

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Funkční analýza endotelové dysfunkce v myší
aortě po podávání vysokotukové diety**

Adéla Martínková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za vstřícný přístup, cenné rady a připomínky, ochotu a čas věnovaný při tvorbě této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost během celého mého studia.

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

V Hradci Králové, 2023

OBSAH

OBSAH	4
ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	7
ÚVOD	8
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1.1. Histologická stavba aorty	11
1.1.1. Tunica intima	12
1.1.2. Tunica media.....	12
1.1.3. Tunica adventitia.....	12
1.2. Endotel	14
1.2.1. Fyziologická funkce endotelu.....	15
1.3. Endotelová dysfunkce (ED)	20
1.3.1. Příčiny vzniku	20
1.3.2. Projevy	24
1.4. Dieta s vysokým obsahem tuku (HFD)	27
1.4.1. Volné mastné kyseliny (FFA), hlavní složka HFD.....	27
1.4.2. Mechanismy indukce ED prostřednictvím FFA.....	28
1.4.3. Charakteristika použité diety.....	30
1.5. Myografie	31
1.5.1. Základní princip.....	31
1.5.2. Popis přístroje	31
2. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE	33
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1. Schéma experimentu	34
3.2. Izolace a preparace aorty.....	34

3.3.	Vlastní měření	35
3.4.	Statistické hodnocení	38
4.	VÝSLEDKY	39
4.1.	Hmotnost zvířat.....	39
4.2.	Maximální vazokonstrikční odpověď na KCl	40
4.3.	Maximální vazokonstrikční odpověď na PGF2 α	41
4.4.	Maximální vazodilatační odpověď na Ach	42
4.5.	Vazodilatační odpověď na Ach v závislosti na koncentraci.....	43
4.6.	Vazodilatační odpověď na SNP v závislosti na koncentraci	44
5.	DISKUZE	45
6.	ZÁVĚR.....	47
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	48
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ	51
9.	SEZNAM TABULEK.....	52
10.	SEZNAM GRAFŮ	53
11.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Školitel: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Autor: Adéla Martínková

Název diplomové práce: Funkční analýza endotelové dysfunkce v myší aortě po podávání vysokotukové diety

Úvod a cíl práce: Endotelová dysfunkce je spojována s poruchou vazodilatační odpovědi cévní stěny zprostředkované oxidem dusnatým, který za fyziologického stavu vzniká v endotelových buňkách. Dysfunkci endotelu je možné indukovat podáváním vysokotukové diety (HFD) experimentálním zvířatům. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda podávání HFD má vliv na funkční parametry aorty, zejména vliv vazodilatačního faktoru acetylcholinu na endotelové buňky hrudní části myší aorty.

Metody: Myší samci kmene C57BL/6J ve věku 7 měsíců byli krmeni po dobu 12 týdnů vysokotukovou dietou s obsahem 42 % kcal tuku (HFD), která u nich měla navodit endotelovou dysfunkci v aortě. Kontrolní skupině byla podávána standardní laboratorní dieta po celou dobu experimentu. Funkční parametry aorty byly hodnoceny drátovým myografem 620M.

Výsledky: Hmotnost zvířat byla na konci experimentu statisticky významně nižší ve skupině HFD v porovnání s kontrolní skupinou myší krměných standardní laboratorní dietou. Vazokonstrikční odpověď hrudní aorty byla stejná v obou sledovaných skupinách. Na endotelu závislá maximální vazodilatace indukovaná acetylcholinem byla rovněž stejná v obou porovnávaných skupinách. Na endotelu nezávislá vazorelaxace indukovaná nitroprusidem sodným nevykazovala rozdíly mezi skupinami.

Závěr: Výsledky této práce ukazují, že dlouhodobé podávání HFD s obsahem 42 % kcal tuku nemá vliv na funkci endotelu v hrudní části myší aorty.

Klíčová slova: endotel, endotelová dysfunkce, vysokotuková dieta, drátová myografie

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Supervisor: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Author: Adéla Martínková

Title of Thesis: Functional analysis of endothelial dysfunction in mice aorta following high-fat diet administration

Background and aim: Endothelial dysfunction is associated with the impairment of vasodilatory response of vessel wall mediated by nitric oxide which is produced by endothelial cells under physiological conditions. Endothelial dysfunction can be induced by high fat diet (HFD) feeding in experimental animals. The aim of this diploma thesis was to determine the effect of HFD on the functional parameters of aorta, especially the effect of the vasodilatory factor acetylcholine on endothelial cells of the thoracic part of the mouse aorta.

Methods: The 7 months old C57BL/6J male mice were fed high fat diet containing 42 % kcal fat for 12 weeks to induce endothelial dysfunction in the aorta. The control group was fed a standard laboratory diet during the whole experiment. Functional parameters of aorta were assessed with wire myograph 620M.

Results: At the end of the experiment, the weight of the animals was statistically significantly lower in the HFD group compared to the control group of mice fed the standard laboratory diet. We did not notice any differences between the control group and the HFD group in vasoconstrictor response of thoracic aorta. The maximal endothelium-dependent acetylcholine-induced vasodilation was the same in both groups. Endothelium-independent sodium nitroprusside-induced vasorelaxation did not show any changes between groups.

Conclusion: The results of this study suggest that long-term feeding with HFD containing 42 % kcal of fat has no effect on the endothelial function in thoracic part of aorta.

Keywords: endothelium, endothelial dysfunction, high fat diet, wire myography

ÚVOD

Endotel je považován za vysoce selektivní metabolicky aktivní orgán, který hraje klíčovou roli při udržování vaskulární homeostázy. Vlivem různých rizikových faktorů, jako je například kouření, diabetes mellitus (DM), hypertenze, dyslipidémie či obezita, dochází postupem času k poruše jeho funkce – odborně nazývanou jako endotelová dysfunkce [1].

Endotelová dysfunkce, vyvolaná působením výše zmíněných rizikových faktorů, je zodpovědná za progresi kardiovaskulárních (KVS) onemocnění, včetně aterosklerózy. V České republice patří KVS onemocnění mezi nejčastější příčiny úmrtí, zejména se jedná o ischemickou chorobu srdeční, cévní mozkovou příhodu a jiné srdeční choroby [2]. Je to právě endotelová dysfunkce, která stojí na počátku rozvoje těchto onemocnění a významně se podílí na vývoji jak časných, tak i pozdních fází aterosklerózy [3].

Jednou z důležitých funkcí endotelu je udržování rovnováhy mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními faktory [1]. Mezi nejdůležitější vazodilatační faktor produkovaný endotelem patří oxid dusnatý (NO). Ke stimulaci jeho tvorby, a tedy vazodilataci ve zdravém endotelu dochází například díky acetylcholinu. Při poruše endotelu, tedy endotelové dysfunkci, však acetylcholin působí přímo na hladké svalové buňky cévní stěny a paradoxně vyvolává vazokonstrikci [4].

Tato diplomová práce se zaměřuje na funkční analýzu endotelové dysfunkce v myši aortě po podávání vysokotukové diety, tedy posouzení schopnosti její vazokonstrikce působením vazokonstrikčních faktorů a zejména posouzení vazodilatace důsledkem působení vazodilatačního faktoru – acetylcholinu. Volné mastné kyseliny, jež jsou hlavní součástí této diety, jsou zodpovědné za indukci oxidačního stresu a dalších faktorů vedoucích ke vzniku endotelového poškození a tedy rozvoji endotelové dysfunkce [5].

1. TEORETICKÁ ČÁST

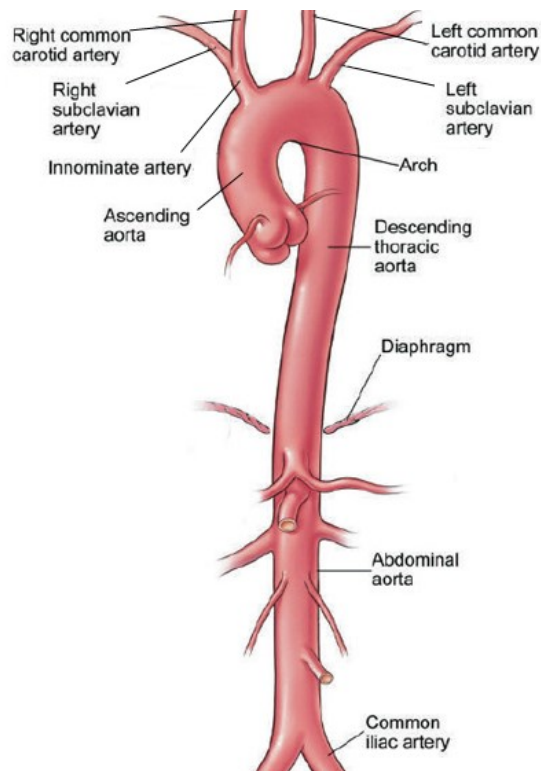
Kardiovaskulární (KVS) systém zajišťuje cirkulaci krve v těle. Krev, jakožto transportní médium, je po těle distribuována systémem krevních cév. Její pohon potom zajišťuje **srdce**, které je jakousi svalovou pumpou a napomáhá tak krevnímu transportu do celého těla [7].

Krevní cévy můžeme rozdělit do tří základních skupin:

- Artérie (tepny)
- Vény (žilky)
- Kapiláry (vlásečnice)

Artérie (přecházející v tenčí arterioly – tepénky) rozvádí okysličenou krev směrem od srdce. Naopak **vény** (přecházející v tenčí venuly – žilky) transportují odkysličenou krev směrem k srdci. **Kapiláry** jsou spojovacím článkem artérií a vén a zajišťují výměnu látek mezi krví a tkáněmi [7].

Artérie můžeme rozdělit na dva základní typy, a to na elastické a muskulární neboli svalové. Příkladem artérie elastické je **aorta** (viz. Obrázek 1), včetně začátků jejích hlavních větví [6].



Obrázek 1: Aorta

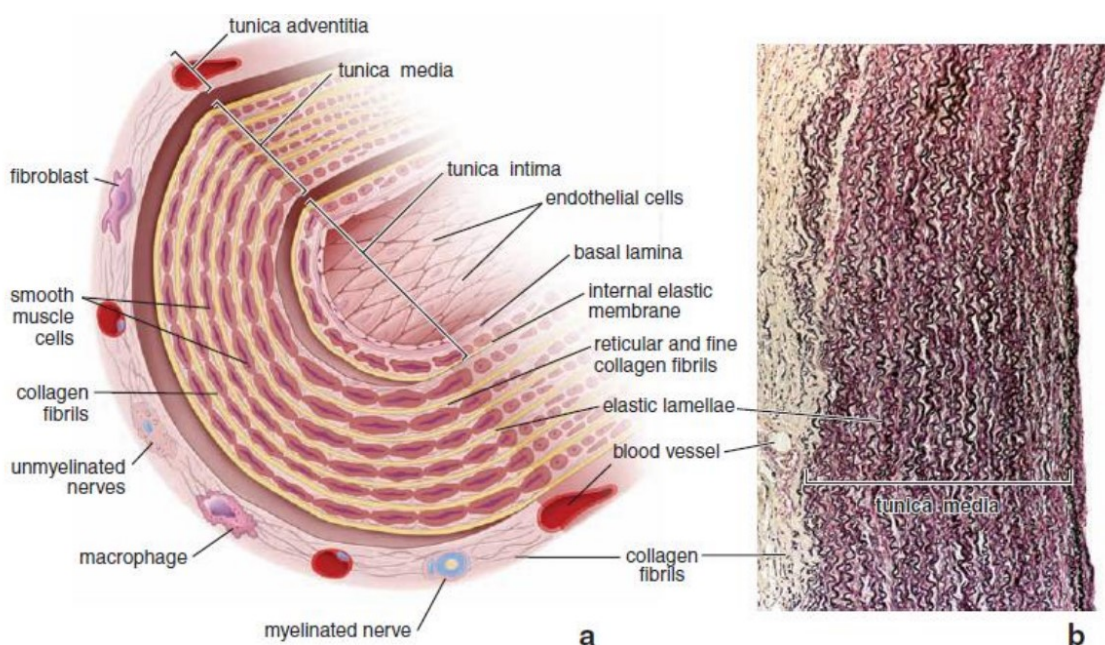
Obrázek znázorňuje hlavní části aorty a její odstupující větve.

Převzaté z: *Your Aorta – Cardiac Health [online]*. Dostupné na: <https://www.cardiachealth.org/your-heart/aorta/> [19.1.2023] [8].

1.1. *Histologická stavba aorty*

Aorta je největší a zároveň jedinou tepnou, kterou krev opouští srdce. Její histologická stavba je uzpůsobena pro vyrovnávání pulzních tlaků srdce a zajištění kontinuálního průtoku krve [6]. Aorta odolává tlaku okolo 140-150 mmHg, což odpovídá asi 18,7-20 kPa. Tento tlak v arteriálním řečišti postupně klesá s tím, jak se ztenčuje průsvit artérií. S klesajícím tlakem klesá i rychlost proudění krve v jednotlivých částech krevního řečiště [10].

