

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# Western blot analýza markerů endotelové dysfunkce v myší aortě po podávání vysokotukové diety

IVANA STŘELCOVÁ

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu, cenné rady a pomoc při získávání potřebných informací a podkladů při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost v průběhu 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 13.5.2024

Ivana Střelcová

## OBSAH

1. ABSTRAKT.....	6
2. ABSTRACT .....	7
3. ÚVOD .....	8
4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
5. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
5.1 Kardiovaskulární systém .....	10
5.1.1 Aorta.....	10
5.2 Endotel .....	12
5.2.1 Fyziologické funkce endotelu.....	13
5.3 Endotelová dysfunkce .....	17
5.3.1 Mechanismus vzniku .....	17
5.3.2 Nemoci související s endotelovou dysfunkcí.....	20
5.3.3 Markery ED.....	23
5.4 Vysokotuková dieta.....	29
5.4.1 Mechanismy ED vyvolané působením FFA .....	30
5.4.2 Charakteristika použité diety .....	32
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
6.1 Materiál.....	33
6.1.1 Zvířata.....	33
6.2 Pracovní postup.....	33
6.2.1 Příprava gelu .....	33
6.2.2 Příprava vzorku.....	34
6.2.3 Nanesení vzorků a elektroforéza .....	34
6.2.4 Western blot .....	35
6.2.5 Imunodetekce .....	35
6.2.6 Chemiluminiscenční analýza .....	37
6.3 Vyhodnocení, statistické vyhodnocení .....	37

7. VÝSLEDKY .....	38
8. DISKUSE.....	43
9. ZÁVĚR.....	45
10. POUŽITÉ ZKRATKY .....	46
11. SEZNAM TABULEK.....	49
14. POUŽITÁ LETERATURA .....	50

# 1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Název diplomové práce:** Western blot analýza markerů endotelové dysfunkce v myši aortě po podávání vysokotukové diety

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

**Autor:** Ivana Střelcová

**Cíl práce:** Vysoký příjem tuků v potravě bývá spojen se zvýšeným rizikem rozvoje různých metabolických onemocnění včetně zvýšeného kardiovaskulárního rizika. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda podávání vysokotukové diety s obsahem 42 % kcal tuku má vliv na expresi vybraných markerů endotelové dysfunkce, která představuje klíčový mechanismus v rozvoji kardiovaskulárních komplikací.

**Metody:** V práci byly sledovány změny v expresi endotelové syntázy oxidu dusnatého (eNOS), endoglinu (ENG), endotelinu-1 (ET-1), intercelulární adhezní molekuly 1 (ICAM-1) a vaskulární adhezní molekuly 1 (VCAM-1). Experimentální skupině myších samců kmene C57BL/6J ve věku 7 měsíců byla po dobu 12 týdnů podávána vysokotuková dieta s obsahem 42 % kcal tuku. Kontrolní skupina byla krmena standardní laboratorní dietou. K hodnocení pozorovaných markerů endotelové dysfunkce byla použita Western blot analýza s následnou detekcí za využití chemiluminiscenčního činidla.

**Výsledky:** Výsledky ukazují, že nedošlo k signifikantním změnám v expresi zkoumaných markerů v hrudní části myší aorty. Pouze u eNOS došlo k výraznému zvýšení exprese, což by mohlo být zapříčiněno kompenzační reakcí pro udržení schopnosti vazodilatace.

**Závěry:** Dle výsledků této práce má dlouhodobé podávání vysokotukové diety s obsahem 42 % kcal tuku ze sledovaných markerů vliv na expresi pouze endotelové syntázy oxidu dusnatého.

**Klíčová slova:** endotel, endotelová dysfunkce, vysokotuková dieta, Western blot analýza

## 2. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

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

Supervisor: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Author: Ivana Střelcová

**Background:** High dietary fat intake is associated with increased risk of developing various metabolic diseases, including increased cardiovascular risk. The aim of this thesis was to investigate whether the administration of the high-fat diet containing 42 % kcal of fat affects expression of selected markers of endothelial dysfunction, the key mechanism in development of cardiovascular complications.

**Methods:** In this thesis were evaluated changes in the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), endoglin (ENG), endothelin-1 (ET-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). An experimental group of male C57BL/6J mice aged 7 months was fed the high-fat diet containing 42% kcal of fat for 12 weeks. The control group was fed a standard laboratory diet. Western blot analysis followed by detection using a chemiluminescent reagent was used to evaluate the observed markers of endothelial dysfunction

**Results:** The results show that there were no significant changes in the expression of the examined markers in the thoracic part of the mouse aorta. Only eNOS showed a significant increase in expression, which could be due to compensatory response to maintain the ability to vasodilate.

**Conclusions:** According to the results of the present thesis, long-term feeding with high fat diet containing 42 % kcal of fat has effect only on the expression of endothelial nitric oxide synthase.

**Keywords:** endothelium, endothelial dysfunction, high fat diet, Western blot analysis

### 3. ÚVOD

Endotel je metabolicky aktivní orgán vytvářející vysoce selektivní bariéru a podílející se na zachování cévní homeostázy udržováním rovnováhy mezi vazodilatací a vazokonstrikcí. Tvorbou různých substancí reguluje cévní tonus, zánětlivé reakce, proliferaci hladkých svalových buněk nebo také adhezi cirkulujících krevních buněk. Dlouhodobým působením kardiovaskulárních rizikových faktorů a oxidačního stresu dochází k přetížení obranných mechanismů endotelu vedoucí k funkčnímu poškození endotelu - endotelové dysfunkci (ED). [1]

Endotelová dysfunkce je pozorována nejenom v počátečních stádiích většiny kardiovaskulárních onemocnění, například aterosklerózy, arteriální hypertenze, nebo srdečního selhání, ale může také zásadně ovlivňovat jejich progresi. K endotelovému poškození dochází působením mechanických, fyzikálních, nebo biochemických stimulů. Jejich společným mechanismem je zvýšení oxidačního stresu spojeného s nadměrnou tvorbou oxidových aniontů vedoucích ke snížení dostupnosti vazodilatačního oxidu dusnatého jeho předčasnou degradací, nebo omezením jeho tvorby. [1, 2]

Tato diplomová práce je zaměřena na posouzení změny v expresi markerů endotelové dysfunkce v myši aortě po podání vysokotukové diety (HFD). Volné mastné kyseliny (FFA), hlavní složka této diety, jsou jedním z rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Několika mechanismy, jako je například indukce oxidačního stresu, vedou k poškození endotelu a k rozvoji endotelové dysfunkce během které se uvolňuje několik různých faktorů detekovatelných v krevním oběhu a využívaných jako markery endotelové dysfunkce. Tato práce se věnuje zejména tkáňové expresi endotelové syntázy oxidu dusnatého, intercelulární adhezní molekuly 1, vaskulární adhezní molekuly 1, endoglinu a endotelinu-1 v aortě.[3]



## **4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo hodnocení exprese vybraných markerů endotelové dysfunkce po podávání vysokotukové diety myším. Exprese byla sledována Western blot analýzou ve vzorcích tkáně hrudní části myší aorty. K porovnání sloužila kontrolní skupina myší krměných standardní laboratorní dietou.

## 5. TEORETICKÁ ČÁST

### 5.1 Kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární systém zajišťuje oběh krve v těle, čímž se podílí na procesech látkové výměny plynů, živin a odpadních látek z tkání nebo do tkání. Skládá se z krevního a lymfatického vaskulárního systému. Krevní vaskulární systém je zajištěn srdcem a krevními cévami. [4]

Krevní cévy se dělí na artérie (tepny), kapiláry (vlásečnice) a vény (žíly). Zatímco artérie přivádí okysličenou krev ze srdce ke tkáním, vény vedou odkysličenou krev zpět k srdci. Výměnu látek mezi krví a tkáněmi zajišťují kapiláry tvořící v tkáních vzájemně propojenou síť. [4]

#### 5.1.1 Aorta

Aorta je největší tepna v těle, jejíž funkcí je transport krve bohaté na kyslík a výživné látky z levé srdeční komory do systémového oběhu. [5] Patří k artériím elastického typu zajišťujícím kontinuální tok krve v průběhu srdeční diastoly. Druhá skupina artérií, svalového typu, zajišťuje distribuci krve k jednotlivým orgánům. [4]

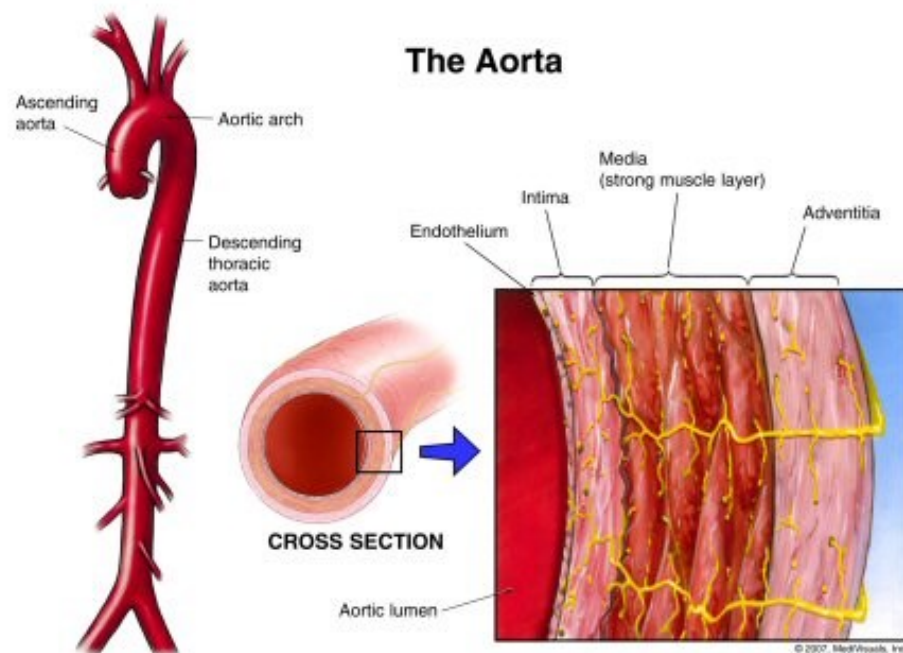
Je rozdělena na vzestupnou aortu (*aorta ascendens*), oblouk aorty (*arcus aortae*) a sestupnou aortu (*aorta descendens*), jak je znázorněno na Obrázku 1. Část sestupné aorty v hrudníku je označovaná jako *aorta thoracica* a pokračuje do dutiny břišní jako *aorta abdominalis*. *Aorta abdominalis* se před obratlem L4 v *bifurcatio aortae* dělí ve dvě *arteriae iliacaes communes*. [6]

Stěna aorty je tvořena ze tří vrstev – *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia*. *Tunica intima* se skládá z vrstvy endotelových buněk vystýlajících vnitřní povrch cév a z vrstvy subendotelové. Tlustou subendotelovou vrstvou tvoří kolagenní vazivo a může obsahovat i jednotlivé hladké svalové buňky. Často do ní pronikají monocyty, které se v případě poškození cévní stěny přeměňují na makrofágy.

*Tunica media* je nejsilnější vrstvou stěny s fenestrovanými elastickými membránami umožňujícími díky vytvořeným otvorům průnik živin do hlubších částí stěny cévy. *Membranae fenestratae* jsou uspořádány koncentricky a jejich množství se zvyšuje s věkem. Zatímco u starších osob jich můžeme nalézt okolo 70, novorozenci obvykle mají kolem 40. S věkem také dochází k ukládání elastinu a ztlustění membrán. Artérie elastického typu obsahují oproti artériím svalového typu větší množství elastických membrán, obvykle 20 až 50. Proto se u nich nerozlišuje *membrana elastica interna* a *externa* oddělující medii od *tunica intima* a *adventitia*. Do elastických vláken se

upínají hladké svalové buňky představující hlavní stavební složku a produkující mezibuněčnou hmotu. Dále se zde nachází vlákna kolagenní a základní vazivová hmota s obsaženými proteoglykany. Při výstupu ze srdce se na stavbě podílí i kardiomyocyty. [4, 7, 8]

*Tunica adventitia* je vnější tenká vrstva longitudinálně uspořádaných elastických a kolagenních vláken. Z dalších elementů se zde vyskytují fibroblasty, adipocyty a ojediněle také hladké svalové buňky. Na výživě cévy se podílí obsažené cévy tzv. *vasa vasorum*. Ty buď vznikají jako větve vyživované artérie, nebo z tepny sousední. *Vasa vasorum* se mohutně větví v adventicii a v zevních oblastech medie. Nalézt zde můžeme také *nervi vasorum* inervující artérie i vény a podílející se na vazokonstrikci a vazodilataci cév. Eferentní nervová vlákna v artériích nepronikají až do *tunica media*. Vazokonstrikční mediátor noradrenalin musí tudíž k průniku k hladkým svalovým buňkám medie difundovat několik mikrometrů. [4, 8]



**Obrázek 1: Aorta**

Obrázek znázorňuje hlavní části aorty a její základní vrstvy.

