfunkce a nemocný s hyperlipoproteinemií. *Kardioforum*. 2003, č. 3, s. 23-25. Dostupné z: http://www.kardiologickeforum.cz/pdf/kf_03_03_05.pdf

MURRAY, Robert K., Daryl K. GRANNER, Peter A. MAYES a Victor W. RODWELL. *Harperova biochemie*. 4.vyd.v ČR. Praha: Nakladatelství H+H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.

PRACHAŘOVÁ, Lucie. Reakce krevních destiček na poškození cévní stěny. Brno, 2006. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie živočichů a imunologie. Vedoucí práce RNDr. Milan Číž, Ph.D.

RUMLOVÁ, Michaela, Václav PAČES a Tomáš RUML. *Základní metody genového inženýrství*. Praha, 2006.

ŠÍPEK, Stanislav. A KOLEKTIV. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 80-7169-704-4.

TÁBORSKÁ, Eva a Jaromír SLÁMA. A KOLEKTIV. *Lékařská chemie I*. 1.vyd. Brno: Vydavatelství MU, 2003. Lékařská chemie. ISBN 80-210-2534-4.

TROJAN, Stanislav. A KOLEKTIV. *Lékařská fyziologie*. 4. přep. a dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

VÁCHA, Martin, Vítězslav BIČÍK, Richard PETRÁSEK a Vladimír ŠIMEK. *Srovnávací fyziologie živočichů*. 1.vyd. Brno: Studio ARX, 2002. ISBN 80-210-3004-6.

VRABLÍK, Michal, Michaela JANOTOVÁ, Eva MOTYKOVÁ a Martina PRUSÍKOVÁ. Endoteliální dysfunkce - první stádium aterosklerózy. *Medicína v praxi*. 2011, roč. 3, č. 8, s. 119-122. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/03/05.pdf>

WU, G. a S. MORRIS. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998, č. 336, s. 1-17.

14 Internetové zdroje

URL 1: <http://fyeahmedlab.tumblr.com/post/16825483350/alchymista-3-d-microscopy-casts-blood-vessels>

URL 2: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/moreabout/endothel.htm>

15 Přílohy

15.1 Použité chemikálie

Acrylamid 4K – Lösung (30%) AppliChem GmbH, Německo

Albumin from bovine serum Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Amonium persulfát (APS), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo (50 mg APS bylo rozpuštěno v 500 μl destilované vody uchováno v lednici)

Anti β -actin antibody (mouse), Santa Cruz Biotechnology, USA

Anti CaSR antibody (rabbit), Sigma-Aldrich, USA

Anti cGKI antibody (rabbit), Santa Cruz Biotechnology, USA

Anti Endotelin receptor A antibody (mouse), Santa Cruz Biotechnology, USA

Anti eNOS antibody (rabbit), Cell Singaling Technology, USA

Anti GPCR6A antibody (rabbit), Santa Cruz Biotechnology, USA

Anti I-CAM (CP54) antibody (mouse), Santa Cruz Biotechnology, USA

Anti phospho eNOS (ser1177) antibody (rabbit), Cell Singaling Technology, USA

BCA Protein assay, Thermo Scientific, USA

Dihydrogen fosforečnan draselný (KH_2PO_4), Lachema, Česká Republika

DMSO (Dimethylsulphoxide), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Dodecylsulfate.Na-salt (SDS), $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{S.Na}$ SERVA Electrophoresis GmbH, Německo

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

FBS (Fetal Bovine Serum - sterile), origin South America BioClot GmbH, Německo

Gentamycin sulfate SERVA Electrophoresis GmbH, Německo

Griess Reagent Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Hydrogen fosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)Penta, Česká republika

Hydrogen uhličitán sodný (NaHCO_3)Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Chemiluminiscenční kit, Thermo Scientific, USA

Chlorid draselný (KCl), Lachema, Česká Republika

Chlorid sodný (NaCl), Penta, Česká republika

Integrin beta 3 (rabbit), Cell Signaling Technology, USA

L-arginin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Fermentas GmbH, Burlington, Kanada

Pierce® BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific, USA

PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)Fluka BioChemika, Švýcarsko

Anti-mouse, rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked, Cell Signaling Technology, USA

TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Tris (hydroxymethyl) aminomethanSERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo

Tween 20 Fluka BioChemika, Švýcarsko

15.2 Výstupy projektu

Výsledky naměřené v rámci této práce budou součástí publikace, která bude odeslána do prestižního mezinárodního časopisu:

Vascular and immune responses to bacterial endotoxin are regulated by availability of L-arginine: Role for signaling pathways associated with G-protein coupled receptors.

M. Pekarova¹, L. Kubala¹, H. Martiskova^{1,2}, A. Klinke³, M. Rozehnalova¹, O. Vasicek¹, G. Ambrozova^{1,2}, H. Kolarova¹, T.K. Rudolph³, S. Baldus³, A. Lojek¹

¹Institute of Biophysics, Brno, Czech Republic; ²Masaryk University, Brno, Czech Republic; ³Hamburg University Heart Center, Hamburg, Germany.