Stěna aorty se skládá ze tří základních vrstev – tunica intima, tunica media a tunica adventitia, viz. Obrázek 2.



Obrázek 2: Struktura elastické artérie: a) schéma, b) mikroskopické zobrazení (x48)

Obrázek znázorňuje tři základní vrstvy cévní stěny – vnitřní tunica intima vystlána endotelovými buňkami, prostřední tunica media tvořena hladkosvalovými buňkami a fenestrovanými elastickými blankami a zevní tunica adventitia tvořena převážně vazivem.

Převzaté z: *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* [12].

1.1.1. Tunica intima

Tunica intima je tvořena jednovrstevným plochým epitelem – endotelem, který nasedá na bazální membránu a vystýlá vnitřní povrch cévy. Jedná se o epitel nepravý, jelikož nepochází přímo ze zárodečných listů, ale z embryonálního pojiva – mesenchymu [3]. Další složkou je tzv. subendotelová vrstva, která je tvořena řídkým kolagenním vazivem, v němž mohou být zastoupeny myofibroblasty [6, 7].

1.1.2. Tunica media

Nejsilnější vrstvou arteriální stěny je tunica media, která je tvořena cirkulárně nebo spirálovitě uspořádanými buňkami hladké svaloviny. Tyto buňky produkují extracelulární matrix, která vytváří síť elastických a kolagenních vláken typu III. Tato vlákna obsahují oproti nejčastěji zastoupenému kolagenu typu I více proteoglykanů a vytvářejí retikulární síť [9]. U artérií muskulárního typu můžeme na rozhraní *tunica intima* a *tunica media* nalézt fenestrovanou elastickou membránu (*membrana elastica interna*). Mezi *tunica media* a *tunica adventitia* se nachází zevní elastická membrána (*membrana elastica externa*) [6]. Fenestrace (otvory) v membráně umožňují pronikání živin do hlubších vrstev cévní stěny, jelikož elastin, ze kterého je membrána tvořena, je nepropustný [7]. Artérie elastického typu obsahují daleko větší množství elastických membrán (20-50), a proto se u nich výše zmíněné mezivrstvy (*membrana elastica interna et externa*) nerozlišují [6]. Počet těchto membrán se zvyšuje s věkem. U novorozence se jich obvykle vyskytuje kolem 40, u starších jedinců okolo 70. S věkem také dochází k depozici elastinu a ztluštění membrán [7]. Při výstupu aorty ze srdce se na stavbě medie významně podílejí i kardiomyocyty [6].

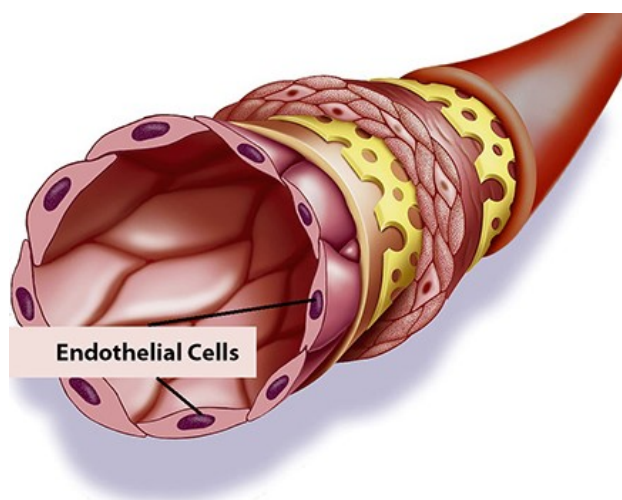
1.1.3. Tunica adventitia

Vnější vrstvou cévní stěny je tunica adventitia (neboli tunica externa). Její struktura je tvořena vazivem s kolagenními a elastickými vlákny, která mají (narozdíl od tunica media) longitudinální uspořádání. Z buněčných elementů jsou zde obsaženy fibroblasty a nepříliš četné adipocyty, ovšem mohou se zde ojediněle vyskytovat i buňky hladké svaloviny. V adventitii je obsažen zejména kolagen typu I, dále glykosaminoglykany dermatansulfát a v malé míře i heparansulfát. Jelikož je zásoben

cévní stěny živinami a kyslíkem (u cév s průměrem větším než 1 mm) pouhou difuzí z lumen vlastní cévy nedostatečné, vyvinuly se u nich tzv. vasa vasorum (cévy cév), podílející se na výživě cévní stěny. Tyto cévy mohou vznikat přímo z artérie, kterou vyživují, nebo z tepny sousední a mohutně se větví v adventitii a v zevních oblastech medie. Adventitie obsahuje také tzv. nervi vasorum, což jsou větve autonomních nervů sympatiku (umožňující vazokonstrikci) a parasympatiku (umožňující vazodilataci) regulující napětí cévní stěny stahem hladkých svalových buněk. V případě artérií eferentní nervová vlákna nepronikají až do tunica media, takže mediátor noradrenalin musí pro dosažení hladké svaloviny několik mikrometrů difundovat (narozdíl od vén, kde tyto nervy zasahují až do medie) [7, 10, 11].

1.2. Endotel

Endotel je největším endokrinním orgánem lidského těla [4, 13]. Jeho buňky lemují celý oběhový systém, od srdce až po nejmenší kapiláry (Obrázek 3) [15]. Ačkoli je endotel tvořen pouze jedinou vrstvou buněk, jeho celkový povrch představuje plochu 500-1000 m² a jeho hmotnost je odhadována přibližně na 1,5-3 kg. Endotelové buňky (EC) jsou nepravidelného podlouhlého tvaru s délkou okolo 25-50 μm a výškou do 5 μm [3]. V cévní stěně jsou orientovány podél osy cévy, čímž se minimalizují síly smykového napětí vyvíjené proudící krví. Jsou spojeny těsnými spoji (zonula occludens, angl. tight junctions) a ukotveny k bazální membráně [16]. Kromě tight junctions jsou v endotelových buňkách obsaženy i spoje adhezní (adherent junctions) a mezerové (gap junctions) [18].



Obrázek 3: Endotelové buňky

Obrázek znázorňuje endotelovou vrstvu tvořenou jednou kontinuální linií endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cévního lumen.

Převzaté z: Searching for Optimal Models for Endothelial Cell 3D Culture – Lifeline® Cell Technology [online]. Dostupné na: <https://www.lifelinecelltech.com/searching-for-optimal-models-for-endothelial-cell-3d-culture/> [4.2.2023] [77].

Po mnoho let se věřilo, že endotel je pouze jednoduchá buněčná bariéra oddělující cévní stěnu od cirkulující krve. Rozsáhlý výzkum v posledních letech však odhalil jeho komplexní roli. Endotel je považován za vysoce selektivní metabolicky

aktivní orgán, který hraje klíčovou roli například při udržování vaskulární homeostázy, kdy udržuje rovnováhu mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními faktory [1]. Pochopení endotelové funkce a dysfunkce bylo zásadním bodem zjištění, proč různé patologické stavy, jako jsou arteriální hypertenze, dyslipidémie, kouření či diabetes mellitus, vedou k uniformním cévním změnám [14].

1.2.1. Fyziologická funkce endotelu

1.2.1.1. Regulace cévní permeability

Jednou ze základních funkcí endotelu je řízení propustnosti mezi krví a okolními tkáněmi. Endotel řídí prostup jak buněčných, tak i nebuněčných krevních částic [3]. Zatímco tekutiny a malé rozpuštěné látky prostupují pasivně přes bariéru paracelulární cestou, makromolekuly využívají pro svůj transport paracelulární i transcelulární dráhy [16]. Přestup leukocytů je realizován za pomoci adhezních molekul (E-selektin, mezibuněčná adhezní molekula 1 – ICAM-1, cévní adhezní molekula 1 – VCAM-1, adhezní molekula krevních destiček – PECAM-1), které endotel exprimuje na svém povrchu [3].

V intaktním endotelu brání přítomnost těsných spojů, které vytvářejí restriktivní bariéru pro makromolekuly, prostupu těchto látek skrze endotel. Při akutním nebo chronickém zánětu dochází k retrakci EC a uvolnění těchto spojů, což zvětší mezibuněčný prostor a následně zvýší permeabilitu endotelu. Dochází tak k nadměrné extravazaci tekutin a makromolekul, což vede ke vzniku edému a zánětu [16, 17].

Cévní permeabilita může být ovlivněna přímo molekulami, které způsobují rozpad bariéry. Molekuly zodpovědné za zvýšení vaskulární permeability zahrnují růstové faktory, jako je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), zánětlivé cytokiny, histamin, serotonin, trombin, bradykinin, substance P, faktor aktivující destičky (PAF) nebo reaktivní formy kyslíku (ROS) [16, 17]. Většina těchto látek je produkována v akutních nebo chronických zánětlivých situacích [18]. Permeabilita může být také nepřímo regulována krevním tlakem a výsledným průtokem krve [17]. Dojde-li v cévě ke zvýšení rychlosti toku krve, nastane v této cévě vazodilatace zprostředkována cévním endotelem, který v důsledku zvýšeného smykového napětí v endotelové membráně

začne vylučovat oxid dusnatý s výrazným vazodilatačním efektem [19]. Zvýšení průtoku krve, například v důsledku vazodilatace, potom zvyšuje vaskulární permeabilitu [17].

1.2.1.2. Regulace cévního tonu

Endotel je místem produkce různých vazodilatačních i vazokonstrikčních působků [13]. Vazodilatace je zprostředkována hlavně faktory, jako je NO, od endotelu odvozený hyperpolarizační faktor (EDHF) a prostacyklin (PGI_2), zatímco vazokonstrikce je zprostředkována faktory, jako je endotelin-1 (ET-1), angiotenzin II (AT-II), tromboxan A_2 (TXA_2) a prostaglandin H_2 (PGH_2).

Mezi nejdůležitější vazodilatační faktory produkovány endotelem patří jednoznačně NO [3]. NO je považován za nejsilnější endogenní vazodilatátor v těle. Je produkován z L-argininu, semiesenciální aminokyseliny, činností endotelové NO syntázy (eNOS). Ta může být aktivována smykovým napětím krevního proudu (shear stress), hypoxií nebo celou řadou lokálně působících faktorů, jako je bradykinin, adenosin, VEGF a serotonin [1, 3, 5]. Stimulaci tvorby NO, a tedy vazodilataci, vyvolává také acetylcholin. Při porušeném endotelu však působí přímo na hladké svalové buňky cévní stěny a paradoxně vyvolává vazokonstrikci [4]. Biosyntéza NO také vyžaduje mnoho kofaktorů, jako je nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD), tetrahydrobiopterin (BH_4) a kalmodulin. Po své syntéze NO difunduje přes membránu EC a vstupuje do buněk hladké svaloviny, kde následně aktivuje guanylát cyklázu (GC). Aktivací GC dále vzniká intracelulárně cyklický guanosin 3',5'-monofosfát (cGMP), který jako druhý posel zprostředkovává biologické působení NO, zejména vazodilataci [5]. Mezi další důležité biologické funkce NO patří inhibice exprese adhezních molekul, adheze a agregace trombocytů, apoptózy EC a zamezení proliferativních procesů v cévní stěně protizánětlivým působením [3, 14].

Dalším vazodilatačně působícím faktorem je EDHF, jehož hlavní biologickou úlohou je pravděpodobně vazodilatace v koronárním řečišti [3].