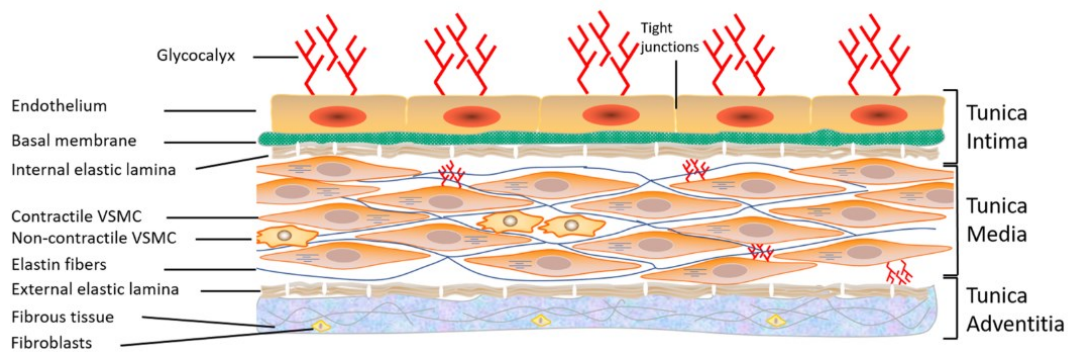
Převzaté z: *About the Aorta* [9]

## 5.2 Endotel

Endotel je svým celkovým povrchem představujícím plochu 500-1000 m<sup>2</sup> největším endokrinním orgánem lidského organismu. [10, 11] Je tvořen jednou vrstvou dlaždicových epitelových buněk zvaných endotelové buňky (EC), které vystylají vnitřní stranu všech cév a kryjí srdeční chlopně. [2, 12]

EC jsou tenké a mírně protáhlé buňky nepravidelného tvaru s délkou okolo 30-50 μm, šířkou 10-30 μm a tloušťkou 0,1-10 μm. Kvůli minimalizaci smykového napětí vyvolaného proudící krví jsou v cévní stěně orientovány podél osy cévy. [13] Jedná se o polarizované buňky. Zatímco na jejich lumenální membránu přímo působí krevní složky a cirkulující buňky, bazolaterální povrch je od okolních tkání oddělen glykoproteinovou bazální membránou. [13] K této bazální membráně jsou ukotveny díky těsným spojmům (tight junction), které navíc zajišťují i jejich vzájemné spojení. [14] Dále jsou přítomny spoje adhezí (adhesion junctions) a mezerové (gap junctions). Důležitou součástí EC je dynamický cytoskelet, který nejenom hraje zásadní roli v obnově EC, ale také přispívá k udržení cévní homeostázy a celistvosti endotelu. [15] Lumenálně jsou EC ohraničeny sítí membránově vázaných proteoglykanů a glykoproteinů zvanou glykokalyx (Obrázek 2), který se podílí na cévní permeabilitě omezením přístupu některých molekul k membráně endotelu. [16]

Výzkum v posledních letech prokázal, že se nejedná pouze o inertní bariéru oddělující krevní buňky od okolní tkáně, ale o metabolicky velmi aktivní orgán s celou řadou fyziologických funkcí. Při funkčním poškození endotelové výstelky dochází k cévním změnám, které mohou vyústit v aterosklerotické cévní komplikace. [10]



**Obrázek 2: Stavba cévní stěny**

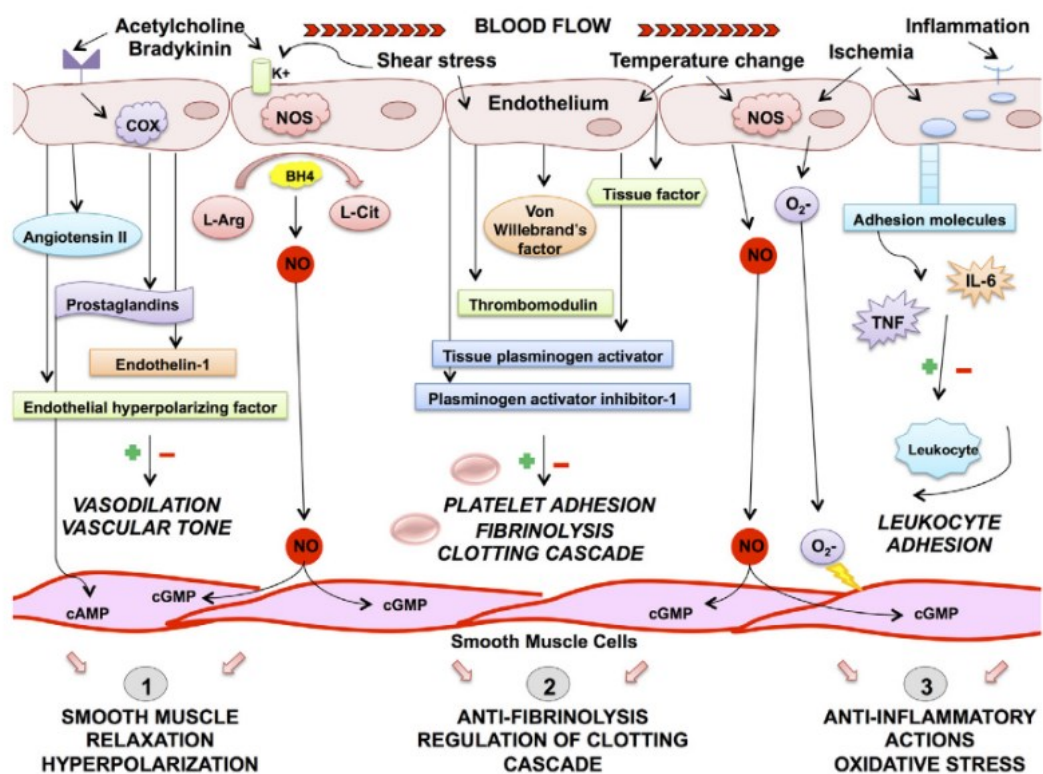
Obrázek znázorňuje základní vrstvy cévní stěny, včetně jejich stavebních součástí.

VSMC – hladké svalové buňky cév

Převzato z: *Morphological and Functional Remodeling of Vascular Endothelium in Cardiovascular Diseases* [15]

## 5.2.1 Fyziologické funkce endotelu

Endotel je zodpovědný za řadu důležitých dějů v organismu, jak je znázorněno na Obrázku 3.



**Obrázek 3: Funkce zdravého endotelu**

Endotel zodpovídá za řadu fyziologických funkcí včetně 1) regulace krevního tlaku produkcí látek s vazodilatačním a vazokonstrikčním účinkem; 2) tvorbou řady faktorů ovlivňujících aktivitu trombocytů, koagulační kaskádu a fibrinolýzu kontroluje tekutost a srážení krve; 3) uvolňováním cytokinů a adhezních molekul reguluje zánětlivé procesy.

cAMP – cyklický adenosin monofosfát; cGMP – cyklický guanosin monofosfát, COX – cyklooxygenáza; BH<sub>4</sub> – tetrahydrobiopterin; IL – interleukin; TNF – tumor nekrotizující faktor; L-arg – L-arginin; L-cit – L-citrulin; NO – oxid dusnatý; NOS – syntáza oxidu dusnatého; O<sub>2</sub><sup>-</sup> – superoxidový anion.

Převzaté z: *Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, and Heart Failure* [17]

### **5.2.1.1 Regulace cévní permeability**

Endotel tvoří polopropustnou bariéru mezi krví a okolními tkáněmi, čímž kontroluje prostup pro buněčné i nebuněčné krevní složky. [11, 14] Zatímco molekuly menší než 40 kDa samovolně pronikají do okolní tkáně, molekuly s větší hmotností potřebují aktivní narušení cévní bariéry. [18]

Bariérová funkce endotelu je zajišťována mezibuněčnými spoji, mezibuněčnou hmotou a glykokalyxem chránícím EC před spontánním přilnutím leukocytů a krevních destiček. Makromolekuly a červené krvinky jsou negativním nábojem glykokalyxu odpuzovány. [19]

Prostup přes endotel je realizován prostřednictvím paracelulárních a transcelulárních transportních mechanismů. Zatímco tekutiny a malé rozpuštěné látky pasivně pronikají mezibuněčným prostorem paracelulární cestou, makromolekuly navíc využívají i transcelulární cestu. Přes endotelovou vrstvu mohou být tedy i aktivně transportovány. Přestup leukocytů zajišťují vazoadhezní molekuly exprimované na povrchu endotelu. Příkladem je E-selektin, intercelulární adhezní molekula-1, vaskulární adhezní molekula 1 nebo adhezní molekula krevních destiček (PECAM-1). [11, 14]

Cévní propustnost může být ovlivněna řadou faktorů. Nepřímo je regulována krevním tlakem a výsledným průtokem krve. V důsledku vazodilatace se se zvyšujícím průtokem krve zvyšuje i permeabilita. Přímý vliv mají molekuly způsobující rozpad bariéry, jako například růstové faktory a zánětlivé cytokiny. Propustnost je dále zvýšena hypoxií, reaktivními formami kyslíku (ROS), histaminem, serotoninem, bradykininem, trombinem, substancí P nebo faktorem aktivujícím destičky (PAF). Většina těchto mediátorů je uvolňována během akutních a chronických zánětlivých stavů. [14, 18]

Poškozením funkce endotelové bariéry dochází k nadměrné extravazaci tekutin a makromolekul, což může vést ke vzniku edému a k hypotenzi. Následným zhoršením průtoku krve a nedostatečným zásobením tkání kyslíkem může dojít až k orgánové dysfunkci. [14, 19]

### **5.2.1.2 Regulace cévního tonu**

Endotel produkuje celou řadu vazodilatačních a vazokonstrikčních látek, čímž kontroluje optimální průtok krve cévou. Vazodilatace je zprostředkovávána hlavně oxidem dusnatým (NO), prostacyklinem (PGI<sub>2</sub>) a hyperpolarizujícím faktorem odvozeným od endotelu (EDHF). Oproti tomu endotelin-1, tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) a angiotenzin II (AT-II) působí vazokonstrikčně. [10, 11]

Nejdůležitější vazodilatační látkou produkovanou endotelem je oxid dusnatý, který vzniká z kyslíku a aminokyseliny L-argininu pomocí enzymu syntázy oxidu

dusnatého (NOS). [11, 20] Ta se vyskytuje ve 3 izoformách, přičemž pro regulaci cévního tonu je zásadní forma endotelová. [21] eNOS může být aktivovaná smykovým napětím krevního proudu (shear-stress), hypoxií nebo působením substancí jako je acetylcholin, bradykinin, vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), histamin nebo serotonin. [11, 21] Vzniklý NO prostupuje přes membrány EC do buněk hladké svaloviny cév, kde aktivuje guanylátcyklázu (GC). Aktivací GC následně vzniká cyklický 3',5'-guanosenmonofosfát (cGMP), jejímž působením dojde ke snížení cytoplazmatické koncentrace  $Ca^{2+}$  a k relaxaci hladkého svalstva cév. [3, 22] NO také ovlivňuje kontraktilitu myokardu, inhibuje adhezi leukocytů, zamezuje proliferaci a má antitrombogenní účinky. [23]

Další vazodilatační látkou uvolňovanou EC je prostacyklin.  $PGI_2$  je syntetizován z kyseliny arachidonové působením cyklooxygenázy (COX) a vazbou na PG receptor zvyšuje tvorbu cyklického 3',5'-adenosin monofosfátu (cAMP). Tím dojde k aktivaci  $K^+$  kanálů hladkého svalstva cév a k vazodilataci. V trombocytech díky svému antiagregačnímu účinku má vliv na jejich patologicky zvýšenou aktivitu.  $PGI_2$  také inhibuje uvolnění látek s vazokonstrikčním účinkem, hlavně ET-1, a přímou stimulací zvyšuje aktivitu eNOS. [2, 21, 23]

Jako EDHF jsou souhrnně nazvány další vazodilatační látky produkované endotelem, které způsobují elektrickou hyperpolarizaci a následně snížení tonu hladké svaloviny stěny cévy. [21]

Pro zachování rovnováhy jsou EC produkovány i látky se silným vazokonstrikčním účinkem. Do téhle skupiny patří především ET-1. Další látkou s výrazným vazokonstrikčním účinkem je angiotenzin II, který vzniká přeměnou angiotenzinu I působením enzymu konvertujícího angiotenzin (ACE). Působením AT-II se aktivují angiotenzinové receptory stimulující tvorbu ET-1 a dalších mediátorů, například inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI-1). Antagonisticky vůči NO působí také  $TXA_2$  a  $PGH_2$  aktivující tromboxanové receptory trombocytů a hladké svaloviny cév. [2, 21]

### **5.2.1.3 Řízení hemostázy**

Endotel se významně podílí na zajištění hemostatické rovnováhy a tekutosti krve. Endotelový povrch je za fyziologických podmínek antikoagulační a netrombogenní. Svým nesmáčivým povrchem EC zabraňují styku trombocytů se subendotelovou vrstvou, jejich shlukování a vzniku trombu. Poškozením cév, nebo působením cytokinů či prozánětlivých podnětů, je však rovnováha posunuta ve prospěch prokoagulačních dějů. [4, 20, 24]