Třetí vazodilatační látkou produkovanou endotelem je PGI_2 . Uvolňování prostacyklinu je zprostředkováno podobnými mechanismy jako uvolňování NO a jejich účinky se navzájem potencují [3]. PGI_2 zvyšuje hladinu cyklického 3',5'-adenosin

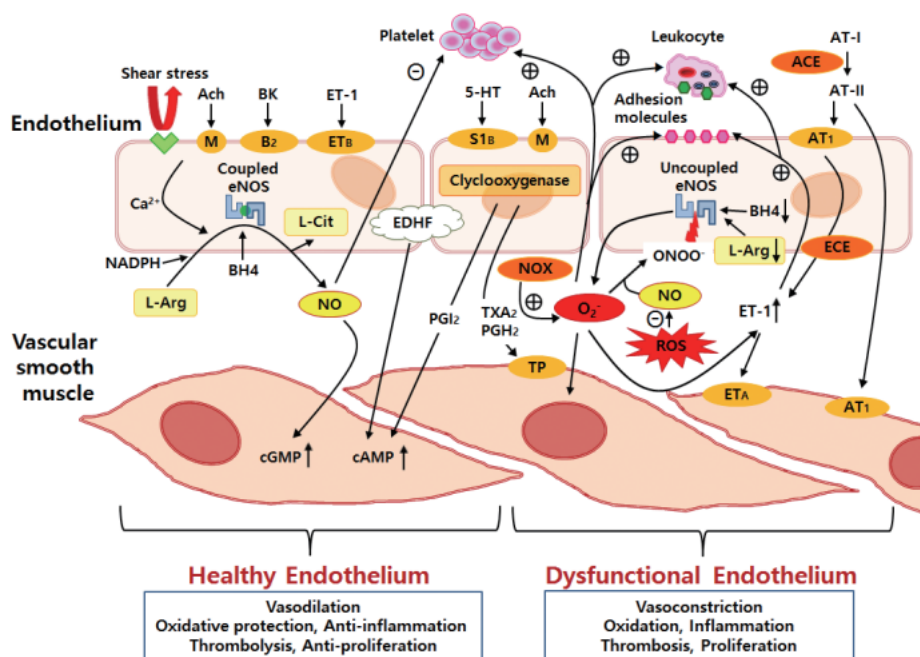
monofosfátu (cAMP) v buňkách hladké svaloviny a v trombocytech, čímž působí nejen vazodilatačně, ale má vliv i na patologicky zvýšenou aktivitu trombocytů [14].

K zachování rovnováhy vznikají v endotelu i látky s vazokonstrikčním působením. Jednou z nejdůležitějších je endotelin-1. ET-1, tvořený výhradně endotelovými buňkami, je vazokonstrikčně působící peptid (21 AMK) mající prozánětlivé a promitogenní vlastnosti. Působí na ET_A a ET_B endotelinové receptory, které zprostředkovávají kontrakci a proliferaci buněk hladké svaloviny cévní stěny [14]. ET_A receptory se nacházejí na povrchu buněk hladké svaloviny cév a jsou zodpovědné za vazokonstrikci (stimulací fosfolipázy C). ET_B receptory se nacházejí jak na endotelových buňkách, kde prostřednictvím NO/PGI₂ přispívají k vazodilataci, tak i na buňkách hladké svaloviny cév, kde působí vazokonstrikčně [1, 18]. Kromě podnětů vedoucích i k uvolnění NO (např. bradykinin, AT-II, shear stress) syntézu ET-1 stimulují i některé aterogenní proteiny (trombin), či lipoproteiny (oxidovaný LDL). V intaktních cévách je vazokonstrikční působení ET-1 vyvažováno současnou stimulací produkce NO a prostacyklinu a plná vazokonstrikce se tak objeví až při poškození endotelu [3].

Dalšími vazokonstrikčně působícími látkami jsou TXA₂ a PGH₂ ze skupiny prostanoidů a dále AT-II. TXA₂ a PGH₂ působí antagonisticky vůči NO aktivací tromboxanových prostanoidních receptorů (TP). Angiotenzin konvertující enzym (ACE) přeměňuje angiotenzin I (AT-I) na AT-II, čímž dochází k degradaci vazodilatačně působícího bradykininu. AT-II dále aktivuje angiotenzinové receptory AT₁, které následně stimulují tvorbu ET-1 a dalších mediátorů (např. inhibitoru aktivátoru plazminogenu) [14].

Jemná rovnováha mezi všemi těmito vylučovanými molekulami je nesmírně důležitá pro správné fungování endotelu a nerovnováha těchto molekul může přispět k selhání vaskulární autoregulace a ovlivnit strukturální a funkční integritu oběhu [5].

Přehled vlivu jednotlivých endotelových faktorů na funkci vaskulárního hladkého svalstva a cirkulujících krvinek znázorňuje Obrázek 4.



Obrázek 4: Přehled účinků endotelových faktorů na funkci hladké svaloviny cév a cirkulujících krvinek

Ve zdravém endotelu je eNOS zodpovědná za většinu vaskulární produkce NO. Avšak v patologicky nedimerizovaném stavu se eNOS v důsledku různých oxidativních stresů stává potenciálním generátorem reaktivních forem kyslíku. Vlivem aktivace ET_A , AT_1 , příp. TP receptorů působí ET-1, AT-II, TXA_2 a PGH_2 na vaskulární hladkou svalovinu konstriktivně, zatímco NO, EDHF a PGI_2 působí zvýšením cGMP (příp. cAMP) v buňkách hladké svaloviny cév relaxačně.

ACE – angiotenzin konvertující enzym; Ach – acetylcholin; AT-I – angiotenzin I; AT-II – angiotenzin II; AT_1 – receptor angiotenzinu 1; BH_4 – tetrahydrobiopterin; BK – bradykinin; cAMP – cyklický adenosin monofosfát; cGMP – cyklický guanosin monofosfát; ECE – endotelin konvertující enzym; eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého; EDHF – od endotelu odvozený hyperpolarizační faktor; ET_A a ET_B – receptory endotelinu A a B; ET-1 – endotelin-1; L-Arg – L-arginin; L-Cit – L-citrulin; M – muskarinový receptor; O_2^- – superoxidový anion; $ONOO^-$ – peroxynitrit; NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát; NO – oxid dusnatý; NOX – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát oxidáza; PGH_2 – prostaglandin H_2 ; PGI_2 – prostaglandin I_2 ; ROS – reaktivní formy kyslíku; $S1_B$ – serotoninový receptor; TP – tromboxanový prostanoidní receptor; TXA_2 – tromboxan A_2 ; 5-HT – serotonin; \ominus – inhibice; \oplus – stimulace.

Převzaté z: Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches [1].

1.2.1.3. Regulace hemostázy

Endotel hraje klíčovou roli při zajišťování hemostatické rovnováhy [15]. Povrch EC je za normálních podmínek antikoagulační a netrombogenní [16, 18]. Poškození cév nebo vystavení určitým cytokinům nebo prozánětlivým podnětům posouvá rovnováhu směrem k prokoagulačním procesům [18]. Endotel se prostřednictvím von Willebrandova faktoru (vWF), fibrinogenu, trombomodulinu (TM), tkáňového faktoru (TF), tromboxanu A₂ a prostacyklinu významně podílí na řízení hemostázy [14]. Ovlivňuje navíc i fibrinolýzu. Působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA) vzniká z cirkulujícího plazminogenu plazmin, klíčový enzym štěpící molekuly fibrinu. Na inhibici tPA se potom podílí inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI-1). Jak tPA, tak PAI-1 jsou exprimovány a v různém poměru uvolňovány z EC [3].

1.2.1.4. Angiogeneze

Endotel se také podílí na tvorbě krevních cév [15]. Ta je zprostředkována růstovými faktory, jako je VEGF, destičkovým růstovým faktorem (PDGF) a transformujícím růstovým faktorem β (TGF- β) [14]. Naopak velmi významným antimitogenem, který inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny cév, je NO [3].

1.3. Endotelová dysfunkce (ED)

Endotelovou dysfunkci můžeme charakterizovat jako funkční poruchu cévního endotelu s převahou sekrece vazokonstrikčních působků, zvýšené propustnosti endotelu pro makromolekuly (např. LDL) a buňky (leukocyty), aktivace zánětlivých reakcí (vyvolaných např. oxidovaným LDL), aktivace prokoagulace (díky zvýšené expresi TF) a produkce růstových faktorů [32].

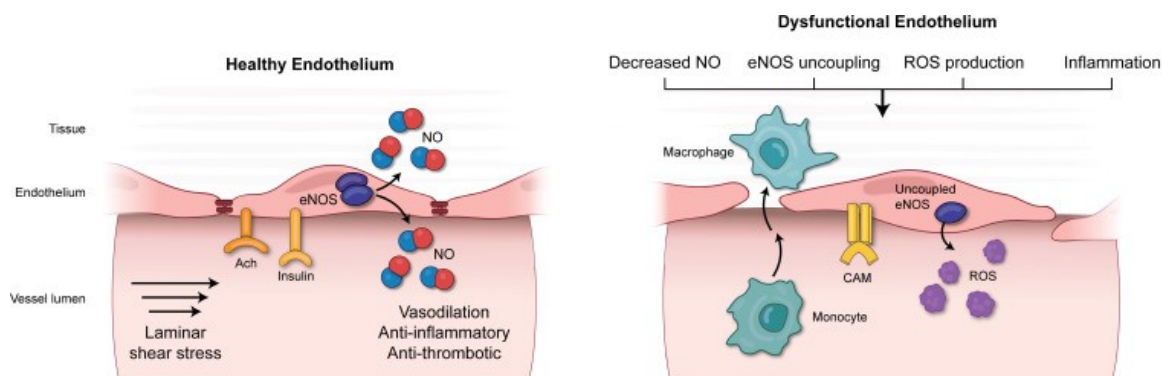
ED hraje hlavní roli v patofyziologii řady KVS onemocnění, zejména v remodelaci při srdečním selhání, v patogenezi aterosklerózy, hypertenze a progresi srdečního selhání, renálního selhání, komplikací DM, sepse a dalších chorob [3, 32].

1.3.1. Příčiny vzniku

Existuje řada příčin ED, z nichž většina je známá jako rizikové faktory KVS onemocnění (viz. Obrázek 6). Tyto faktory se podílejí na vzniku oxidačního stresu a zánětu, které můžeme zařadit mezi hlavní mechanismy patogeneze ED [5].

1.3.1.1. Oxidační stres

Mezi různými komplexními mechanismy se oxidační stres jeví jako nejběžnější základní mechanismus pro rozvoj ED. Obvykle je většina KVS rizikových faktorů spojena se zvýšením oxidačního stresu a ROS [1]. Několik studií skutečně prokázalo, že ROS mohou vést prostřednictvím různých mechanismů k ED, což je hlavní faktor v etiologii mnoha KVS onemocnění [29]. Tyto mechanismy zahrnují aktivaci NADPH oxidázy, inaktivaci NO, tvorbu peroxynitritu (ONOO⁻), rozpad eNOS, stimulaci exprese ET-1 a další. Ve zdravém endotelu je eNOS zodpovědná za většinu vaskulární produkce NO. Pokud je však eNOS v patologicky nedimerizovaném stavu (v důsledku oxidace BH₄ na BH₃- peroxynitritem, což následně vede k rozpadu eNOS), stává se tak potenciálním generátorem ROS (Obrázek 5) [1, 25].



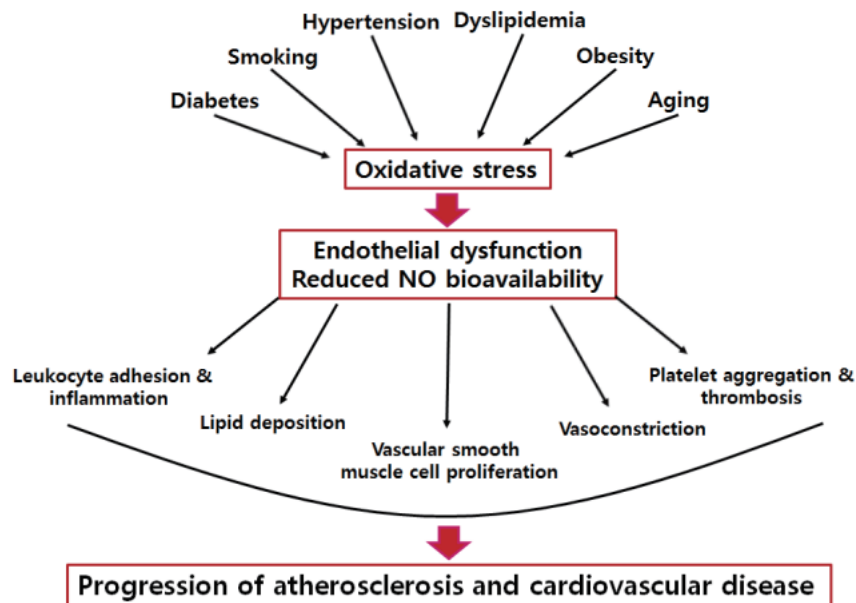
Obrázek 5: Signalizace NO ve zdravém (vlevo) i dysfunkčním (vpravo) endotelu

Zdravý endotel udržuje vaskulární funkci ve fyziologickém stavu prostřednictvím účinků NO (vazodilatační, protizánětlivé a antitrombogenní). Laminární smykové napětí (laminar shear stress), inzulín a acetylcholin (Ach) stimulují eNOS k produkci NO. Dysfunkční endotel je charakterizován sníženou produkcí NO, zánětlivým fenotypem projevujícím se zvýšenou expresí buněčných adhezních molekul (CAM), zvýšenou permeabilitou související se zvýšenou migrací cévních monocytů do subendotelového prostoru (v důsledku rozvolnění buněčných spojů) a infiltrací leukocyty. Namísto vytvoření dimeru se eNOS rozpojí, což vede k produkci ROS namísto NO. Snížená hladina NO a zvýšení ROS vedou k iniciaci a progresi aterosklerózy.

Převzaté z: *Coronary endothelial dysfunction: from pathogenesis to clinical implications* [27].

ROS jsou generovány v místech zánětu a poranění [20]. Syntetizovány jsou jak v EC, tak v medii i adventitii cév [26]. Zatímco při nízkých koncentracích mohou fungovat jako signální molekuly (tzv. druzí poslové) podílející se na regulaci základních buněčných aktivit, jako je růst buněk a jejich adaptace, při vyšších koncentracích mohou ROS způsobit poškození buněk a jejich smrt [20].

Významným zdrojem ROS jsou FFA – volné mastné kyseliny (mechanismem aktivace NADPH oxidázy prostřednictvím protein kinázy C – PKC), které tak přispívají ke vzniku oxidačního stresu a rozvoji ED [5].



Obrázek 6: ED indukovaná oxidačním stresem

Rizikové faktory jako je DM, kouření, hypertenze, dyslipidémie, obezita, nebo stárnutí se významně podílejí na vzniku oxidačního stresu a produkci ROS. Oxidační stres je považován za hlavní mechanismus zapojený do patogeneze ED, pro kterou je charakteristická snížená dostupnost NO a některé další děje – zvýšená adheze leukocytů a zánět, ukládání lipidů v cévní stěně, proliferace buněk hladké svaloviny cév, vazokonstrikce a agregace trombocytů a trombóza. Tyto děje v důsledku dlouhodobého působení výše zmíněných rizikových faktorů, které vyvolávají oxidační stres a podílejí se tak na rozvoji ED, vedou k progresi KVS onemocnění, včetně aterosklerózy.

Převzaté z: *Endothelial dysfunction: Clinical implications in Cardiovascular disease and therapeutic Approaches [1].*

1.3.1.2. Chronický zánět

Dalším základním mechanismem vzniku ED je zánět. Zdá se, že existuje kauzální vztah mezi oxidačním stresem a zánětem. Za fyziologických podmínek endotel reguluje zánětlivé procesy v cévní stěně uvolňováním NO. Dysfunkční endotel však podpoří tvorbu ROS a cévní zánět zhorší [1].

Existuje mnoho zánětlivých markerů spojených s ED a aterosklerózou. Hlavním proteinem akutní fáze zánětu je tzv. c-reaktivní protein (CRP). Ukládáním do intimy cév

přímo přispívá k časně fázi aterosklerózy, která předchází kumulaci monocytů. Kromě toho CRP přímo ovlivňuje biologickou dostupnost NO, což způsobuje oxidační stres, ED a hyperplazii cévní intimy [1].

Zánět je také spojen s nadměrnou expresí tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α) a interleukinu-1 (IL-1), který podporuje adhezi a migraci leukocytů. Tyto zánětlivé cytokiny indukují EC a leukocyty k expresi adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1), monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1), E-selektinu, P-selektinu a interleukinu-6 (IL-6), což vede ke zhoršení ED [1]. Takto aktivované EC pak přitahují do místa zánětu monocyty, které se zde přeměňují na makrofágy a následně pěnové buňky, které potom vedou ke vzniku ateromového plátu (viz. kapitola 1.3.2.2.) [3].

1.3.1.3. Infekce

ED a ateroskleróza jsou také ovlivněny infekcí a jejím imunitně zprostředkovaným poškozením. Epidemiologické studie naznačují, že infekční agens mohou predisponovat pacienty k ateroskleróze a jejím klinickým příhodám [1]. Infekční agens může k chronickým zánětlivým procesům přispět přímými nebo nepřímými mechanismy. Přímý účinek je dán schopností mikroorganismů infikovat cévní buňky. Nepřímý účinek je potom dán důsledkem zvýšení cytokinů a dalších proteinů akutní fáze, což vede k urychlení aterosklerotického procesu [21]. Chronické infekce tedy lze považovat za jeden ze spouštěcích mechanismů endotelového poškození [13].

Jako příklad bakteriálních patogenů můžeme uvést *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, či např. *Poryphyromonas gingivalis*. Z virů to je pak například cytomegalovirus, virus hepatitidy C, herpes simplex virus, či např. virus Epstein-Barrové [21].

1.3.2. Projevy

1.3.2.1. Hypertenze

Hypertenze je známým rizikovým faktorem mnoha KVS onemocnění. Různé studie odhalily zásadní roli endotelové dysfunkce u hypertenze [23]. Není však jasné, zda je hypertenze příčinou nebo důsledkem ED [15].

Důležitým faktorem v rozvoji endotelového poškození u hypertenzních pacientů je zvýšená aktivita renin-angiotenzinového systému (RAS). RAS, zejména jeho klíčový efektor AT-II, hrají zásadní roli v rozvoji hypertenze a jejích následků, přispívají k ED, hypertrofii vaskulárních buněk hladkého svalstva, oxidačnímu stresu, vazokonstrikci a zánětu [28, 31].

Projevy ED mohou také rozvoji hypertenze předcházet. Tak například zvýšená koncentrace ROS indukuje snížení biologické dostupnosti NO [28]. Bylo popsáno, že snížením produkce NO či prostacyklinu dochází ke zvýšení krevního tlaku [31]. NO také hraje roli při vylučování sodíku. Snížením jeho produkce dochází ke kumulaci sodíku a vody v organismu a nárůstu krevního tlaku [24].

Navzdory tomu, že mechanismy vedoucí ke vzniku hypertenze nejsou plně objasněny, důkazy poukazují na to, že ústřední roli v její patofyziologii hraje oxidační stres. Oxidační stres je totiž spojen s produkcí ROS, které podporují vznik vazokonstrikce a vaskulární hypertrofie [24]. Bylo prokázáno, že aktivace RAS, oxidační stres a zánět hrají zásadní roli v rozvoji ED u pacientů s hypertenzí, což vede k remodelaci cév, progresi aterosklerózy, a nakonec ke zvýšenému riziku KVS příhod [28].

1.3.2.2. Ateroskleróza

Endotelová dysfunkce se podílí na vývoji jak časných, tak i pozdních fází aterosklerózy [3]. Rizikové faktory predisponující k rozvoji aterosklerózy jako je hypertenze, DM, kouření a hypercholesterolémie, jsou spojeny s ED [15]. Všechny tyto rizikové faktory ovlivňují funkci EC, což má za následek jejich zvýšenou permeabilitu, adhezi leukocytů a expresi prokoagulačních molekul [22]. Při těchto stavech se fenotyp

endotelu mění na prozánětlivý a protrombogenní, mj. díky zvýšené expresi adhezních molekul (např. VCAM-1) a cytokinů (MCP-1).

Expresí těchto adhezních molekul a cytokinů dochází ke zvýšené adhezi monocytů k endotelu, jejich pronikání do cévní stěny, kumulaci a následné přeměně v makrofágy. Makrofágy potom exprimují receptory, které usnadňují pronikání a akumulaci lipoproteinových částic v subendotelovém prostoru. Dále sem pronikají T-lymfocyty z krevní cirkulace a buňky hladkých svalových buněk z medie. Působením ROS dochází k lipoperoxidaci těchto lipoproteinových částic a uvolněný oxidovaný cholesterol je pohlcen makrofágy za vzniku tzv. pěnových buněk. Nahromaděním pěnových buněk vznikají tzv. tukové proužky, které jsou již makroskopicky patrné. Hromaděním vaziva dále vznikají tzv. fibrózní pláty. Přeplněné pěnové buňky potom praskají a uvolněný cholesterol se dostává do extracelulárního prostoru kde dává vznik tzv. ateromovým plátům.

ED tedy nejenže představuje časnou, morfologicky němou fází aterosklerózy, ale podílí se také na vývoji morfologicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá tak ke klinické manifestaci aterosklerózy [3, 30].

1.3.2.3. *Diabetes mellitus*

Pacienti s DM vždy vykazují poruchu vazodilatace závislou na endotelu. Částečně je to způsobeno častou asociací tohoto onemocnění s dalšími KVS rizikovými faktory, včetně hypertenze, obezity a dyslipidémie. Mezi mechanismy vedoucí k rozvoji endotelového poškození u diabetických pacientů patří inzulínová rezistence a hyperglykémie [15].

Bylo publikováno velké množství studií o interakci mezi inzulínem a NO systémem, přičemž bylo prokázáno, že u zdravých jedinců je inzulín schopen vyvolat vazodilataci. Tento vazodilatační účinek inzulínu je částečně zprostředkován zvýšenou produkcí NO prostřednictvím aktivace inzulínového receptoru (viz. Obrázek 5) a zvýšenou expresí eNOS, čímž se vysvětluje vliv inzulínové rezistence na zhoršení endotelové funkce při DM [1].

Ke zhoršení funkce endotelu přispívá i hyperglykémie. ED byla pozorována dokonce i u normoglykemických jedinců (s vysokým rizikem rozvoje DM a inzulínové rezistence) během orálního glukózového tolerančního testu (oGTT). Hyperglykémie také vede ke vzniku produktů pokročilé glykace (AGEs), které se hromadí v cévní stěně, mění strukturální integritu endotelu a jsou schopny inhibovat aktivitu NO. Navíc v důsledku vazby AGEs na specifické povrchové receptory EC dochází k zesílení zánětlivé reakce, zvýšení vaskulární permeability a oxidačnímu stresu. To vše významně přispívá k ED [1].

1.4. Dieta s vysokým obsahem tuku (HFD)

Po konzumaci diety s vysokým obsahem tuku byla pozorována ED, která je spojená se zvýšeným oxidačním stresem. Hlavní složkou HFD zodpovědnou za indukci oxidačního stresu a dalších faktorů vedoucích ke vzniku endotelového poškození jsou FFA. Rostoucí množství důkazů naznačuje důležitou roli FFA při zprostředkování ED. Mezi možné příčiny FFA-indukované ED můžeme zařadit inzulínovou rezistenci, oxidační stres a zánět. FFA také usnadňují apoptózu EC a zprostředkovávají mnoho škodlivých účinků na endotelové progenitorové buňky [5].

1.4.1. Volné mastné kyseliny (FFA), hlavní složka HFD

FFA jsou karboxylové kyseliny s dlouhým alifatickým řetězcem obsahující na jednom konci skupinu methylovou, zatímco na druhém konci skupinu karboxylovou. V závislosti na přítomnosti dvojných vazeb se dělí na nasycené mastné kyseliny (SFA) bez dvojných vazeb, mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) s pouze jednou dvojnou vazbou a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) s nejméně dvěma dvojnými vazbami [33]. FFA mohou být také v závislosti na délce řetězce rozděleny do tří typů: FFA s krátkým (SCFA), středním (MCFA) a dlouhým řetězcem (LCFA) [34].

SFA pocházejí především z živočišných a mléčných produktů, kokosového a palmového oleje, zatímco nenasycené FFA, jako jsou MUFA a PUFA, se nacházejí v olivovém oleji, oříšcích a v některých tučných rybách [33].

Jsou to právě SFA, které jsou z velké části zodpovědné za KVS onemocnění narozdíl od UFA, které naopak proti KVS onemocněním spíše chrání. Zajímavé je, že i když PUFA mají ochrannou roli proti ED, jejich volná cirkulující forma by mohla také zprostředkovat negativní působení na endotel snížením dostupnosti NO a zvýšením ET-1 [35, 36].

SFA zvyšují hladinu LDL, což je hlavní rizikový faktor pro KVS onemocnění. Studie naznačují, že větší riziko pro rozvoj těchto onemocnění mají FA s dlouhým řetězcem [37]. Nejběžnějšími LCFA vyskytujícími se v západní stravě jsou kyselina myristová, kyselina palmitová (PA) a kyselina stearová (SA). Několik studií potvrdilo vliv PA jako silného faktoru přispívajícímu k rozvoji aterosklerózy [38].

1.4.2. Mechanismy indukce ED prostřednictvím FFA

FFA zprostředkovávají ED pomocí několika mechanismů, které mohou mít přímý či nepřímý vliv na produkci NO [5].

1.4.2.1. Potlačení signální dráhy AMPK/PI3K/Akt/eNOS

Jedním z možných mechanismů, jak FFA indukují ED je potlačení signální dráhy AMPK/PI3K/Akt/eNOS. Tato dráha je důležitá v inzulínové signalizaci. Inzulín je klíčovým mediátorem vazodilatace zprostředkované NO a AMPK (5' adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkináza). Inhibicí této dráhy FFA dochází ke snížení aktivity eNOS a tedy ke snížení produkce NO v EC odpovědného za vazodilataci [39].

Bylo prokázáno, že zvýšená hladina FFA v krevním řečišti poškozuje vazodilataci závislou na endotelu, zatímco vazodilatace nezávislá na endotelu zůstává neovlivněna. To naznačuje, že FFA hrají specifickou roli v inhibici produkce NO v EC [40].