EC je produkována řada substancí ovlivňujících krevní srážení a funkci krevních destiček. Příkladem je Von Willebrandův faktor (vWF) uvolňovaný z Weibel-Paladeho granul EC při cévním poškození. vWF vazbou stabilizuje koagulační faktor VIII a aktivuje adhezi trombocytů na subendotelově umístěná kolagenová vlákna. Adheze a aktivace trombocytů je podporována PAF, který je také syntetizován EC. [11, 14, 20]

Endotel vazbou antitrombinu III inaktivujícího trombin zasahuje i do sekundární hemostázy. Produkuje trombodulin, který s trombinem tvoří komplex trombodulin-trombin s omezenou schopností štěpit fibrinogen na nerozpustný fibrin. Tento komplex navíc aktivuje protein C, který v komplexu s proteinem S inhibuje koagulaci inaktivací faktorů Va a VIIa. Molekula fibrinu je dále štěpena plazminem, který vzniká z cirkulujícího plazminogenu působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA). Celý proces může být blokován PAI-1, který je stejně jako tPA tvořen a uvolňován EC. Endotel tedy zasahuje i do procesu fibrinolýzy. [11]

### **5.2.1.4 Angiogeneze**

Endotel se také podílí na tvorbě cév při poranění tkáně nebo hypoxii. Za zahájení angiogeneze je zodpovědný především VEGF selektivním působením na EC prostřednictvím vazby na receptor VEGFR-2. EC zahájí tvorbu proteáz, díky kterým proniknou přes bazální membránu. Následně dochází k jejich migraci směrem ke zdroji signálu, množení a diferenciaci. [13, 25]

Na angiogenezi a reparativních procesech v cévní stěně se dále podílí řada endotelových růstových faktorů a cytokinů. Příkladem je transformující růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ), fibroblastový růstový faktor, destičkový růstový faktor (PDGF), interleukin-1 (IL-1) nebo endotelin-1. Naopak významnou látkou s antimitogenním účinkem je NO inhibující proliferaci hladkých svalových buněk a zabraňující hypertrofii stěny cévy. [11]



## 5.3 Endotelová dysfunkce

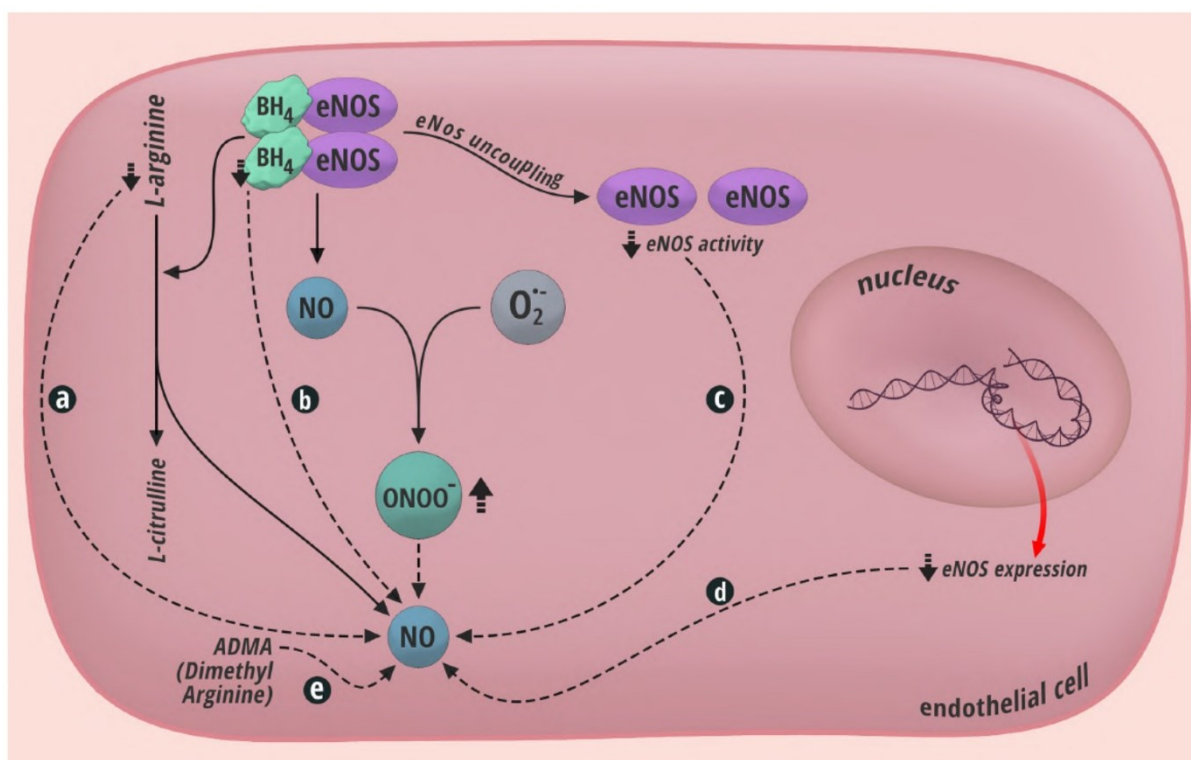
Endotelová dysfunkce je funkční poškození endotelu charakterizované snížením biologické dostupnosti NO vedoucí k vazokonstrikčnímu, proliferačnímu, trombotickému a prozánětlivému stavu. [26] Ten se projevuje zvýšenou expresí molekul buněčné adheze, zvýšenou permeabilitou vedoucí k migraci cévních monocytů a zvýšenou infiltrací leukocytů. [27]

### 5.3.1 Mechanismus vzniku

Jedním z nejčastějších mechanismů vzniku ED je **oxidační stres**, který může být vyvolán hromaděním nebo nadměrnou produkcí reaktivních volných radikálů. Nejvíce jsou zkoumány reaktivní formy kyslíku zahrnující molekuly jako peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), superoxidový anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) a volný hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ). [26] Vznikají v místě zánětu a poranění. Ačkoliv ve fyziologických hladinách přispívají k udržení normální buněčné funkce, včetně růstu a adaptačních reakcí, při nedostatku neutralizujících antioxidantů však mohou poškodit endotel, zvýšit jeho propustnost a narušit rovnováhu NO. Vedou také k programované buněčné smrti nebo k apoptóze. [24, 28]

ROS vznikají nejenom jako vedlejší produkty metabolismu mitochondrií, ale také činností některých enzymů, příkladem je hemooxygenáza 1, xantinoxidáza nebo nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) oxidáza. Tvorbu ROS podporuje řada faktorů včetně hypertenze, diabetu, dyslipidémie, obezity, kouření, akutní mikrobiální infekce nebo expozice kovům a látkám znečišťujících okolí. Důležitým zdrojem jsou také volné mastné kyseliny. Během patologických stavů je potenciálním generátorem ROS i eNOS, která ve zdravém endotelu zodpovídá za většinu tvorby NO. [3, 24, 26, 29]

K ED dochází několika mechanismy jako je například aktivace NADPH oxidázy nebo stimulace exprese ET-1. Jedním z dalších je tvorba cytotoxického oxidantu peroxynitritu ( $ONOO^-$ ) přímou interakcí s NO. Peroxynitrit nitrací proteinů ovlivňuje jejich funkci a může vést k poškození buněk i endotelu. Také způsobuje degradaci tetrahydrobiopterinu ( $BH_4$ ), což vede k rozpojení eNOS a omezení tvorby NO. Rozpojením eNOS se aktivní dimerní forma štěpí na monomery a dochází k přenosu elektronu z NADPH na molekulární kyslík místo na NO. Vzniklý  $O_2^{\cdot-}$  může dále interagovat s NO a přeměňovat ho na  $ONOO^-$ . K rozpojení eNOS dochází také snížením hladiny L-argininu působením arginázy. Mezi další mechanismy ovlivňující syntézu NO patří nedostatečná exprese eNOS, nadbytek endogenního inhibitoru eNOS dimethylargininu, nebo post-translační modifikace eNOS glutathionylace. [26, 28, 29] Hlavní mechanismy vedoucí k ED snížením hladiny NO jsou popsány na Obrázku 4.



**Obrázek 4: Hlavní mechanismy přispívající k endotelové dysfunkci snížením biologické dostupnosti NO.**

Šipkami jsou označeny cesty vedoucí ke snížení hladin NO. (a) a (b) snížení substrátu (L-arginin) a kofaktoru ( $BH_4$ ) eNOS; (c) inaktivace NO tvorbou  $ONOO^-$  z  $O_2^{\bullet-}$  a NO. (c) nedostatečná eNOS aktivita vedoucí k omezení tvorby NO, například eNOS rozpojením. (d) snížení exprese eNOS. (e) nadbytek endogenního inhibitoru eNOS dimethylargininu.

NO – oxid dusnatý;  $ONOO^-$  – peroxynitrit; eNOS – endoteliální syntáza oxidu dusnatého;  $BH_4$  – tetrahydrobiopterin; ADMA – dimethylarginin

Převzato z: *Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases* [26]

Dalším mechanismem vzniku ED je **záněť**, který jak se zdá souvisí s oxidačním stresem. Za fyziologických podmínek jsou zánětlivé procesy cévní stěny regulovány uvolňovaným NO. Při poškozené funkci endotelu však dochází k podpoření tvorby ROS zánětlivými buňkami a ke zhoršení cévního zánětu oxidačním stresem. [1]

Prozánětlivá odpověď je úzce spjata s aktivací signální dráhy nukleárního faktoru (NF- $\kappa$ B) a se zvýšenou expresí prozánětlivých látek. Příkladem je tumor

nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) a IL-1 podporující adherenci a migraci leukocytů. Těmito zánětlivými cytokiny navíc dochází k indukci EC a leukocytů a k expresi adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1), monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1), E-selektinu, P-selektinu a interleukinu-6 (IL-6), čímž se zhoršuje ED. [1, 26, 30]

Dalším zánětlivým markerem spojeným s dysfunkcí endotelu je C-reaktivní protein (CRP). CRP je zánětlivý protein akutní fáze, který se na časně fázi aterosklerózy podílí svým ukládáním do intimy cév. Mimo jiné má vliv i na biologickou dostupnost NO, čímž vyvolává oxidační stres, dysfunkci endotelu a hyperplazii intimy cév. [1]

ED může být také **infekčního původu**, jejíž mechanismem je aktivace imunitního systému a následné imunopatologické poškození endotelu. K chronickým zánětlivým procesům infekční agens přispívají přímým nebo nepřímým působením. Zatímco přímý účinek zahrnuje schopnost organismů infikovat buňky cév, nepřímý vliv je vyvolán v důsledku zvýšení cytokinů a dalších proteinů akutní fáze. Příkladem bakteriálních patogenů je *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* nebo *Porphyromonas gingivalis*. Z virů pak můžeme zmínit cytomegalovirus, herpes simplex virus, nebo například virus hepatitidy C. [10, 31]

### 5.3.2 Nemoci související s endotelovou dysfunkcí

ED může vést ke vzniku různých nemocí, podílí se například v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, sepse, renálního selhání, komplikací diabetu mellitu a dalších. [11]

#### 5.3.2.1 Ateroskleróza

ED má souvislost s většinou rizikových faktorů aterosklerózy (Tabulka 1). Ovlivněním endotelu dochází ke zvýšení propustnosti cévní stěny a produkci prozánětlivých a prokoagulačních faktorů, jako je například VCAM-1, MCP-1, vWF, či tkáňový faktor. Fenotyp endotelu se tedy mění na prozánětlivý a protrombogenní. [10, 24, 32]

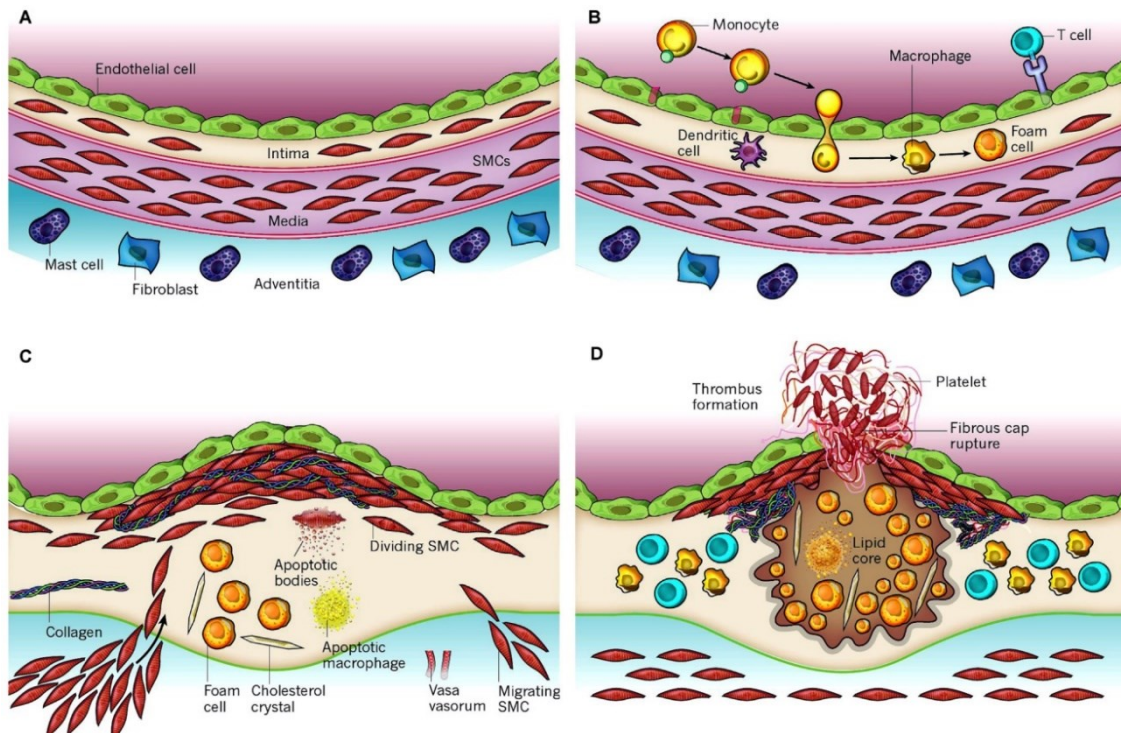
**Tabulka 1: Rizikové faktory endotelové dysfunkce a aterosklerózy**