Bylo také prokázáno, že aktivace mitochondriální dráhy AMPK/eNOS zmírňuje ED a aterosklerózu u myši krmených HFD [41].

1.4.2.2. Narušení produkce/uvolňování NO zprostředkované vápníkem

Dalším mechanismem je narušení produkce a uvolňování NO prostřednictvím vápníku. Vápník hraje klíčovou roli v endotelové funkci tím, že usnadňuje uvolňování NO prostřednictvím aktivace eNOS [42]. Bylo prokázáno, že FFA snižují množství intracelulárního vápníku v prasečích aortálních endotelových buňkách a tím narušují produkci/uvolňování NO [43]. Později další studie potvrdila škodlivé účinky FFA na endotelovou signalizaci vápníku a následnou aktivitu eNOS, která vedla ke snížení produkce NO [44].

1.4.2.3. Zprostředkování oxidačního stresu a zánětu

FFA mohou také zprostředkovávat oxidační stres a zánět v endotelu, což může ovlivnit signalizaci inzulínu a přispět ke snížení produkce NO.

Jak už bylo zmíněno, HFD, která je velkým zdrojem FFA, také indukují oxidační stres v endotelu [45, 46]. Bylo prokázáno, že FFA indukují nadměrnou expresi NADPH a

zprostředkovávají tak oxidační stres u potkanů s projevy obezity i DM typu II [47]. Případy oxidačního stresu vyvolané FFA byly prokázány i u EC zdravých lidí [48].

FFA mohou také přispívat k zánětlivým stavům, které vedou ke zvýšení endotelové permeability [49]. Jednou z hlavních cest vedoucích k ED vyvolané FFA je aktivace NF- κ B (nukleární faktor κ B), která je popsána v mnoha studiích [50]. Aktivace cesty NF- κ B vede ke zvýšené produkci ROS v EC a snížené produkci NO [51].

1.4.2.4. Aktivace RAS

Renin-angiotenzinový systém je klíčovým regulátorem arteriálního krevního tlaku. EC exprimují ACE nezbytný pro syntézu AT-II, který následně způsobuje vazokonstrikci stimulací produkce ET-1 a nedostatek NO. Pro posílení signalizační dráhy NO je důležitá inhibice ACE [52]. AT-II způsobuje vznik FFA prostřednictvím potlačení oxidační dráhy FA, na druhé straně mohou být FFA také aktivátory RAS. Aktivace RAS pomocí FFA může zvýšit hladinu ET-1, což může vést k vazokonstrikci [53, 54].

Myši postrádající ACE (ACE $-/-$) vykazují zvýšenou genovou expresi enzymů souvisejících s lipolýzou a oxidací FA, což by mohlo vysvětlit souhru mezi RAS a tvorbou FFA. Aktivita AT-II se podílí na patogenezi ED. FFA mohou aktivovat leukocyty a přispívat k adhezním vlastnostem leukocytů mechanismem závislým na AT-II, což vede k rozvoji ED. Inhibice RAS je hlavním preventivním opatřením proti FFA-indukované ED u lidí [55, 56, 57].

1.4.2.5. Účinky na endotelové progenitorové buňky

FFA mají také vliv na **endotelové progenitorové buňky**. Ty se podílejí na obnově endotelu při arteriálním poškození a faktory jako oxidační stres přispívají k jejich dysfunkci a apoptóze [58]. Dysfunkční **endotelové progenitorové buňky** jsou považovány za klíčové regulátory v patogenezi aterosklerózy a dalších KVS onemocnění [59].

1.4.3. Charakteristika použité diety

Vysokotuková dieta TD.88137 použita v tomto experimentu se vyznačuje několika kritickými parametry souvisejícími s rozvojem hypercholesterolémie a aterosklerózy. Tyto parametry zahrnují:

- 0,2 % celkového cholesterolu,
- 21 % hm. celkového tuku (tj. 42 % kcal z celkového množství),
- vysoký obsah nasycených mastných kyselin (> 60 % z celkového množství SFA),
- vysoký obsah sacharózy (34 % hm.).

Procentuální zastoupení hlavních živin a jejich podíl na kalorickém příjmu znázorňuje Tab. 1.

Tabulka 1: Nutriční hodnoty diety TD.88137

	% hm.	% kcal z celk. hm.
Proteiny	17,3	15,2
Sacharidy	48,5	42,7
Tuky	21,2	42,0
kcal/g	4,5	
Cholesterol	0,2 %	

Data převzata z: TD.88137 Adjusted calories diet (42 % from fat) [60].

Procentuální obsah jednotlivých typů mastných kyselin ve vztahu k celkové hmotnosti diety a celkové hmotnosti obsažených mastných kyselin znázorňuje Tab. 2.

Tabulka 2: Spektrum mastných kyselin diety TD.88137

	% z diety	% z celk. hm. MK
Celkem	20,7	100,0
SFA	12,8	61,8
MUFA	5,6	27,3
PUFA	1,0	4,7
Jiné	1,3	6,2

Data převzata z: TD.88137 Adjusted calories diet (42 % from fat) [60].

1.5. Myografie

Ke studiu aktivity velkých a malých krevních cév jsou široce využívány drátové a tlakové myografy [61, 62, 63, 64, 65]. Pro tuto experimentální práci byl použit **myograf drátový**, kterému bude věnován následující text.

V dřívějších letech (před rokem 1970) byla většina informací o mechanických, morfologických a farmakologických vlastnostech hladké svaloviny cév omezena pouze na větší tepny (hlavně aortu). Zatímco informace o menších tepnách byly odvozeny čistě z perfúzních experimentů a histologických vyšetření. Ve druhé polovině 70. let minulého století (1977) však prof. Mulvany a prof. Halpern vyvinuli a představili úžasnou techniku zvanou drátová myografie [69, 70]. Tato *in vitro* technika nám umožňuje zkoumat cévní reaktivitu izolovaných tepen s malým odporem. Různé typy cév tak mohou být zkoumány v různých patologických stavech [66, 67].

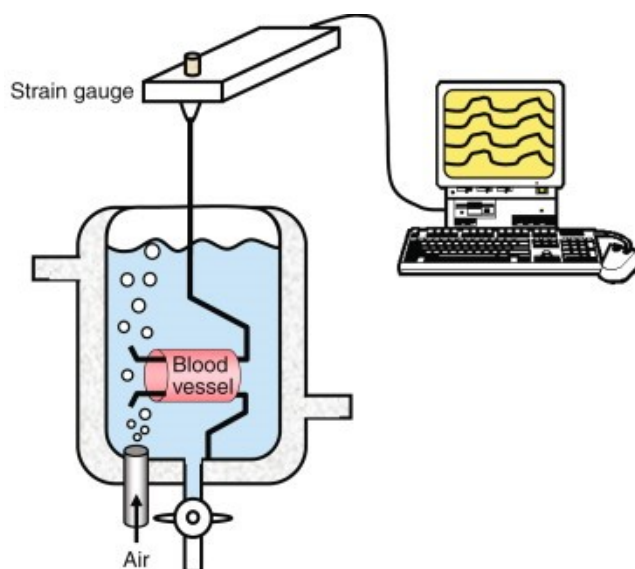
1.5.1. Základní princip

V drátovém myografu je krevní céva rozdělena na stejně dlouhé segmenty a každý segment je připevněn dvěma háčky (dráty) k myografu [61]. Dráty z koroziuvzdorné oceli jsou upřednostňovány před wolframovými kvůli jejich oxidaci, která ovlivňuje zaznamenané odezvy [68]. Typicky je jeden z háčků pevný, zatímco druhý je připojen ke snímači síly. Délka segmentu je udržována konstantní (izometrická), zatímco síla je zaznamenávána během kontrakce nebo relaxace. Zatímco při vazokonstrikci se obvodové napětí zvyšuje, při vazodilataci naopak klesá. Předností této metody je, že poskytuje izometrické vlastnosti a měření napětí jsou velmi citlivá. Nevýhodou je, že geometrie a zatížení se výrazně odchyľují od fyziologických podmínek a preparace cévních segmentů může způsobit poškození endotelu. Drátěný myograf je také méně citlivý pro malé cévy [61].

1.5.2. Popis přístroje

Multimyografický systém – model 620M, použitý pro tento experiment, je vysoce sofistikovaný výzkumný přístroj, vhodný jak pro farmakologické experimenty, tak pro *in vitro* studie vaskulární reaktivity cév a jiných tkání (krční tepna a aorta, průdušnice, střevo, nebo močový měchýř) [71].

Každá jednotlivá jednotka myografu, vyrobená z hliníku, má centrálně umístěnou komoru z nerezové oceli. Háčky nebo drátky pro uchycení tkáně jsou pak umístěny v této komoře, kde jedna strana je připojena k tenzometru (snímač síly) a druhá strana je připojena k mikrometru. Každá jednotka má individuálně řízený přívod a odsávání plynu (Obrázek 7). Ohřev a připojení pro odsávání a plynování jsou v rozhraní myografu, což umožňuje, aby vzorky ve všech čtyřech komorách byly udržovány za fyziologických podmínek (řízené teplotě 37 °C a syceny plynnou směsí) [71].



Obrázek 7: Jednotka drátového myografu

Obrázek schematicky znázorňuje metodu měření odezvy izolovaných krevních cév pomocí drátové myografie. Myografická jednotka se skládá z komory, kterou lze naplnit fyziologickým pufrem a provzdušnit vhodnou směsí plynů. Malý kousek krevní cévy je upevněn mezi dva drátěné háčky (tmavě černé čáry). Spodní (nepohyblivý) hák je připevněn k mikrometru a horní hák je připojen k citlivému tenzometru. Kontrakce nebo relaxace cévy je snímána tenzometrem a signál je odeslán do počítače. Do komory mohou být přidány požadované sloučeniny pro stanovení cévní vazoaktivity.

Převzaté z: *Design and Physiology of arteries and veins. Physiology of Resistance Vessels* [online]. Dostupné na:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123745538000551?via%3Dihub> [13.2.2023] [72].

2. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovit funkční parametry, zejména vliv vazodilatačního faktoru acetylcholinu na endotelové buňky hrudní části myší aorty. Myši byly krmeny po dobu 12 týdnů dietou s vysokým obsahem tuku (HFD – high fat diet), která u nich měla navodit endotelovou dysfunkci v aortě a jejíž přítomnost jsme chtěli stanovit. K měření vazokonstrikce a vazodilatace myší aorty byl použit drátový myograf. Experimentální skupina myší na HFD byla porovnána s kontrolní skupinou myší krmených běžnou stravou (tzv. chow type diet).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

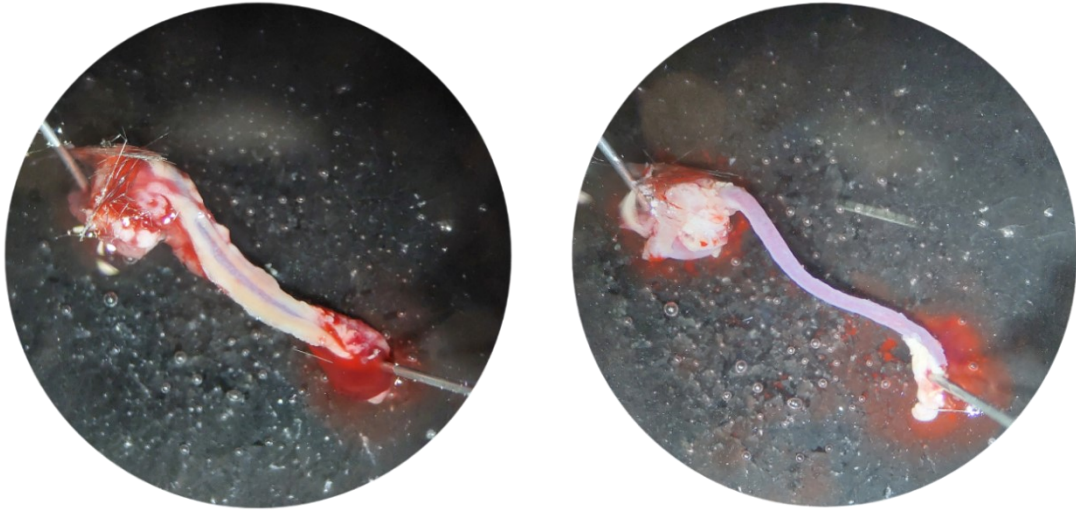
3.1. *Schéma experimentu*

V experimentu byli použiti myši samci kmene C57BL/6J ve věku 7 měsíců (n=16). Kontrolní skupina zvířat byla krmena *ad libitum* standardní laboratorní dietou (kontrola, n=8) a druhá skupina zvířat byla krmena *ad libitum* vysokotukovou dietou TD.88137 s obsahem 42 % kcal tuku po dobu 3 měsíců (HFD, n=8). Zvířata byla chována ve Viváriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za standardních laboratorních podmínek, v místnosti s kontrolovanou teplotou a vlhkostí, při dvanáctihodinovém cyklu střídání světla a tmy. Na konci experimentu byla zvířata usmrcena cervikální dislokací v hluboké narkóze. Zvířatům byla odebrána krev z vena cava inferior k další analýze a poté odebrána hrudní část aorty.

Všechny experimenty byly provedeny ve shodě s EEC (86/609/EEC).

3.2. *Izolace a preparace aorty*

Vlastnímu experimentu předcházela izolace a preparace hrudní části myší aorty. Ta byla po vyjmutí ihned umístěna do Krebsova-Henseleitova pufru. Pomocí stereoskopického mikroskopu byla následně odstraněna přilehlá tuková tkáň, jak znázorňuje Obrázek 8. Hrudní aorta byla rozdělena na 4 segmenty, každý o délce přibližně 2 mm. Tyto segmenty byly následně umístěny na drátky do komor myografu (620M, Danish Myo Technology, Dánsko) naplněných po 5 ml Krebsova-Henseleitova pufru (viz. Kapitola 3.3. Obrázek 9).



Obrázek 8: Myší aorta

Obrázek vlevo znázorňuje izolovanou hrudní část myší aorty před preparací. Obrázek vpravo zobrazuje tutéž aortu po odstranění okolní tukové tkáně (perivaskulárního tuku).

Pozn.: Foto autor

3.3. Vlastní měření

Před začátkem kalibrace jsme komory myografu promyli ultra čistou vodou a spustili zahřívání (37 °C). Po upevnění segmentů aorty do komor (viz. Obrázek 9) následovala 20 minut **kalibrace**. Segmenty jsou v Krebsově pufru, který je syčen směsí 95 % O₂ a 5 % CO₂.



Obrázek 9: Segment aorty umístěný v komoře myografu

Obrázek znázorňuje segment hrudní části aorty upevněný na drátkách v komoře myografu. Drátky snímají sílu v mN s nepřetržitým záznamem napětí v programu LabChart (LabChart, ADI Instruments, Austrálie).

Pozn.: Foto autor

Po kalibraci jsme každý segment **normalizovali**, aby byly všechny segmenty ve stejném stavu, který odpovídá fyziologickému tlaku, který na stěnu aorty působí.

Po normalizaci jsme všechny kanály vynulovali a segmenty roztáhli na hodnotu odpovídající tlaku 5 mN. Doba rozpínání byla 15 minut. Po 15 minutách jsme manuálně opět nastavili hodnotu 5 mN (hodnota napětí segmentů má klesající tendenci) a nechali segmenty dalších 10 minut rozpínat.

Po 10 minutách jsme hodnoty vynulovali, vypustili Krebs-Henseleitův pufr z komor a ověřili životaschopnost cévy vazokonstrikční odpovědí na chlorid draselný (KCl), viz. následující kroky:

- přidání KCl 5 ml (do každé komory), t = 10 minut,
- promytí Krebs-Henseleitovým pufrem (třikrát), t = 15 minut,

- přidání KCl 5 ml (do každé komory), t = 10 minut,
- promytí Krebs-Henseleitovým puřrem (třikrát), t = 15 minut (hodnota musí být 0 mN).

Po promytí byly segmenty aorty kontrahovány zvyšujícími se koncentracemi PGF2 α (v uvedeném pořadí od nejniřší koncentrace po nejvyšří, jak znázorňuje Tabulka 3), aby se dosáhlo minimálně 80 % kontrakce vyvolané KCl. Před přidáním další koncentrace je nutné vřdy čekat cca 2 minuty do ustálení hodnot koncentrace předeřlé (pozorujeme tzv. fázi plateau).

Tabulka 3: Koncentrační řada a pipetované množství PGF2 α

Koncentrace PGF2α	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
Pipetované množství [μl]	10	9	9	9

Po dosažení stabilní plateau fáze jsme indukovali na endotelu závislou relaxaci kumulativní koncentrací acetylcholinu (viz. Tabulka 4). Před přidáním další koncentrace je nutné vřdy čekat cca 2 minuty do ustálení hodnot koncentrace předeřlé (pozorujeme tzv. fázi plateau).

Po koncentraci ACh 10⁻⁹ a 10⁻⁸ nebývá vidět řádný pokles. Koncentrace 10⁻⁵ už může navodit vazokonstrikci, protože M receptory jsou saturovány a ACh působí na hladké svalové buňky, a to konstrikčně.

Tabulka 4: Koncentrační řada a pipetované množství ACh

Koncentrace ACh	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
Pipetované množství [μl]	10	9	9	9

Následovalo promytí Krebs-Henseleitovým puřrem (třikrát), než hodnota klesla na 0 mN (cca 15 minut). Přidali jsme opět koncentrační řadu PGF2 α (viz. Tabulka 3) pro navození vazokonstrikce.

Po ustálení plateau fáze jsme pro vyvolání relaxace nezávislé na endotelu bez promytí přidali koncentrační řadu nitroprusidu sodného – SNP (viz. Tabulka 5), pro ověření vazodilatace cévy. Před přidáním další koncentrace je nutné vždy čekat cca 2 minuty do ustálení hodnot koncentrace předešlé (pozorujeme tzv. fázi plateau).

Po dosažení hodnoty 0 mN vypneme záznam a uložíme záznam napěťové křivky.

Tabulka 5: Koncentrační řada a pipetované množství SNP

Koncentrace SNP	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
Pipetované množství [μl]	10	9	9	9

Po dokončení experimentu jsme vyjmuli segmenty aorty, vypustili obsah komor a každou promyli ultra čistou vodou. Následně jsme do každé komory napipetovali 5 ml 2% kyseliny octové, nechali chvíli působit a opět několikrát promyli ultra čistou vodou.

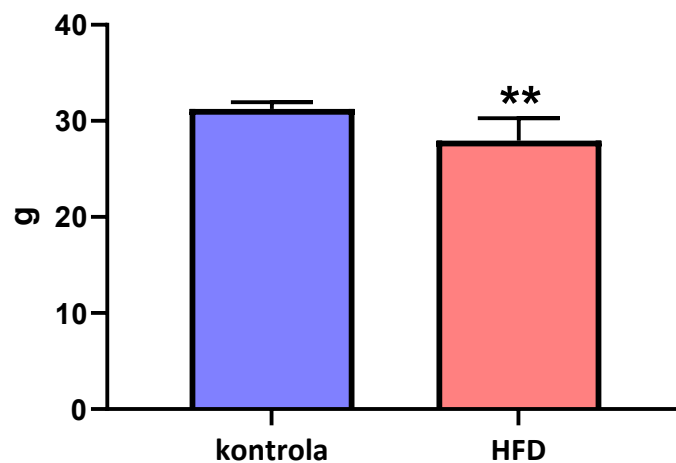
3.4. Statistické hodnocení

Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí softwaru GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software, Inc., USA). Data jsou uvedena jako střední hodnota \pm IQR. Pro přímé porovnání skupin a rovněž při skupinové analýze koncentračních křivek byl využit Mann-Whitney test. Statisticky významné hodnoty byly stanoveny při hodnotách $p \leq 0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1. Hmotnost zvířat

Hmotnost zvířat byla na konci experimentu statisticky významně nižší ve skupině HFD krmené vysokotukovou dietou v porovnání s kontrolní skupinou myši krměných standardní laboratorní dietou (kontrola vs. HFD, $31,25 \pm 2,54$ vs. $27,94 \pm 3,54$ g) (Graf 1).

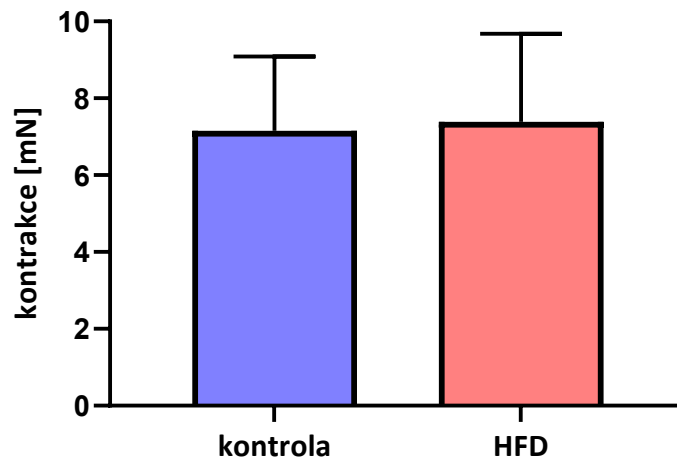


Graf 1: Hmotnost zvířat na konci experimentu v gramech

Data jsou zobrazena jako střední hodnota \pm IQR, Mann-Whitney test, $**p \leq 0,01$.

4.2. Maximální vazokonstrikční odpověď na KCl

Při stanovení maximální vazokonstrikční odpovědi na 60 mM KCl jsme nezaznamenali žádné rozdíly mezi kontrolní skupinou a HFD skupinou ($7,15 \pm 3,69$ vs. $7,39 \pm 5,09$ mN) (Graf 2).

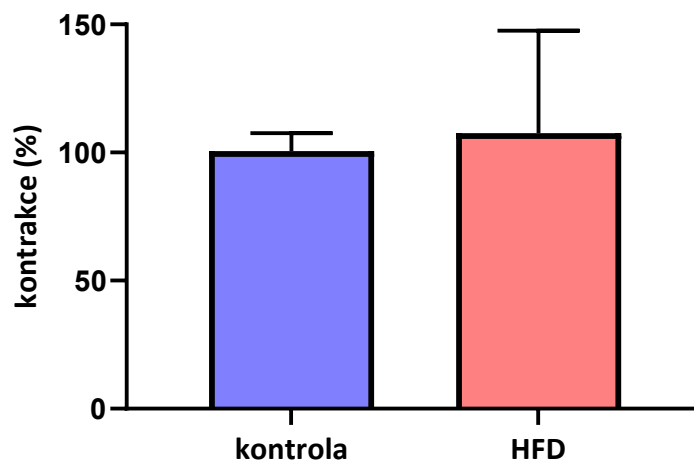


Graf 2: Maximální vazokonstrikční odpověď na 60 mM KCl

Data jsou zobrazena jako střední hodnota \pm IQR.

4.3. Maximální vazokonstrikční odpověď na $\text{PGF2}\alpha$

Při měření vazokonstrikční odpovědi na prostaglandin $\text{F2}\alpha$ (kontrola vs. HFD, $100,5 \pm 18,5$ vs. $107,5 \pm 61,25$ % z maximální odpovědi na 60 mM KCl) jsme rovněž nezjistili statisticky významný rozdíl (Graf 3).

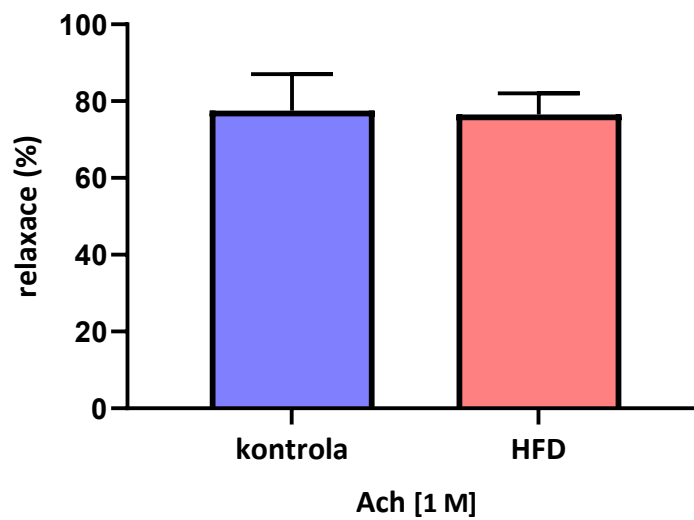


Graf 3: Maximální vazokonstrikční odpověď na $\text{PGF2}\alpha$, zobrazeno jako % z maximální vazokonstrikční odpovědi na KCl

Data jsou zobrazena jako střední hodnota \pm IQR.

4.4. Maximální vazodilatační odpověď na Ach

Na endotelu závislá maximální vazodilatace indukovaná acetylcholinem v pre-kontrahovaných (PGF2 α) segmentech aorty byla stejná v obou porovnávaných skupinách (kontrola vs. HFD, 77,5 \pm 21,25 vs. 76,5 \pm 22,75 %) (Graf 4).