Neovlivnitelné	Ovlivnitelné
Věk	Kouření
Mužské pohlaví	Dyslipidémie
Rodinná anamnéza	Hypertenze
Genetické faktory	Metabolický syndrom
Osobní anamnéza	Diabetes mellitus 2. typu
	Obezita
	Psychosociální faktory
	Nízká fyzická aktivita

*Převzato z: Predikce a prevence aterosklerózy a personalizovaná léčba dyslipidemií [33]*

V důsledku poškození endotelu dochází k vyššímu průniku aterogenních lipidů, k jejich hromadění v intimě artérií a následné oxidaci závislé z velké části na ROS. Oxidovaný LDL zabraňuje uvolňování EDHF i NO a snižuje expresi nebo funkci eNOS. Také vyvolá v EC produkci adhezních molekul přitahujících zánětlivé leukocyty, především monocyty a T-lymfocyty, do subendotelového prostoru a jejich pevnější zachycení k endotelu. V intimně cévy se následně monocyty aktivují na makrofágy. Zánětlivými mediátory vznikají na povrchu makrofágů scavengerové receptory vychytávající lipoproteinové částice. Makrofág ukládá lipidy především ve formě esterů cholesterolu a mění se v pěnové buňky, což je základní stavební jednotka tzv. tukových proužků. Makrofágy se následně dále replikují a proliferyují. Dochází k produkci většího množství cytokinů a růstových faktorů podněcujících T-lymfocyty k tvorbě dalších prozánětlivých

cytokinů a podporujících migraci a proliferaci hladkých svalových buněk (SMC). SMC reagují na poškození cévní stěny migrací z medie do subintimálního prostoru, kde toto poškození opravují. Také jsou schopné vázat cholesterol za přeměny na pěnové buňky. Proliferující SMC vytváří fibrózní čepičku oddělující nekrotické jádro od proudící krve. Při ruptuře čepičky dochází k uvolnění trombogenních lipidových částic do extracelulárních prostor. [10, 24, 26, 32, 34] Jednotlivá stádia aterosklerotické léze znázorňuje Obrázek 5.



**Obrázek 5: Vývojová stádia aterosklerotické léze**

A) Artérie je tvořena vrstvou intima, media s SMC a elastinem a adventitia obsahující pojivovou tkáň a jiné buňky.

B) Aktivací endotelu se monocyty dostávají z krve do intimy, kde se diferencují na makrofágy, a později se mění na pěnové buňky.

C) SMC putují z medie do intimy a společně s hladkosvalovými buňkami intimy produkují složky mezibuněčné hmoty vytvářející fibrózní čepičku pokrývající lipidy a nekrotické jádro.

D) Trombóza je komplikace, při které narušením čepičky dochází k odhalení vysoce trombogenního lipidového jádra.

SMC – hladké svalové buňky

Převzato z: *Atherosclerosis: Comparative pathogenesis, lipoprotein metabolism, and avian and exotic companion mammal models* [32]

ED doprovází jak časnou, tak pozdní fázi aterosklerózy. Podílí se na vývoji a nestabilitě aterosklerotického plátu, čímž v důsledku neúčinných antiagregačních, antitrombotických a fibrinolytických mechanismů zhoršuje následky jeho ruptury. [11, 24]

### **5.3.2.2 Srdeční selhání**

ED se podílí na patogenezi a systémové vazokonstrikci u pokročilého srdečního selhání. Selhávající srdce lze popsat změněným redoxním stavem a nadměrnou tvorbou ROS vedoucích ke snížení hladiny NO. Důsledkem nedostatku NO je u pacientů se srdečním selháním ovlivněna migrace buněk, stabilita aterosklerotického plátu a srdeční hypertrofie. Snížená hladina NO má vliv na progenitorové buňky, čímž je znemožněna reparace a regenerace endotelu. [17, 35]

Převládající vazokonstrikcí se zvyšuje tuhost cév v systémovém a plicním oběhu, tím je na komory vyvíjena větší systolická zátěž vedoucí ke zhoršení jejich funkce. Dochází k remodelaci levé komory, poškození srdeční žilní drenáže u koronárních cév a ke snížení prahu pro arytmie. Výsledkem je snížení srdečního výdeje s negativním vlivem na perfúzi a funkci ledvin, což může vést k další retenci tekutin. [17, 35]

### **5.3.2.3 Hypertenze**

Endotelová dysfunkce souvisí s rozvojem a komplikacemi hypertenze. Pro esenciální hypertenzi jsou typické funkční a strukturální změny rezistenčních tepen vedoucí ke zvýšené periferní cévní rezistenci, ke které ED přispívá několika mechanismy. Aktivací renin-angiotenzinového systému (RAS), ET-1, katecholaminů a tvorbou růstových faktorů dochází k vazokonstrikci, cévním změnám a následnému zvýšení periferního krevního tlaku.[36]

S ED může být spojena i indukce zánětlivých procesů v cévní stěně vedoucí k zvýšenému riziku aterosklerózy a rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Cévní zánět může být způsoben oxidačním stresem, který se zásadně podílí v patofyziologii hypertenze. Během oxidačního stresu totiž dochází ke zvýšené tvorbě ROS, které snižují hladiny NO a posilují vazokonstrikci a vaskulární hypertrofii. Při snížené tvorbě NO se také podpoří zadržování vody a sodíku v organismu, tím i nárůst krevního tlaku. [36, 37]

Důležitou roli při vzniku hypertenze a jejích následků má RAS, hlavně jeho klíčový efektor AT-II, který přispívá k endotelové dysfunkci, buněčnému růstu, oxidačnímu stresu, vazokonstrikci a zánětu. Také způsobuje hypertrofii hladkých svalových buněk cév a podílí se na ruptuře aterosklerotického plátu. [36]

### 5.3.3 Markery ED

Poškozením endotelu se může uvolnit několik různých faktorů, které jsou detekovatelné v krevním oběhu a mohou být využity jako markery endotelové dysfunkce. [38]

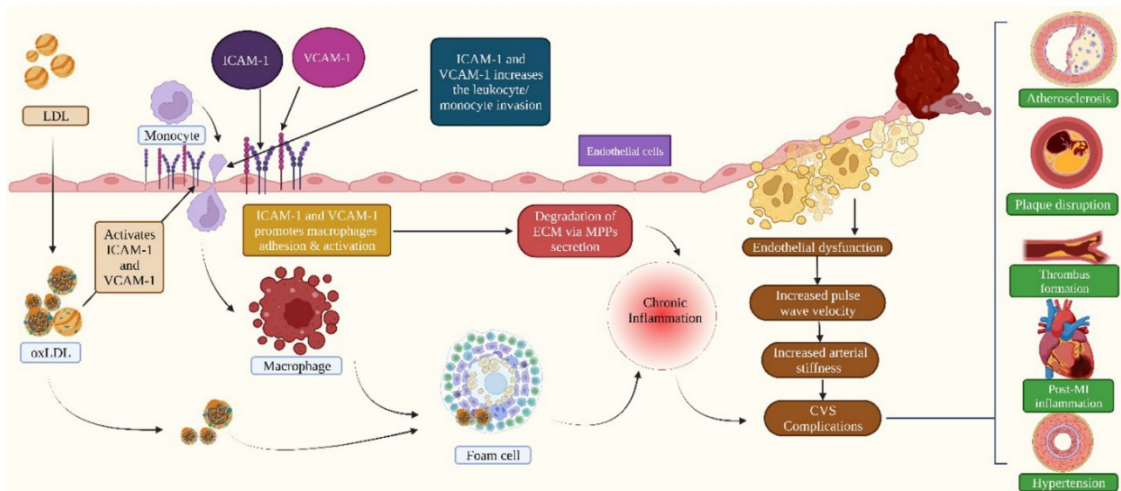
#### 5.3.3.1 Intercelulární adhezní molekula 1 a vaskulární adhezní molekula 1

ICAM-1 a VCAM-1 jsou adhezní molekuly podobné imunoglobulinům exprimované na povrchu endotelových buněk, které vazbou na specifické ligandy zprostředkovávají adhezi leukocytů k endotelu a regulují jejich pohyb do tkání, kde probíhá zánět nebo imunologická odpověď. Z velké části se také podílejí na regulaci homeostázy a některých patologických stavů jako je například ateroskleróza, infarkt myokardu, obezita a mnoho dalších. [39]

ICAM-1 je transmembránový protein složený z krátké cytoplazmatické domény, transmembránové domény a pěti extracelulárních imunoglobulinových domén, jejichž glykosylací je zprostředkována interakce s ligandy. Post-transkripčním sestřihem vzniká 6 membránově vázaných izoform a rozpustný protein (sICAM-1) lišící se specifičností vazby na ligandy a funkcí v různých patologických stavech. V nízkých hladinách je ICAM-1 exprimován endotelovými, epitelovými buňkami a buňkami imunitního systému. K výraznému zvýšení jeho množství dochází působením zánětlivých cytokinů, jako je například IL-1 a TNF- $\alpha$ . [22, 40] ICAM-1 hraje zásadní roli v zánětu a obranném systému zprostředkovaném T-buňkami. Podílí se na vrozené i adaptivní imunitní odpovědi, jak interakcí mezi T-lymfocyty a buňkami prezentujícími antigen, tak podporou adheze leukocytů a usnadněním migrace leukocytů přes endotel do míst zánětu. Ukázalo se, že ovlivňuje propustnost EC jak ve zdravé, tak zanícené tkáni. Usnadněním fagocytózy se podílí i na reparaci postižených tkání. [39, 40]

VCAM-1 je transmembránový glykoprotein, jehož expresi EC vyvolává především působení prozánětlivých cytokinů, jako je TNF- $\alpha$ , zvýšené množství ROS nebo smykové napětí krevního proudu. Bylo zjištěno, že VCAM-1 může být exprimována i makrofágy, astrocyty, myoblasty, dendritickými buňkami, buňkami kostní dřeně, Kupfferovými a Sertoliho buňkami. Zatímco lidská VCAM-1 existuje ve 2 izoformách, z nichž jedna má 7 domén podobných imunoglobulinu a druhá 6 domén podobných imunoglobulinu, u myši je jediná obsahující pouze 3 domény podobné imunoglobulinu. Pro interakci s integrinem leukocytu je důležitý homologní intracelulární C-konec. Následným zachycením, svinutím a aktivováním intracelulární signalizace dochází k remodelaci aktinu a narušení spojů mezi endotelovými buňkami. Tím je usnadněn pohyb leukocytů z cirkulace do míst poranění. Působením metaloproteáz dochází k proteolytickému

štěpení a vytvoření rozpustné formy (sVCAM-1) předpovídající výskyt a vývoj kardiovaskulárních onemocnění. VCAM-1 i sVCAM-1 jsou brány jako prediktory kardiovaskulární morbidity a mortality. Exprese VCAM-1 je pozorována například u pacientů s hypertenzí, aterosklerózou nebo ischemickou chorobou srdeční. [39, 41] Roli ICAM-1 a VCAM-1 v patologii kardiovaskulárních onemocnění popisuje Obrázek 6.