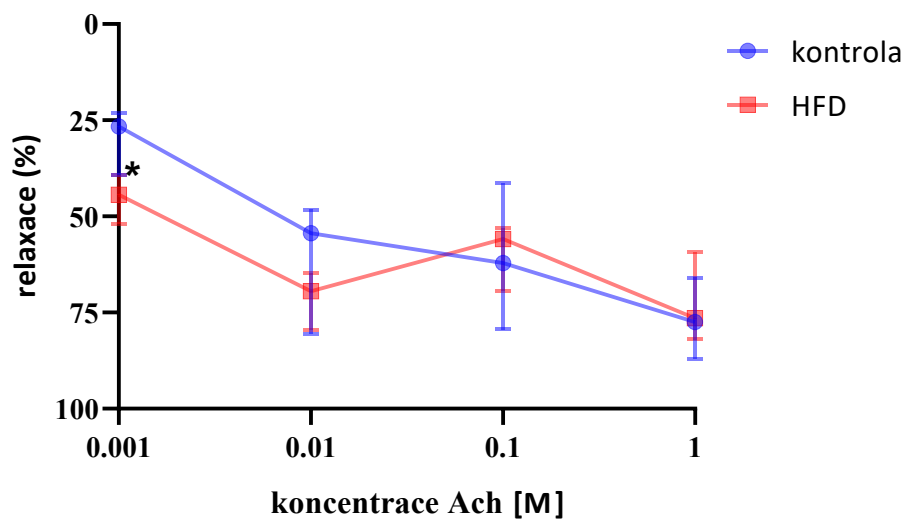


Graf 4: Maximální vazodilatační odpověď na Ach v pre-kontrahované aortě (PGF2 α)

Data jsou zobrazena jako střední hodnota \pm IQR.

4.5. Vazodilatační odpověď na Ach v závislosti na koncentraci

Při porovnání koncentrační křivky vazodilatační odpovědi na Ach jsme zjistili signifikantně lepší vazorelaxaci při koncentraci 0,001 M ve skupině HFD (kontrola vs. HFD, $26,63 \pm 16,13$ vs. $44,38 \pm 12,75$ %), při dalších koncentracích byla odpověď aortálních segmentů již stejná, bez rozdílu mezi skupinami (Graf 5).

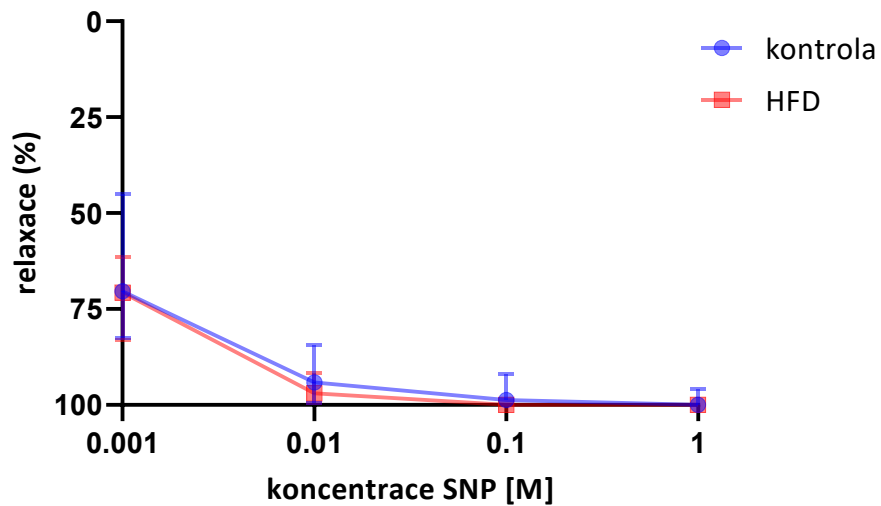


Graf 5: Vazodilatační odpověď na Ach v závislosti na jednotlivých koncentracích

Data jsou zobrazena jako střední hodnota ± IQR, Mann-Whitney test, * $p \leq 0,05$.

4.6. Vazodilatační odpověď na SNP v závislosti na koncentraci

Na endotelu nezávislá vazorelaxace indukovaná nitroprusidem sodným byla v obou sledovaných skupinách stejná při všech aplikovaných koncentracích a maximální odpověď na 1 M SNP byla $100 \pm 4,13$ vs. 100 ± 0 , kontrola vs. HFD (Graf 6).



Graf 6: Vazodilatační odpověď na SNP v závislosti na jednotlivých koncentracích

Data jsou zobrazena jako střední hodnota \pm IQR.

5. DISKUZE

Endotelová dysfunkce je charakteristickým rysem mnoha KVS onemocnění, včetně aterosklerózy a chronické hypertenze. Důkazy naznačují, že zvýšená tvorba ROS je důležitým aspektem vaskulární dysfunkce a zvýšení aktivity ROS urychluje inaktivaci NO, což vede ke snížení bioaktivního NO a zvýšení vaskulární rezistence. Několik studií prokázalo, že tuk, fruktóza a sacharóza mohou vyvolat endotelovou dysfunkci [74].

Podávání vysokotukové diety (HFD) vede k rozvoji obezity u experimentálních zvířat [74]. V našem experimentu jsme překvapivě zaznamenali signifikantní snížení váhy u zvířat, které byly 3 měsíce krmeny HFD. Zvířata byla krmena *ad libitum* dle dostupné literatury, navíc jsme nezaznamenali výrazně snížený příjem potravy ani změny zdravotního stavu zvířat, zatímco jiní autoři prokázali, že podávání HFD vedlo ke zvýšení váhy a rozvoji obezity u myší [74, 75].

Endotelová dysfunkce v malých i velkých cévách bývá často měřena využitím myografu, kdy nejvýraznějším ukazatelem porušené funkce endotelu je snížená vazodilatační odpověď na látky, které indukují produkci NO endotelovými buňkami [66]. Některé studie potvrzují rozvoj endotelové dysfunkce po podávání HFD, avšak v naší studii jsme nezaznamenali žádné rozdíly mezi skupinami po podávání standardní nebo vysokotukové diety ve vazokonstrikční ani vazodilatační odpovědi aortálních segmentů. Rozdíly mohou vyplývat z různého uspořádání experimentu, kdy v jedné studii se začalo s podáváním HFD u myších samců C57BL/6J již ve věku 4 týdnů. Takto nízký věk však není pro dietní studie doporučovaný, i když jsou zvířata v takto nízkém věku senzitivnější k jakémukoliv zásahu [73]. V jiné studii byly k pokusu použity 8 týdenní myší samice, které byly krmeny HFD po dobu 16 týdnů a výsledky měření na myografu ukázaly nižší acetylcholinem indukovanou vazorelaxační odpověď v porovnání s kontrolní skupinou krmenou normální dietou [75].

V posledních letech se porušená cévní funkce dává do souvislosti s perivaskulární tukovou tkání, která bývá pro standardní měření na myografu většinou odstraněna. Bylo zjištěno, že zatímco vazodilatační odpověď aorty na acetylcholin po odstranění perivaskulárního tuku byla po podávání HFD stejná jako po podávání standardní

laboratorní diety, tak při zachování perivaskulárního tuku byla relaxace aortálních segmentů na myografu signifikantně snížena [76].

Naše výsledky ukazují, že použitá vysokotuková dieta s obsahem 42 % kcal tuku nemá vliv na funkční parametry myší aorty. Je možné, že změny nastávají v tomto uspořádání pokusu na molekulární úrovni a změny v expresi některých proteinů, které charakterizují endotelovou dysfunkci je vhodné sledovat pomocí některých molekulárních metod, například Western blot.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit funkční parametry, zejména vliv vazodilatačního faktoru acetylcholinu na endotelové buňky hrudní části myší aorty.

Při stanovení maximální vazokonstrikční odpovědi na 60 mM KCl jsme nezaznamenali žádné rozdíly mezi kontrolní skupinou a HFD skupinou, rovněž jsme nezjistili statisticky významný rozdíl při měření vazokonstrikční odpovědi na prostaglandin F_{2α}.

Na endotelu závislá maximální vazodilatace indukovaná acetylcholinem v prekontrahovaných segmentech aorty byla stejná v obou porovnávaných skupinách, rovněž nebyl zaznamenán žádný rozdíl v relaxaci indukované nitroprusidem sodným.

Výsledky této práce ukazují, že podávání vysokotukové diety u myšího kmene C57BL/6J v tomto věku a v časovém horizontu nemá signifikantní vliv na rozvoj endotelové dysfunkce z pohledu funkční analýzy.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Anglický význam	Český význam
ACE	angiotensin converting enzyme	angiotenzin konvertující enzym
AGEs	advanced glycation end products	konečné produkty pokročilé glykace
Ach	acetylcholine	acetylcholin
Akt (PKB)	protein kinase B	protein kináza B
AMPK	5' adenosine monophosphate activated protein kinase	5' adenosin monofosfátem aktivovaná protein kináza
AT₁	angiotensin II receptor type 1	receptor angiotenzinu II typu 1
AT-I/II	angiotensin I/II	angiotenzin I/II
BH₄	tetrahydrobiopterin	tetrahydrobiopterin
cAMP	adenosine 3',5'-monophosphate	adenosin 3',5'-monofosfát
cGMP	guanosine 3',5'-monophosphate	guanosin 3',5'-monofosfát
CRP	c-reactive protein	c-reaktivní protein
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
EC	endothelial cells	endotelové buňky
ED	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkce
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor	od endotelu odvozený hyperpolarizační faktor
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ET-1	endothelin-1	endotelin-1
ET_{A/B}	endothelin receptor _{A/B}	endotelinový receptor _{A/B}
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavin adenin dinukleotid
FFA	free fatty acids	volné mastné kyseliny

FMN	flavin mononucleotide	flavin mononukleotid
GC	guanylate cyclase	guanylát cykláza
HFD	high fat diet	vysokotuková dieta
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	mezibuněčná adhezní molekula 1
IL-1/6	interleukin-1/6	interleukin-1/6
KVS	cardiovascular	kardiovaskulární
LCFA	long chain fatty acids	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LDL	low density lipoprotein	lipoprotein o nízké hustotě
MCFA	medium chain fatty acids	mastné kyseliny se středním řetězcem
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1	monocytární chemotaktický protein-1
MUFA	monounsaturated fatty acids	mononenasyčené mastné kyseliny
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NF-κB	nuclear factor kappa B	nukleární faktor kappa B
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
PAF	platelet activating factor	faktor aktivující krevní destičky
PAI-1	plasminogen activator inhibitor	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PDGF	platelet derived growth factor	destičkový růstový faktor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule	adhezní molekula krevních destiček
PGF_{2α}	prostaglandin F _{2α}	prostaglandin F _{2α}
PGH₂	prostaglandin H ₂	prostaglandin H ₂
PGI₂	prostaglandin I ₂	prostaglandin I ₂
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza

PKC	protein kinase C	protein kináza C
PUFA	polyunsaturated fatty acids	polynenasycené mastné kyseliny
RAS	renin-angiotensin system	renin-angiotenzinový systém
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
SCFA	short chain fatty acids	masné kyseliny s krátkým řetězcem
SFA	saturated fatty acids	nasyčené mastné kyseliny
TF	tissue factor	tkáňový faktor
TGF-β	transforming growth factor β	transformující růstový faktor β
TM	thrombomodulin	trombomodulin
TNF-α	tumor necrosis factor alfa	tumor nekrotizující faktor alfa
TP	thromboxane prostanoid receptor	tromboxanový prostanoidní receptor
tPA	tissue plasminogen activator	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA₂	thromboxane A ₂	tromboxan A ₂
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	cévní adhezní molekula 1
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
vWF	von Willebrand factor	von Willebrandův faktor

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Aorta	10
Obrázek 2: Struktura elastické artérie: a) schéma, b) skutečné zobrazení (x48)	11
Obrázek 3: Endotelové buňky	14
Obrázek 4: Přehled účinků endotelových faktorů na funkci hladké svaloviny cév a cirkulujících krvinek	18
Obrázek 5: Signalizace NO ve zdravém (vlevo) i dysfunkčním (vpravo) endotelu	21
Obrázek 6: ED indukovaná oxidačním stresem	22
Obrázek 7: Jednotka drátového myografu	32
Obrázek 8: Myší aorta	35
Obrázek 9: Segment aorty umístěný v komoře myografu.....	36

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nutriční hodnoty diety TD.88137	30
Tabulka 2: Spektrum mastných kyselin diety TD.88137	30
Tabulka 3: Koncentrační řada a pipetované množství PGF2 α	37
Tabulka 4: Koncentrační řada a pipetované množství ACh	37
Tabulka 5: Koncentrační řada a pipetované množství SNP	38