**Obrázek 6: ICAM-1 a VCAM-1 v patologii kardiovaskulárních onemocnění.**

ICAM-1 – intercelulární adhezivní molekula; VCAM-1 – vaskulární adhezivní molekula;  
 LDL – lipoprotein o nízké hustotě; oxLDL – oxidovaný lipoprotein s nízkou hustotou;  
 CVS – kardiovaskulární systém; ECM – mezibuněčná hmota; MMPs – matrixové metaloproteinázy

Převzato z: *ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders* [39]

### 5.3.3.2 Endoglin

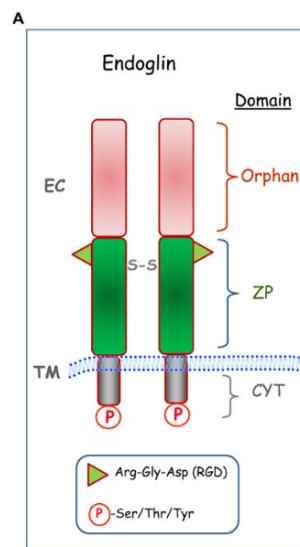
Endoglin je membránový homodimerický glykoprotein, jehož monomery jsou stabilizovány intermolekulárními disulfidickými můstky. Skládá se z extracelulární, transmembránové a krátké cytoplazmatické domény (Obrázek 7). Extracelulární část dále zahrnuje doménu juxtamembránové zona pellucida (ZP) podílející se na vazbě integrinů a orphan doménu interagující s ligandy nadrodiny TGF- $\beta$ . [42–44] Působením matricových metaloproteináz je extracelulární doména proteolyticky štěpena za vzniku cirkulujícího solubilního endoglinu. [45]



Dle cytoplazmatického konce se rozlišují dvě izoformy – dlouhý (L) a krátký (S) endoglin. S-endoglin se zkráceným C-koncem postrádá fosforylační a interakční místa, čímž se od L-endoglinu odlišuje i funkčně. Zatímco převládající izoforma L-endoglin podporuje proliferaci EC, S-endoglin působí antagonisticky. [43, 46, 47]

Ačkoliv je endoglin exprimován převážně aktivovanými EC, nalezen byl také na povrchu endotelových progenitorových buněk, syncytiotrofoblastech a v nízkých hladinách v T-lymfocytech, makrofázích, buňkách hladkého svalstva, epitelových buňkách, fibroblastech a v hematopoetických kmenových buňkách. Jeho tvorbu ovlivňuje TGF- $\beta$ , kostní morfogenetický protein-9 a hypoxie. [42, 47]

V poslední letech se ukázalo, že endoglin nepůsobí pouze jako ko-receptor pro TGF- $\beta$ , ale ovlivňuje řadu funkcí. Umístěním v membránách caveol je ovlivňována stabilita a interakce eNOS. Úlohu sehrává při udržování propustnosti cévy a při reorganizaci cytoskeletu. Vlivem na proliferaci a migraci EC přispívá k angiogenezi a podílí se na průběhu adheze během zánětlivých stavů a primární hemostázy. Při zánětlivé reakci prostřednictvím vazby s integrinem na povrchu leukocytů ovlivňuje jejich adhezi a vstup přes endotel. Membránově vázaným endoglinem je také stabilizována agregace trombocytů a následně i trombu. [42, 43, 47] Solubilní endoglin však působí antagonisticky. Narušuje remodelaci cévní stěny, angiogenezi i tvorbu a stabilitu trombu. Ve zvýšených hladinách se nachází například u pacientů s hypertenzí, aterosklerózou, diabetem mellitem, nebo hypercholesterolémií. [42, 45, 47]



**Obrázek 7: Strukturální znázornění endoglinu**

Arg- arginin; Asp – aspartát; CYT – cytoplazmatická doména; EC – extracelulární doména; GLY – glycin; Ser- serin; Thr – threonin; TM – transmembránová doména; Tyr – tyrosin; ZP – zona pellucida;

Převzato z: *Endoglin involvement 1 in integrin-mediated cell adhesion as a putative pathogenic mechanism in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia type 1 (HHT1)* [44]

### **5.3.3.3 Endotelin-1**

Endotelin-1 je vazoaktivní peptid uvolňovaný zejména EC, také ale buňkami hladkého svalstva cév, makrofágy, leukocyty nebo kardiomyocyty. V organismu se vyskytuje ještě ve 2 dalších izoformách – endotelin-2 (ET-2) a endotelin-3 (ET-3). Jeho syntéza probíhá ve dvou proteolytických krocích. Nejdříve z pre-pro-endotelinu vzniká neaktivní prekurzor, který je působením endotelin konvertujících enzymů přeměněn na biologicky aktivní ET-1. Zánětlivé faktory, jako například interleukiny, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , inzulin nebo AT-II podporují jeho produkci. Naopak NO, PGI<sub>2</sub>, hypoxie nebo smykové napětí krevního proudu jeho uvolňování inhibují. [48–50]

ET-1 se váže na dva endotelinové receptory spojené s G proteiny. Receptor pro endotelin A (ET<sub>A</sub>) na hladkých svalových buňkách cév má vysokou afinitu k ET-1 a ET-2, nikoliv k ET-3. Oproti tomu receptor pro endotelin B (ET<sub>B</sub>) se nachází i na endotelových buňkách a má podobnou afinitu ke všem izoformám. Vazbou na ET<sub>A</sub> a ET<sub>B</sub> v hladkých svalových buňkách cév dochází ke stimulaci fosfolipázy C, čímž se následně iniciují děje vedoucí ke zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, fosforylaci myosinkinazy a ke kontrakci hladkých svalových buněk. ET<sub>B</sub> má duální účinek, jeho aktivací v EC se uvolní NO a PGI<sub>2</sub> způsobující vazodilataci. [51–53]

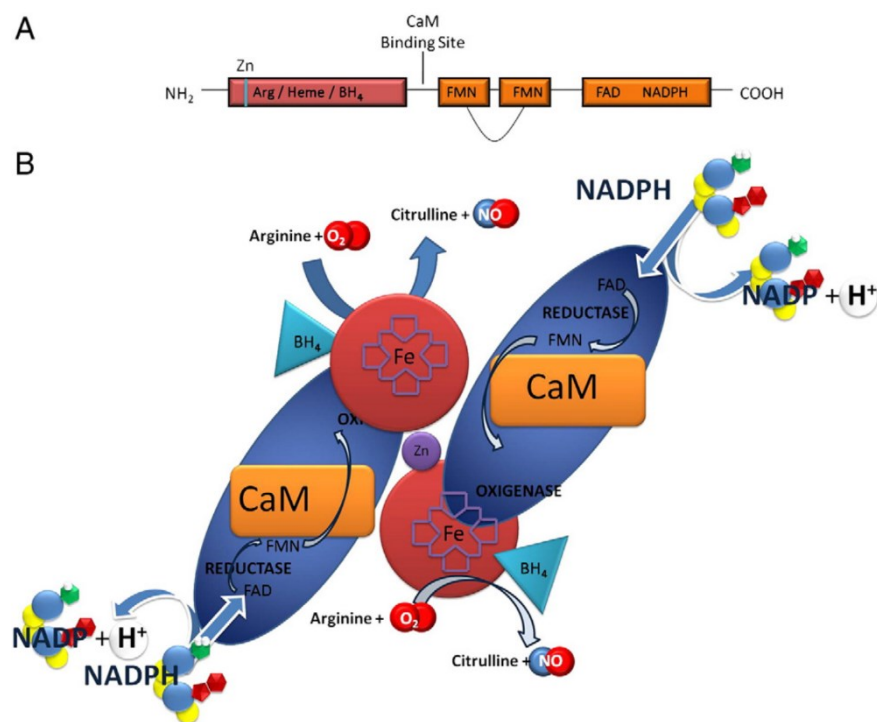
ET-1 má důležitou roli v regulaci krevního tlaku a napětí cévní stěny. Zvýšením permeability cév a uvolněním cytokinů a mediátorů zánětu, jako je například IL-6, TNF- $\alpha$  nebo NF- $\kappa$ B, podporuje chemotaxi a zánětlivou odpověď v cévní stěně. Také posiluje agregaci krevních destiček, tvorbu adhezních buněčných molekul a růst a proliferaci fibroblastů a hladkých svalových buněk cév. Zvýšené hladiny ET-1 se podílí na několika kardiovaskulárních onemocněních, jako je například ateroskleróza nebo hypertenze. [51, 53]

### **5.3.3.4 Endotelová syntáza oxidu dusnatého**

Endotelová syntáza oxidu dusnatého je zásadní isoformou NOS zodpovědnou za tvorbu vazodilatačního NO. Exprese eNOS byla popsána nejenom v EC, ale také v trombocytech, kardiomyocytech nebo neuronech. Druhou formou je neuronální syntáza NO (nNOS) tvořena v nervové tkáni a kosterním svalstvu. Působením nNOS vzniká NO s funkcí neurotransmiteru. Inducibilní NO syntáza (iNOS) se nachází v buňkách imunitního systému a produkuje NO přispívající k obrannému mechanismu vyvoláním apoptózy. Zatímco tvorba eNOS a nNOS je konstitutivní, exprese iNOS je závislá na vyvolávajícím podnětu, jako jsou například prozánětlivé cytokiny. [54–57]

Aktivní formou eNOS je homodimer, jehož monomery se skládají z N-koncové oxygenazové domény a C-koncové reduktázové domény. Vzájemné spojení zajišťuje

centrální kalmodulin. Zatímco N-konec obsahuje vazebná místa pro hem, zinek, BH<sub>4</sub> a L-arginin, na C-koncovou doménu se váže NADPH, flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninukleotid (FAD). Při tvorbě NO z L-argininu a kyslíku dochází nejdříve k přenosu elektronu z NADPH vázaného C-koncem jednoho monomeru přes FAD a FMN na hem N-konce druhého monomeru. K přenosu elektronu mezi doménami napomáhá kalmodulin. Prostřednictvím vazby na hem se molekulární kyslík redukuje a včleňuje do L-argininu, čímž vzniká NO a L-citrulin. Donorem elektronu umožňující oxidaci L-argininu je BH<sub>4</sub>, kofaktor důležitý pro ideální aktivitu eNOS. [29, 55, 58] Molekulární strukturu eNOS znázorňuje Obrázek 8.



**Obrázek 8: Molekulární struktura eNOS**

(A) Sekundární struktura monomeru eNOS. (B) Detail dimeru eNOS.

Arginine – arginin, Citrulline – citrulin, NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, BH<sub>4</sub> – tetrahydrobiopterin, NO – oxid dusnatý, Fe – železo, Zn – zinek, CaM – kalmodulin, FAD – flavinadeninukleotid, FMN – flavinmononukleotid, oxygenase – oxygenázová doména, reductase – reduktázová doména, H<sup>+</sup> – proton vodíku

Převzato z: *Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders* [59]

eNOS je soustředěna převážně do kaveol, což jsou vchlípeniny plazmatické membrány. Zde je její aktivita inhibována kaveolinem-1. Tento protein interakcí s vazebnými místy kalmodulinu zabraňuje přenosu elektronů z NADPH reduktázové domény na molekulu hemooxygenázy. Vápníkem se tato vazba naruší a samotná eNOS je přenesena do cytoplazmy. Tím se výrazně zvýší její enzymatická funkce vedoucí k tvorbě NO. Aktivita eNOS tedy závisí na koncentraci intracelulárního vápníku, která může být zvyšována například acetylcholinem nebo bradykininem. Dále je ovlivňována dostupností substrátu a kofaktorů, smykovým napětím krevního proudu nebo působením růstových faktorů a některých hormonů. Na posttranslační úrovni má na funkci, aktivaci a spojení eNOS vliv zejména fosforylace. K té může docházet na kalmodulinu, kaveolinu i na zbytcích aminokyselin na samotné eNOS, nejčastěji serinových (Ser), threoninových (Thr) a tyrosinových (Tyr). Příkladem je Ser1147, jehož fosforylací se aktivita eNOS zvyšuje. Oproti tomu fosforylace Thr945 inhibuje eNOS zabráněním spojení mezi kalmodulinem a eNOS. [29, 57, 59, 60]

Funkcí NO tvořeného eNOS je nejenom regulace krevního tlaku, ale také inhibice shlukování trombocytů, adheze leukocytů a proliferace hladkých svalových buněk. Oxidačním stresem dochází k rozpojení eNOS a k následné tvorbě volných radikálů místo NO. Snížené hladiny NO rozpojením eNOS vedou k endotelové dysfunkci pozorované například u pacientů s hypertenzi, diabetem, ischemickou chorobou srdeční nebo srdečním selháním. [29, 59, 61]

## 5.4 Vysokotuková dieta

Na základě studií bylo zjištěno, že prostřednictvím několika mechanismů může konzumace vysokotukové diety vést k dysfunkci endotelu. Důležitou roli hrají volné mastné kyseliny, tedy hlavní složka HFD. Příčinami ED vyvolané FFA je zejména inzulinová rezistence, oxidační stres a zánět. [3]

Volné mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhými alifatickými řetězci s methylovou skupinou na jednom konci a karboxylovou skupinou na druhém. FFA jsou nejen základním zdrojem energie, ale také signálními molekulami ovlivňujícími v závislosti na délce uhlíkového řetězce různé buněčné procesy a fyziologické funkce. [3, 62]

Dle přítomných dvojných vazeb je můžeme rozdělit na nasycené mastné kyseliny (SFA) bez dvojných vazeb, mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) obsahující pouze jednu dvojnou vazbu a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), které mají nejméně dvě dvojně vazby. Zatímco SFA se získávají především z živočišných a mléčných výrobků, kokosového a palmového oleje, nenasycené mastné kyseliny (UFA) pocházejí z olivového oleje, ořechů a některých tučných ryb. [3]

V závislosti na délce aminokyselinového řetězce se rozlišují mastné kyseliny s krátkým (SCFA), středním (MCFA) a dlouhým (LCFA) řetězcem. SCFA neobsahují více než šest uhlíků a jejich zdroje v potravě jsou omezené, většina totiž vzniká jako bioprodukty fermentace vlákniny v tlustém střevě. MCFA s délkou řetězce 6-12 uhlíků můžeme najít v palmojádrovém oleji, kokosovém oleji a v mléčných výrobcích. LCFA obsahují větší než 12 uhlíků, které mohou být buď nasycené, nebo mohou obsahovat 1 nebo více dvojných vazeb. Mezi hlavní potravinové zdroje patří mléčné výrobky, hovězí maso, palmový olej a sádlo. Nejčastějšími nasycenými LCFA ve stravě je kyselina myristová, palmitová a stearová. [3, 63, 64].

Za zvýšené kardiovaskulární riziko jsou zodpovědné hlavně SFA zvýšením hladiny LDL cholesterolu, hlavního rizikového faktoru kardiovaskulárních onemocnění. Oproti tomu UFA mají spíše ochranný účinek. Ukázalo se, že PUFA mají příznivější vliv na lipidový profil a nahradíme-li jimi SFA ve stravě, může se snížit riziko kardiovaskulární mortality. Dle většiny studií vyplývá, že rizikovější jsou nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, SCFA a MFCA mají potenciálně prospěšný nebo neutrální vliv. [3, 63–65]

### 5.4.1 Mechanismy ED vyvolané působením FFA

FFA vyvolávají ED různými mechanismy, které mohou mít přímý nebo nepřímý efekt na produkci NO. [3]

Jedním z mechanismů je **potlačení signální dráhy AMPK/PI3K/Akt/eNOS**.

5' adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkináza (AMPK) je nejenom důležitá v inzulinové signalizaci, ale také zvyšuje oxidaci mastných kyselin. Inzulin je klíčový mediátor vazodilatace zprostředkované NO, která může být potlačena působením FFA dvěma mechanismy. Prvním je snížení fosforylace tyrozinu substrátu 1/2 inzulinového receptoru, druhým inhibice dráhy PI3K/Akt kontrolující inzulinem stimulované vychytávání glukózy a ovlivňující produkci NO v EC. Dle jedné studie se ukázalo, že zvýšená hladina FFA v krevním řečišti zhoršuje endotelově závislou vazodilataci, zatímco endotelově nezávislá vazodilatace zůstává neovlivněna. To nasvědčuje tomu, že FFA mají specifickou inhibiční roli na produkci NO zodpovědného za vazodilataci. [3]

Dalším mechanismem je **narušení produkce a uvolňování NO** prostřednictvím snížení intracelulárního vápníku důležitého pro správnou funkci endotelu. Intracelulární vápník má totiž zásadní roli v aktivaci eNOS potřebné pro syntézu NO. Bylo zjištěno, že v prasečích aortálních buňkách FFA snižuje přísun intracelulárního vápníku, čímž poruší tvorbu/uvolňování NO. Pozdější další studií byly potvrzeny škodlivé účinky FFA na endotelovou vápníkovou signalizaci a následnou aktivitu eNOS vedoucí ke snížené produkci NO. [3, 66]

FFA mohou zprostředkovávat **oxidativní stres** v endotelu, což může vést k ovlivnění inzulinové signalizace a produkce NO. Působením FFA dochází v závislosti na dávce u monocytů ke zvýšení ROS vedoucí k jejich adhezi k EC. U potkanů s projevy obezity i diabetu mellitu 2. typu byla prokázána nadměrná exprese NADPH, která byla vyvolána FFA zprostředkovávajícími oxidační stres. Příhody oxidačního stresu indukovaného FFA byly popsány také v EC zdravých lidí. [3]

FFA mohou také přispívat k **zánětlivým stavům**, které vedou ke zvýšené propustnosti endotelu. Aktivací NF-κB dochází ke zvýšené tvorbě ROS, dále ke snížení produkce NO a ke vzniku ED. [3]

Mezi mechanismy, kterými FFA vedou k ED, patří také **aktivace renin-angiotenzinového systému**. Aktivace RAS je důležitá pro regulaci krevního tlaku a rovnováhy tekutin. Také je spojena s poruchou diferenciací preadipocytů, zvýšením lipolýzy, zvýšeným oxidačním stresem a zánětlivou reakcí. [67]

EC na své membráně exprimují angiotenzin konvertující enzym, který je nezbytný pro syntézu AT-II způsobujícího stimulaci produkce ET-1 vazokonstrikci a nedostatek NO.

Naopak inhibicí ACE je signální dráha NO posílena. AT-II potlačením oxidační cesty FA vede ke vzniku FFA, které mohou být aktivátory RAS. [3]

Myši, kterým chybí ACE (ACE<sup>-/-</sup>), vykazují zvýšenou genovou expresi enzymů souvisejících s lipolýzou a oxidací mastných kyselin. Tím by mohla být vysvětlena souhra mezi RAS a tvorbou FFA. V závislosti na AT-II volné mastné kyseliny aktivují leukocyty a přispívají k jejich adhezním vlastnostem, což vede ke vzniku ED. Preventivní opatřením proti FFA-indukované ED u lidí je inhibice RAS. [3]

Posledním jmenovaným mechanismem je **účinek na endotelové progenitorové buňky**. FFA přispívají k apoptóze endotelových progenitorových buněk podílejících se na obnově endotelu po arteriálním poškození. Působením faktorů, jako je oxidační stres, dochází k jejich dysfunkci a apoptóze. Dysfunkční endotelové progenitorové buňky jsou považovány za klíčové regulátory v patogenezi aterosklerózy a dalších kardiovaskulárních onemocnění. [3]

## 5.4.2 Charakteristika použité diety

V tomto experimentu byla použita vysokotuková dieta TD.88137 zahrnující několik rizikových faktorů pro rozvoj hypercholesterolemie a aterosklerózy. Mezi tyto faktory patří:

- 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 % hmotnosti)

Procentuální zastoupení hlavních živin a jejich podíl na kalorickém příjmu znázorňuje Tabulka 2.

**Tabulka 2: Nutriční hodnoty diety TD.88137**

	% hmotnost	% kcal celkové hmotnosti
<b>Proteiny</b>	17,3	15,2
<b>Sacharidy</b>	48,5	42,7
<b>Tuky</b>	21,2	42,0
<b>kcal/g</b>	4,5	
<b>Cholesterol</b>	0,2 %	

Převzato z: TD.88137 Adjusted calories diet (42% from fat) [68]

Procentuální obsah jednotlivých typů mastných kyselin ve vztahu k celkové hmotnosti diety a celkové hmotnosti obsažených mastných kyselin znázorňuje Tabulka 3.

**Tabulka 3: Profil mastných kyselin diety TD.88137**

	% z diety	% celkové hmotnosti MK
<b>Celkem</b>	20,7	100,0
<b>SFA</b>	12,8	61,8
<b>MUFA</b>	5,6	27,3
<b>PUFA</b>	1,0	4,7
<b>Jiné</b>	1,3	6,2

Převzato z: TD.88137 Adjusted calories diet (42% from fat) [68]



## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Materiál

#### 6.1.1 Zvířata

V experimentu byli myši samci kmene C57BL/6J ve věku 7 měsíců (n=16) rozděleni do dvou skupin. První skupina, kontrolní, dostávala standardní laboratorní dietu (kontrola, n=8). Druhá skupina zvířat byla po dobu 3 měsíců krmena *ad libitum* vysokotukovou dietou TD.88137 s obsahem 42 % kcal tuku. Zvířata byla chována ve Viváriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za kontrolované teploty a vlhkosti, za dvanáctihodinového cyklu střídání světla a tmy. K usmrcení zvířat na konci experimentu došlo cervikální dislokací v hluboké narkóze. Zvířatům se odebrala krev z vena cava inferior pro další analýzu a následně hrudní část aorty pro western blot analýzu.

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

### 6.2 Pracovní postup

Aorta byl zhomogenizována v RIPA pufru s přidavkem inhibitorů fosfatáz a proteáz. Následně byly vzorky stočeny v chlazené centrifuze při 4°C (15 min, 10 000G). Supernatant byl poté odebrán pro analýzu. Koncentrace proteinu byla měřena pomocí BCA Assay kit (Thermo Fischer Scientific Inc., USA).

#### 6.2.1 Příprava gelu

Nejdříve se sestavila aparatura pro elektroforézu. Pro jeden gel bylo zapotřebí jedno kratší a jedno delší sklo se spacerem. Na delší sklo se položilo kratší a skla se zasunula do zeleného stojánku s dvířky, která se následně uzavřela otočením do boku. Zelené stojánky se skly se umístily do průhledného stojánku kratšími skly dopředu. Spodní část skel se těsně dotýkala podložky, aby nedocházelo k podtékání gelu.

Následovalo připravení separačního gelu smícháním destilované vody, separačního pufru, akrylamid/bis roztoku, 10 % dodecylsiranu sodného (SDS) a 10 % peroxodisíranu amonného (APS). Polymerizace gelu se zahájila přidáním N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (TEMED). Podle molekulové hmotnosti sledovaných markerů byla zvolena 10% koncentrace gelu.

Připravený separační gel se po kraji napipetoval mezi skla zhruba 1 cm pod hranu kratšího skla. K zabránění přístupu vzduchu se gel po celé délce převrstvil sekundárním butanolem saturovaným mili-Q H<sub>2</sub>O, který by měl být zcela bez bublin. Isobutanolovou

vrstvou se také vyrovnala hladina po celé délce gelu a vyhnaly se bubliny z povrchu. Po dokončení polymerizace trvajících 30 až 60 minut se isobutanol odlil a gel se opláchnul destilovanou vodou.

Na závěr se separační gel až po horní okraj kratšího skla opatrně převrstvil připraveným 5% zaostřovacím gelem tak, aby nevznikaly vzduchové bubliny. Nasadil se hřebínek a při okrajích se pipetou doplnil zaostřovací gel, který se průběžně dodával v průběhu celé polymerizace. Pro kontrolu ztuhnutí zůstala část gelu v kádince. Rozpis přípravy gelů je uveden v Tabulce 4.

**Tabulka 4: Rozpis složení separačního a zaostřovacího gelu pro elektroforézu (uvedené množství složek odpovídá přípravě dvou gelů)**

	Separací gel	Zaostřovací gel
	10% (ml)	5% (ml)
Milli-Q voda	9,8	6,15
Separating gel buffer, 4x	5	-
Stacking gel buffer, 4x	-	2,5
Acrylamide-Bis Solution	5	1,25
10 % (w/v) SDS	0,2	0,1
10 % APS	0,06	0,03
TEMED	0,03	0,015

### 6.2.2 Příprava vzorku

Vzorky se naředily s ultračistou vodou na zvolenou nanášku do mikrozkušavek. Následně se přidal 2x koncentrovaný vzorkový pufr SDS s  $\beta$ -ME v poměru 1:1 (vzorek:pufr). Vzorky se promísily pomocí vortexu, stočily na centrifuze a povařily v termobloku na 5 minut při 95°C.

### 6.2.3 Nanesení vzorků a elektroforéza

Po dokončení polymerizace gelů se opatrně vysunul nasazený hřebínek tak, aby nedošlo k poškození jamek. Skla s gely se vytáhla ze stojánek a umístila do Mini-PROTEAN Tetra Cell kratšími skly dovnitř k těsnění. Následně se tank naplnil vychlazeným elektroforetickým pufrem tak, aby jamky pro vzorky byly ponořeny. Do první jamky se napipetovalo 5  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (Precision Plus Protein Standard, Dual Color, Bio-Rad). Zbylé jamky se plnily jednotlivými vzorky. Podle

potřeby se po rysku pro 2 gely dolil pufr a tank se uzavřel víkem s elektrodami zapojenými do zdroje. Pro elektroforetickou separaci se nastavily podmínky konstantního napětí o 200 V a maximální hodnoty proudu 60 mA/gel. Aby nedošlo k přehřátí, byly stěny aparatury během elektroforézy obloženy chladícími destičkami. Po vyjetí čela, viditelného díky bromfenolové modři ve vzorkovém pufru, se zdroj odpojil od aparatury a pufr se z tanku vylil. Skla se opatrně oddělila od sebe, aby nedošlo k poškození gelu. Odříznul se zaostřovací gel i okraje. Před dalším použitím byl gel uchováván v transferovém pufru.

#### 6.2.4 Western blot

Pro přenos proteinů na membránu se použil Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membrána z polyvinyliden difluoridu (Immobilon®-E PVDF Membrane, Millipore, MA, USA) se nastříhla dle velikosti gelů, v rohu očíslovala obyčejnou tužkou, odstranila se ochranná vrstva a membrána se aktivovala ponořením do mili-Q H<sub>2</sub>O na několik sekund. S membránou se pracovalo pomocí pinzety a v rukavicích, aby se zabránilo možnému přenosu proteinů. Pro složení „sandwiche“ byly dále použity dva silné filtrační papíry zvlhčené v transferovém pufru. Na anodovou kazetu se položil filtrační papír, aktivovaná membrána, gel, a nakonec druhý filtrační papír. Seskládaná soustava se přejela válečkem, aby se vytlačily vzduchové bubliny. Přiložila se katodová kazeta a celý systém se zasunul do přístroje. Následně se nastavily podmínky přenosu uvedené v Tabulce 5.