10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Hmotnost zvířat na konci experimentu v gramech	39
Graf 2: Maximální vazokonstrikční odpověď na 60 mM KCl.....	40
Graf 3: Maximální vazokonstrikční odpověď na PGF2 α , zobrazeno jako % z maximální vazokonstrikční odpovědi na KCl	41
Graf 4: Maximální vazodilatační odpověď na Ach v pre-kontrahované aortě (PGF2 α) .	42
Graf 5: Vazodilatační odpověď na Ach v závislosti na jednotlivých koncentracích.....	43
Graf 6: Vazodilatační odpověď na SNP v závislosti na jednotlivých koncentracích	44

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Park, K. H., Park, W. J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci*, 2015. 30(9): 1213-1225.
2. OECD/European Observatory on Health Systems and Policies. Česká republika: zdravotní profil země 2017, State of Health in the EU. OECD Publishing, 2017. Paris/European Observatory on Health Systems and Policies, Brussels. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264285125-cs>
3. Karásek, D., et al. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Internal Medicine for Practice*, 2004. 6(9): 450-453.
4. *Fyziologie endotelu, dysfunkce endotelu*. Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF a FZV UP Olomouc [online]. Olomouc, 2012 [4.2.2023]. Dostupné z: <http://pfyziolklin.upol.cz/?p=1456>
5. Ghosh, A., et al. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci*, 2017. 24(1): 50.
6. Martínek, J., Vacek, Z. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2008. s. 11-12. ISBN 978-80-247-2393-8.
7. Vajner, L., Uhlík, J., Novotný, T., et al. *Lékařská histologie II. Mikroskopická anatomie*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2018. s. 6-12. ISBN: 978-80-246-3827-0.
8. *Your Aorta*. Cardiac Health [online]. Dostupné na: <https://www.cardiachealth.org/your-heart/aorta/> [19.1.2023].
9. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie*. 3. vydání. Praha: Grada, 2012. s. 212-217. ISBN 978-80-247-3729-4.
10. Čihák, R. *Anatomie 3*. 3. vydání. Praha: Grada, 2016. s. 79-86. ISBN 978-80-247-5636-3.
11. Hronek, M. *Praktická cvičení z morfologie a fyziologie pro posluchače Farmaceutické fakulty*. Praha: Karolinum, 2014. s 16. ISBN 978-80-246-2293-4.

12. Ross, M. H., Wojciech, P. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Seventh edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2016. ISBN 9781451187427.
13. Vrablík, M., et al. Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Medicine for Practice*, 2011. 8(3): 119-122.
14. Karetová, D. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Internal Medicine for Practice*, 2002. 4(3): 119-122.
15. Rajendran, P., et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*, 2013. 9(10): 1057-1069.
16. Feletou, M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells— Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. *Morgan & Claypool Life Sciences*, 2011.
17. Claesson-Welsh, L. Vascular permeability--the essentials. *Ups J Med Sci*, 2015. 120(3): 135-143.
18. Michiels, C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*, 2003. 196(3): 430-443.
19. Kittnar, O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. s 176. ISBN 978-80-247-3068-4.
20. Hadi, H. A., Carr, C. S., Al Suwaidi, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*, 2005. 1(3): 183-198.
21. Campbell, L. A., Rosenfeld, M. E. Infection and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res*, 2015. 46(5): 339-350.
22. Lawson, C., Wolf, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 2009. 61(1): 22-32.
23. Sun, H. J., et al. Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. *Life Sci*, 2016. 167: 6-11.
24. Konukoglu, D., Uzun, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol*, 2017. 956: 511-540.
25. Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., et al. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular journal of Africa*, 2012. 23(4): 222-231.

26. Medina-Leyte, D. J., Zepeda-Garcia, O., Dominguez-Perez, M., et al. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int. J. Mol. Sci*, 2021. 22(8): 3850.
27. Bockus, L., Kim, F. Coronary endothelial dysfunction: from pathogenesis to clinical implications. *Open Heart*, 2022. 9(2): e002200.
28. Gallo, G., Volpe, M., Savoia, C. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Front Med (Lausanne)*, 2022. 8: 798958.
29. Shaito, A., Aramouni, K., Assaf, R., et al. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022. 27(3): 105.
30. *Ateroskleróza*. Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF a FZV UP Olomouc [online]. Olomouc, 2011 [16.2.2023]. Dostupné z: <http://pfyziolklin.upol.cz/?p=1449>
31. Bultas, J., Cífková, R., Češka, R., et al. *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční*. Praha: Galén, 1999. s. 11-41. ISBN: 80-7262-026-6.
32. Štejfka, M. *Kardiologie*. 3. vydání. Praha: Grada, 2007. s. 54. ISBN 978-80-247-1385-4.
33. Vadivel, V., Kunyanga, C. N., Biesalski, H. K. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. *Nutrition*, 2012. 28(11-12): 1089-1097.
34. Mielenz, M. Invited review: nutrient-sensing receptors for free fatty acids and hydroxycarboxylic acids in farm animals. *Animal*, 2017. 11(6): 1008–1016.
35. Das, U. Long-chain polyunsaturated fatty acids interact with nitric oxide, superoxide anion, and transforming growth factor-beta to prevent human essential hypertension. *Eur J Clin Nutr*, 2004. 58(2): 195.
36. Mitjavila, M., Storniolo, C., Moreno, J. Olive oil polyphenols protect endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids by modulating nitric oxide and endothelin-1. *Atherosclerosis*, 2014. 235(2): 110–111.
37. Briggs, M. A., Petersen, K. S., Kris-Etherton, P. M. Saturated fatty acids and cardiovascular disease: replacements for saturated fat to reduce cardiovascular risk. *Healthcare (Basel)*, 2017. 5(2): 29.

38. Chen, X., Liu, L., Palacios, G., et al. Plasma metabolomics reveals biomarkers of the atherosclerosis. *J Sep Sci*, 2010. 33(17–18): 2776–2783.
39. Steinberg, H. O., Brechtel, G., Johnson, A., et al. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Investig*, 1994. 94(3): 1172.
40. Steinberg, H. O., Tarshoby, M., Monestel, R., et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Investig*, 1997. 100(5): 1230.
41. Xing, S. S., Yang, X. Y., Zheng, T., et al. Salidroside improves endothelial function and alleviates atherosclerosis by activating a mitochondria-related AMPK/PI3K/Akt/eNOS pathway. *Vasc Pharmacol*, 2015. 72: 141–152.
42. Binienda, Z. K., Sarkar, S., Silva-Ramirez, S., et al. Role of free fatty acids in physiological conditions and mitochondrial dysfunction. *Food Nutr Sci*, 2013. 4(09): 6.
43. Kuroda, R., Hirata, K. I., Kawashima, S., et al. Unsaturated free fatty acids inhibit Ca²⁺ mobilization and NO release in endothelial cells. *Kobe J Med Sci*, 2001. 47(5): 211–220.
44. Esenabhalu, V. E., Schaeffer, G., Graier, W. F. Free fatty acid overload attenuates Ca²⁺ signaling and NO production in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*, 2003. 5(2): 147–153.
45. Williams, M. J., Sutherland, W. H., McCormick, M. P., et al. Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 33(4): 1050–1055.
46. Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B. M. Age associated endothelial dysfunction: role of oxidative stress, inflammation and western diet. *Nutrition and Aging*, 2014. 2(4): 197–211.
47. Chinen, I., Shimabukuro, M., Yamakawa, K., et al. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology*, 2007. 148(1): 160–165.
48. Tampakakis, E., Tabit, C. E., Holbrook, M., et al. Intravenous lipid infusion induces endoplasmic reticulum stress in endothelial cells and blood mononuclear cells of healthy adults. *J Am Heart Assoc*, 2016. 5(1): e002574.

49. Li, X., Wang, L., Nguyen, T., et al. Enhanced endothelial permeability by free fatty acid due to lysosomal cathepsin B-mediated activation of Nlrp3 inflammasome activation. *The FASEB Journal*, 2016. 7(45): 73229-73241.
50. Li, H., Li, H., Bao, Y., et al. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor- κ B pathway in rat aorta. *Int J Cardiol*, 2011. 152(2): 218–224.
51. Iwata, N. G., Pham, M., Rizzo, N. O., et al. Trans fatty acids induce vascular inflammation and reduce vascular nitric oxide production in endothelial cells. *PLoS One*, 2011. 6(12): e29600.
52. Lüscher, T. F. Endothelial dysfunction: the role and impact of the reninangiotensin system. *Heart*, 2000. 84(1): i20–i2.
53. Pellieux, C., Montessuit, C., Papageorgiou, I., et al. Angiotensin II downregulates the fatty acid oxidation pathway in adult rat cardiomyocytes via release of tumour necrosis factor- α . *Cardiovasc Res*, 2009. 82(2): 341–50.
54. Sun, J., Luo, J., Ruan, Y., et al. Free fatty acids activate renin-angiotensin system in 3T3-L1 adipocytes through nuclear factor-kappa B pathway. *Journal of diabetes research*, 2015. 2016: 1587594.
55. Jayasooriya, A. P., Mathai, M. L., Walker, L. L., et al. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc Natl Acad Sci*, 2008. 105(18): 6531–6536.
56. Azekoshi, Y., Yasu, T., Watanabe, S., et al. Free fatty acid causes leukocyte activation and resultant endothelial dysfunction through enhanced angiotensin II production in mononuclear and polymorphonuclear cells. *Hypertension*, 2010. 56(1): 136–142.
57. Watanabe, S., Tagawa, T., Yamakawa, K., et al. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(11): 2376–2380.
58. Sorrentino, S. A., Bahlmann, F. H., Besler, C., et al. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 2007. 116(2): 163–173.
59. Werner, N., Nickenig, G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(2): 257–266.

60. TD.88137 *Adjusted calories diet (42 % from fat)*. Envigo [online]. Indianapolis, 2016 [15.3.2023]. Dostupné z: <https://insights.envigo.com/hubfs/resources/data-sheets/88137.pdf>
61. Lu, X., Kassab, G. S. Vasoactivity of Blood Vessels Using a Novel Isovolumic Myograph. *Ann Biomed Eng*, 2007. 35: 356–366.
62. Bevan, J. A., Osher, J. V. A direct method for recording tension changes in the wall of small blood vessel in vitro. *Agents Actions*, 1972. 2: 257–260.
63. Gonzales, R. J., Walker, B. R., Kanagy, N. L. 17beta-estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*, 2001. 280: 555–564.
64. Kuo, L., Chilian, W. M., Davis M. J. Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. *Circ. Res*, 1990. 66: 860–866.
65. Mulvany, M. J., Halpern, W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature*, 1976. 260: 617–619.
66. Spiers, A., Padmanabhan, N. A guide to wire myography. *Methods Mol Med*, 2005. 108: 91-104.
67. Griffiths, K., Madhani, M. The Use of Wire Myography to Investigate Vascular Tone and Function. *Methods Mol Biol*, 2022. 2419: 361-376.
68. Bridges, L. E., Williams, C. L., Pointer, M. A., et al. Mesenteric artery contraction and relaxation studies using automated wire myography. *J Vis Exp*, 2011. (55): 3119.
69. Slezák, P., Waczulíková, I., Bališ, P., et al. Accurate normalization factor for wire myography of rat femoral artery. *Physiol Res*, 2010. 59(6): 1033-1036.
70. Púzserová, A., Slezák, P., Balis, P., et al. Stanovenie cievnej reaktivity pomocou drôtkového myografu [Assessment of vascular reactivity by wire myograph]. *Cesk Fysiol*, 2011. 60(2): 52-56.
71. *Multi-Myograph System – 620M*. DMT [online]. Dostupné z: <https://www.dmt.dk/multi-myograph-620m.html>
72. Olson, K. R. *Design and Physiology of arteries and veins. Physiology of Resistance Vessels, Encyclopedia of Fish Physiology*. Academic Press, 2011. s. 1104-1110. ISBN 978-00-809-2323-9.

73. *Continuing Education*. IACUC. UCSF [online]. San Francisco, 2023 [6.4.2023].
Dostupné z: <https://iacuc.ucsf.edu/sites/g/files/tkssra751/f/wysiwyg/STD%20PROCEDURE%20%20Misc%20Rodent%20Procedures%20%20Mouse%20and%20Rat%20Food%20Regulation.pdf>
74. Roberts, C. K., Barnard, R. J., Sindhu, R. K., et al. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol*, 2005. 98(1): 203-210.
75. Kobayasi, R., Akamine, E. H., Davel, A. P., et al. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens*, 2010. 28(10): 2111-2119.
76. Xia, N., Reifenberg, G., Schirra, C., et al. The Involvement of Sirtuin 1 Dysfunction in High-Fat Diet-Induced Vascular Dysfunction in Mice. *Antioxidants (Basel)*, 2022. 11(3): 541.
77. *Searching for Optimal Models for Endothelial Cell 3D Culture*. Lifeline® Cell Technology [online]. Dostupné na: <https://www.lifelinecelltech.com/searching-for-optimal-models-for-endothelial-cell-3d-culture/> [4.2.2023].