**Tabulka 5: Parametry přenosu proteinů pomocí Trans-Blot Turbo Transfer System**

Proud	1 A
Napětí	25 V
Doba	30 min

Po uplynutí požadované doby se systém rozebral a gel se opatrně oddělil od membrány. Před dalším použitím se membrána uchovávala v mili-Q H<sub>2</sub>O, aby nedocházelo k jejímu vysychání.

#### 6.2.5 Imunodetekce

Nejdříve se připravil roztok TBS-T 100 ml 10x koncentrovaného Tris pufru, 900 ml milli-Q H<sub>2</sub>O a 1 ml Tweenu. Po promíchání pomocí magnetického míchadla se 100 ml

roztoku TBS-T smíchalo s 5 g sušeného nízkotučného mléka (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) pro získání 5% roztoku mléka.

Membrána se dle molekulové hmotnosti zkoumaných proteinů rozstříhala na proužky, které se pro rozpoznání označily čísly. Aby došlo k zablokování nespecifických vazebných míst na membráně a následnému specifickému navázání primární protilátky na sledovaný protein, se proužky ponořily do 5% roztoku mléka a po dobu 1 h se míchaly na kývačce. Po uplynutí požadované doby se proužky umístily označenou stranou vzhůru do připravených vaniček z parafilmu a napipetovaly se na ně příslušné primární protilátky naředěné na požadovanou koncentraci pomocí 5% roztoku mléka. V roztoku protilátek se proužky membrán nechaly přes noc při teplotě 4 °C.

Následující den byly proužky membrán osmkrát vymývány na kývačce v roztoku 0,1% TBS-T po dobu 5 minut. Po každém intervalu se vyměnil roztok 0,1% TBS-T za nový. Během vymývání se pro jednotlivé proužky připravily vaničky z parafilmu a naředily se sekundární protilátky 5% roztokem mléka. Po dokončení promývání se proužky přenesly do vaniček a na jejich povrch se napipetovaly sekundární protilátky. Použité primární a sekundární protilátky jsou uvedeny v Tabulce 6. Proužky se sekundární protilátkou se hodinu inkubovaly na kývačce. Následovalo promývání sekundárních protilátek osmkrát po dobu 10 minut roztokem 0,1% TBS-T, ve kterém musely membrány zůstat do dalšího kroku.

**Tabulka 6: Použité primární a sekundární protilátky pro imunodetekci a jejich ředění**

Primární protilátka		Sekundární protilátka	
	ředění		ředění
Rabbit anti-mouse eNOS (Santa Cruz Biotechnology)	1:200	Anti-Rabbit	1:2000
Rabbit anti-mouse ET-1 (Abcam)	1:300	Anti-Rabbit	1:1000
Rabbit anti-mouse VCAM-1 (Cell Signaling)	1:1000	Anti-Rabbit	1:2000
Goat anti-mouse ICAM-1 (R&D Systems)	1:500	Anti-Goat	1:5000
Rabbit anti-mouse ENG (Abcam)	1:1000	Anti-Rabbit	1:2000
Rabbit anti-mouse GAPDH (Cell Signaling)	1:8000	Anti-Rabbit	1:1000

### **6.2.6 Chemiluminiscenční analýza**

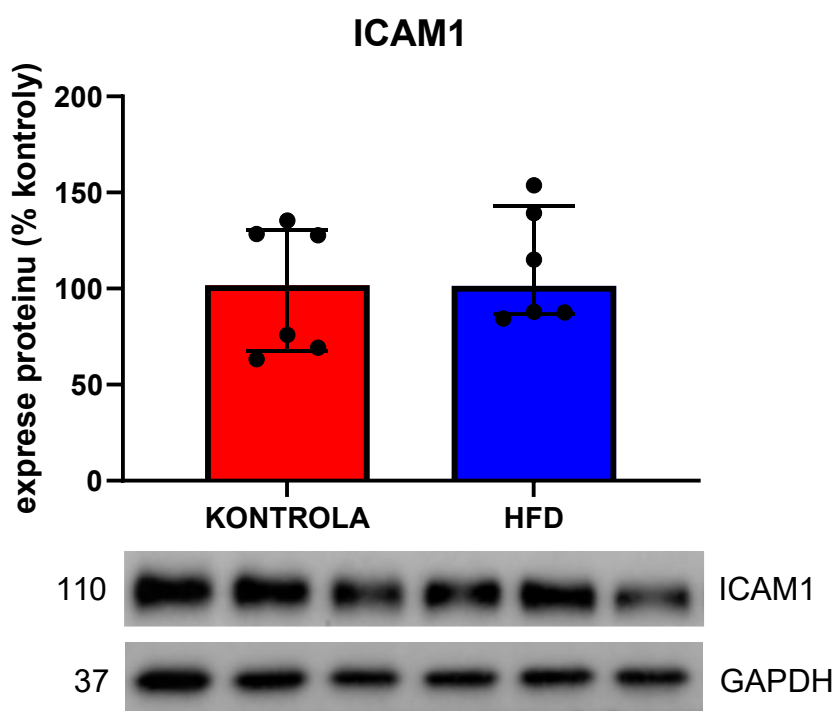
V posledním kroku se celá plocha proužku membrány pokryla chemiluminiscenčním činidlem tak, aby na povrchu nebyly žádné bubliny. Po uplynutí stanovené inkubační doby se proužek položil na kousek ubrousku a uzavřel v plastové folii. Následně se vložil do zařízení ChemiDoc pro detekci proteinů. Detekcí se zobrazily šedočerné pruhy různé tloušťky a intenzity barvy. K vizualizaci zachycených pásů byl použit zobrazovací systém ChemiDoc™ MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Pomocí softwaru Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, verze 6.0.1.) se provedla kvantifikace pruhů.

### **6.3 Vyhodnocení, statistické vyhodnocení**

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru GraphPadPrism verze 9.2. Data jsou vyjádřena jako medián s mezikvartilovým rozpětím (IQR). Expres byla normalizována pomocí GAPDH. Pro přímé srovnání skupin a pro zjištění výše statistické významnosti (p-hodnoty) byl použit Mann-Whitneyho test. Statisticky významné hodnoty jsou při  $p < 0,05$ .

## 7. VÝSLEDKY

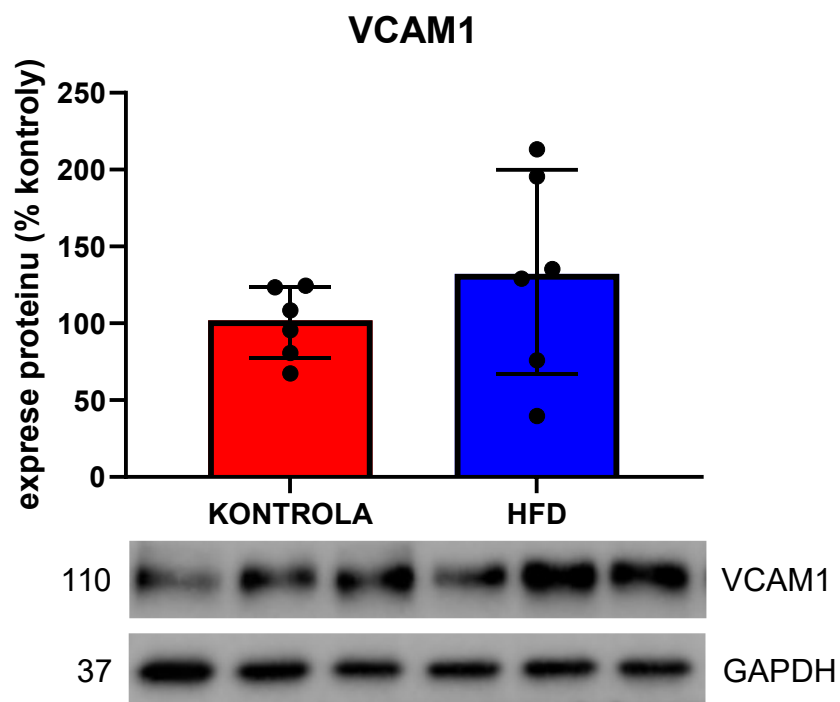
Pro zjištění vlivu vysokotukové diety na endotelové buňky hrudní aorty myší jsme hodnotili změny v expresi pěti charakteristických proteinů. Tyto změny jsou vyjádřeny v sloupcových grafech doplněných o reprezentativní obrázky výsledných bandů ze stejné membrány pro každý protein a sledovanou skupinu. Při porovnání exprese proteinů ICAM-1 (graf 1), VCAM-1 (graf 2), endoglinu (graf 3) a endotelinu-1 (graf 5) jsme nezjistili signifikantní rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou s podáváním vysokotukové diety. Při hodnocení exprese eNOS jsme však zaznamenali statisticky významný výrazný nárůst exprese po podávání HFD (graf 4).



### **Graf 1: Exprese ICAM-1**

*Grafické znázornění exprese ICAM-1 u myší krmených HFD v porovnání s kontrolní skupinou na standardní laboratorní dietě.*

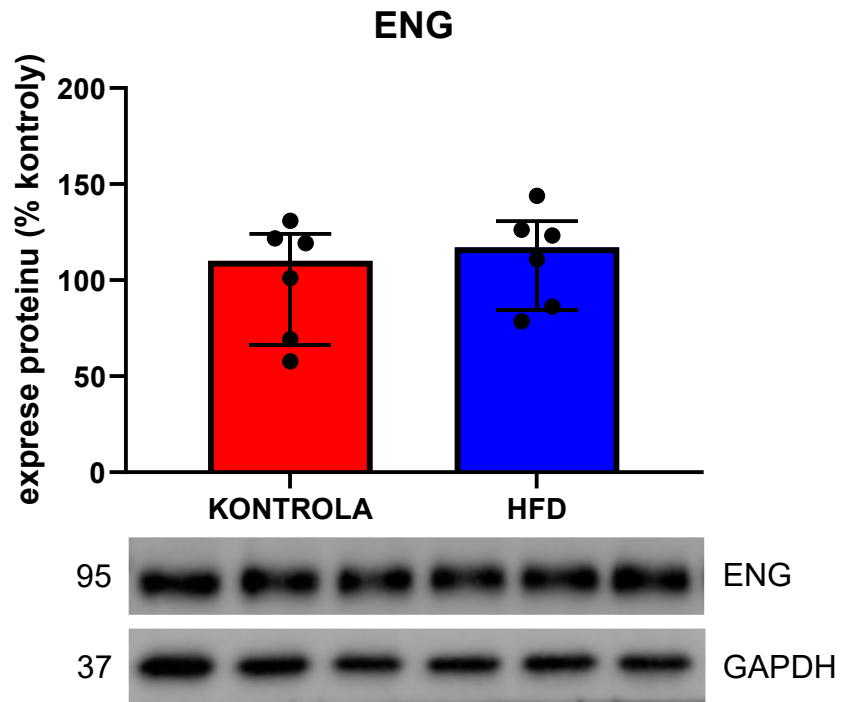
*Pod grafem je reprezentativní vzorek detekce ICAM-1 a GAPDH ve spodní části.*



**Graf 2: Expresa VCAM-1**

*Grafické znázornění exprese VCAM-1 u myší krmených HFD v porovnání s kontrolní skupinou na standardní laboratorní dietě.*

*Pod grafem je reprezentativní vzorek detekce VCAM-1 a GAPDH ve spodní části.*

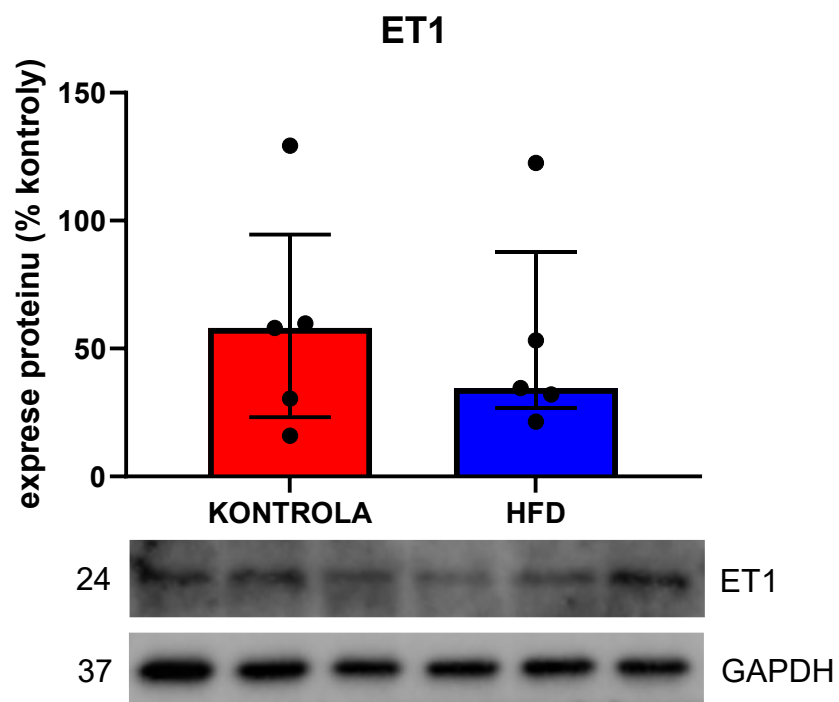


**Graf 3: Expresé ENG**

*Grafické znázornění exprese ENG u myši krmených HFD v porovnání s kontrolní skupinou na standardní laboratorní dietě.*

*Pod grafem je reprezentativní vzorek detekce ENG a GAPDH ve spodní části.*

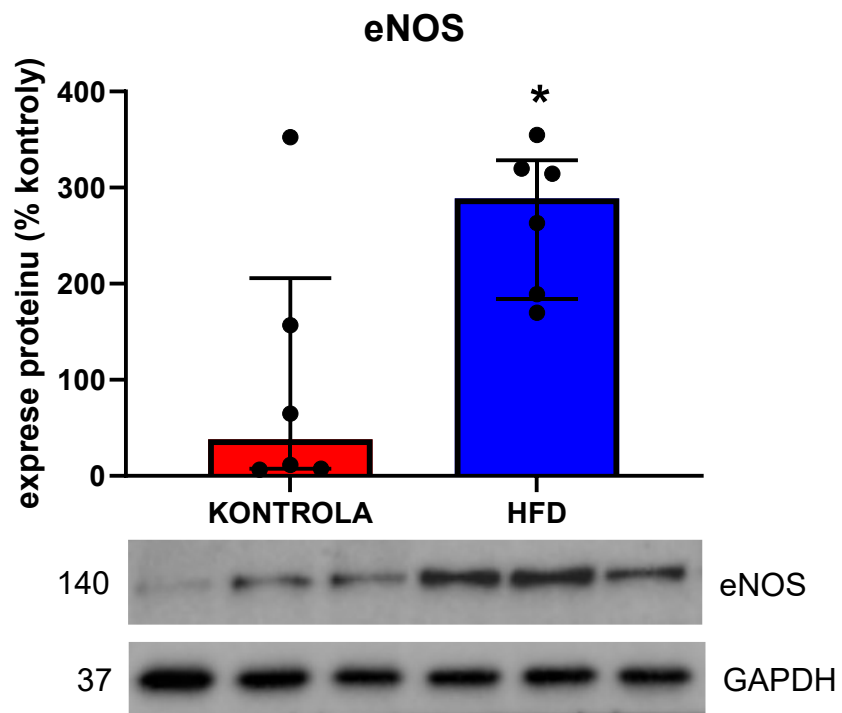




**Graf 4: Expresa ET-1**

Grafické znázornění exprese ET-1 u myší krmených HFD v porovnání s kontrolní skupinou na standardní laboratorní dietě.

Pod grafem je reprezentativní vzorek detekce ET-1 a GAPDH ve spodní části.



**Graf 5: Expresa eNOS**

Grafické znázornění exprese eNOS u myší krmených HFD v porovnání s kontrolní skupinou na standardní laboratorní dietě.

Pod grafem je reprezentativní vzorek detekce eNOS a GAPDH ve spodní části.

## 8. DISKUSE

Endotelová dysfunkce je spojována s mnoha kardiovaskulárními a metabolickými onemocněními včetně hypertenze, ischemické choroby srdeční, dyslipidémie a diabetu mellitu. Zásadní roli má také v progresi aterosklerotického procesu. Jedním z nejdůležitějších příčin porušení endotelové funkce je oxidační stres vyvolaný nadbytkem ROS vedoucí k snížení bioaktivního NO, což se projeví snížením vazodilatační odpovědi endotelu a zvýšenou expresí protrombotických a prozánětlivých faktorů. Dochází také k narušení bariérové funkce endotelu umožňující průnik lipidů, zánětlivých buněk a ostatních toxinů. Několika studiemi bylo prokázáno, že k ED může vést také podávání diety bohaté na tuk, fruktózu a sacharózu. [69–72]

Vysokotuková dieta je spojena se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. K ED přispívá několika mechanismy, mezi které patří kromě zprostředkování oxidačního stresu spojeného s narušením produkce NO, také aktivace renin-angiotenzinového systému, potlačení signální dráhy AMPK/PI3K/Akt/eNOS, přispívání k apoptóze endotelových progenitorových buněk nebo k zánětlivým stavům. [3, 73]

ICAM-1 a VCAM-1 jsou transmembránové proteiny podporující migraci leukocytů a jejich adhezi k povrchu endotelu. Poškozením funkce endotelových buněk zvýšeným oxidačním stresem dochází k aktivaci zánětlivých cytokinů (IL-1 a TNF- $\alpha$ ) a k následné zvýšené expresi těchto adhezních molekul. Ačkoliv jejich cirkulující formy odrážejí časnou fázi zánětu a aktivaci EC, nejedná se o specifické biomarkery přesně odrážející endotelové poškození, jelikož nejsou produkovány pouze endotelem. Naše výsledky ukazují, že podávání vysokotukové diety v námi zvoleném schématu nemá zásadní vliv na změnu v expresi ICAM-1 ani VCAM-1. [69, 74]

ET-1 je nejsilnější vazokonstrikční peptid uvolňovaný endotelem hrající klíčovou roli v regulaci cévního tonu. Také se podílí na aktivaci leukocytů a krevních destiček a vazbou na ET<sub>B</sub> na endotelových buňkách může uvolněním NO způsobit vazodilataci. Jeho zvýšená aktivita je spojována s rozvojem a progresí řady kardiovaskulárních chorob souvisejících s množstvím tukové tkáně. Jeho zvýšené množství bylo zaznamenáno po podávání vysokotukové diety v různých studiích, ale dle našich výsledků nedošlo k signifikantní změně v jeho expresi. [72, 75, 76]

Endoglin je membránový glykoprotein působící jako ko-receptor rodiny proteinů transformujícího růstového faktoru. Podílí se na regulaci cévní remodelace, cévního tonu, angiogeneze a ovlivňuje expresi i aktivitu eNOS. K zvýšení exprese endoglinu EC dochází například v zánětlivých tkáních, při cévních poranění nebo v místech aktivní

angiogeneze. Výsledky měření nepotvrdily významný rozdíl v expresi endoglinu po podání diety s vysokým obsahem tuku. [77]

eNOS má významnou roli v regulaci cévního tonu tvorbou NO zodpovědného za vazodilataci. Vlivem oxidačního stresu vyvolaného podáváním HFD dochází k snížení exprese eNOS a k narušení produkce a stability NO důležitého v cévní a metabolické homeostáze. U myší s deficitem eNOS byla pozorována nejenom nižší hladina NO, ale také hypertenze a inzulinová rezistence. [70, 78] Dle výsledků měření překvapivě došlo k významnému výraznému nárůstu exprese po podání HFD. Mohlo by se jednat o kompenzační reakci pro zachování schopnosti vazodilatace.

Naše výsledky ukazují, že použitá vysokotuková dieta s obsahem 42 % kcal tuku nemá signifikantní vliv na rozvoj endotelové dysfunkce a změnu v expresi markerů charakteristických pro endotelovou dysfunkci. Pouze v expresi eNOS došlo k výraznému zvýšení. Tento výsledek je však potřebné doplnit analýzou dalších molekul zapojených v produkci NO.

## 9. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo posouzení změny exprese pěti markerů endotelové dysfunkce (eNOS, ICAM-1, VCAM-1, ENG a ET-1) ve vzorcích hrudní části myší aorty. Byly porovnávány výsledky myší krměných vysokotukovou dietou s obsahem 42 % kcal tuku se vzorky myší na standardní laboratorní dietě. K hodnocení exprese byla použita Western blot analýza a detekce byla provedena použitím chemiluminiscenčního činidla. Výsledky této práce ukázaly, že podání HFD po dobu 12 týdnů u myšího kmene C57BL/6J ve věku 7 měsíců nemá signifikantní vliv na rozvoj endotelové dysfunkce z pohledu změn v expresi proteinů charakterizujících endotelovou dysfunkci. Pouze u eNOS došlo k výraznému zvýšení, nejspíše vlivem kompenzační reakce pro zachování vazodilatační schopnosti.

## 10. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky	Český význam
<b>ACE</b>	angiotensin converting enzyme	angiotenzin konvertující enzym
<b>Akt</b>	protein kinase B	protein kináza B
<b>AMPK</b>	5' adenosinemonophosphate activated protein kinase	5' adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkináza
<b>APS</b>	ammonium persulfate	peroxodisíran amonný
<b>AT-II</b>	angiotensin II	angiotenzin II
<b>BH<sub>4</sub></b>	tetrahydrobiopterin	tetrahydrobiopterin
<b>cAMP</b>	cyclic 3',5'-adenosine monophosphate	cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát
<b>cGMP</b>	cyclic 3',5'-guanosine monophosphate	cyklický 3',5'-guanosinmonofosfát
<b>COX</b>	cyclooxygenase	cyklooxygenáza
<b>CRP</b>	c-reactive protein	c-reaktivní protein
<b>EC</b>	endothelial cells	endotelové buňky
<b>ED</b>	endothelial dysfunction	endotelová dysfunkce
<b>EDHF</b>	endothelium-derived hyperpolarizing factor	hyperpolarizující faktor odvozený od endotelu
<b>ENG</b>	endoglin	endoglin
<b>eNOS</b>	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
<b>ET-1/2/3</b>	endothelin-1/2/3	endotelin-1/2/3
<b>ET<sub>A/B</sub></b>	endothelin receptor <sub>A/B</sub>	endotelinový receptor <sub>A/B</sub>
<b>FAD</b>	flavin adenine dinucleotide	flavinadenindinukleotid
<b>FFA</b>	free fatty acids	volné mastné kyseliny
<b>FMN</b>	flavin mononucleotide	flavinmononukleotid
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

<b>GC</b>	guanylate cyclase	guanylátcykláza
<b>HFD</b>	high fat diet	vysokotuková dieta
<b>ICAM-1</b>	intercellular adhesion molecule 1	intercelulární adhezní molekula 1
<b>IL-1</b>	interleukin-1	interleukin-1
<b>IL-6</b>	Interleukin-6	Interleukin-6
<b>iNOS</b>	inducible nitric oxide synthase	inducibl ní syntáza oxidu dusnatého
<b>LCFA</b>	long chain fatty acids	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
<b>LDL</b>	low density lipoprotein	lipoprotein o nízké hustotě
<b>MCFA</b>	medium chain fatty acids	mastné kyseliny se středním řetězcem
<b>MCP-1</b>	monocyte chemoattractant protein-1	monocytární chemotaktický protein- 1
<b>MUFA</b>	monounsaturated fatty acids	mononenasyčené mastné kyseliny
<b>NADPH</b>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<b>NF-κB</b>	nuclear factor kappa B	nukleární faktor kappa B
<b>NO</b>	nitric oxide	oxid dusnatý
<b>NOS</b>	nitric oxide synthase	syntáza oxidu dusnatého
<b>nNOS</b>	neuronal nitric oxide synthase	neuronální syntáza oxidu dusnatého
<b>PAF</b>	platelet activating factor	faktor aktivující destičky
<b>PAI-1</b>	plasminogen activator inhibitor-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
<b>PDGF</b>	platelet derived growth factor	destičkový růstový faktor
<b>PECAM-1</b>	platelet endothelial cell adhesion molecule	adhezní molekula krevních destiček
<b>PGH<sub>2</sub></b>	prostaglandin H <sub>2</sub>	prostaglandin H <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	prostacyclin	prostacyklin
<b>PI3K</b>	phosphatidylinositol-3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza

<b>PUFA</b>	polyunsaturated fatty acids	polynenasycené mastné kyseliny
<b>RAS</b>	renin-angiotensin system	renin-angiotenzinový systém
<b>ROS</b>	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
<b>SCFA</b>	short chain fatty acids	masné kyseliny s krátkým řetězcem
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate	dodecylsírán sodný
<b>Ser</b>	serine	serin
<b>SFA</b>	saturated fatty acids	nasycené mastné kyseliny
<b>sICAM-1</b>	soluble intercellular adhesion molecule-1	solubilní intercelulární adhezní molekula 1
<b>SMC</b>	smooth muscle cell	hladké svalové buňky
<b>sVCAM-1</b>	soluble vascular cell adhesion molecule	solubilní vaskulární adhezní molekula 1
<b>TBS-T</b>	tris buffered saline with tween 20	roztok tris pufru s tween 20
<b>TEMED</b>	tetramethyl-ethylenediamine	tetramethylethyldiamin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$
<b>Thr</b>	threonine	threonin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor alfa	tumor nekrotizující faktor alfa
<b>tPA</b>	tissue plasminogen activator	tkáňový aktivátor plazminogenu
<b>TXA<sub>2</sub></b>	thromboxane A <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
<b>Tyr</b>	tyrosine	tyrosin
<b>UFA</b>	unsaturated fatty acids	nenasycené mastné kyseliny
<b>VCAM-1</b>	vascular cell adhesion molecule 1	vaskulární adhezní molekula 1
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
<b>vWF</b>	von Willebrand factor	von Willebrandův faktor
<b>ZP</b>	the zona pellucida	zona pellucida



## 11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rizikové faktory endotelové dysfunkce a aterosklerózy.....	20
Tabulka 2: Nutriční hodnoty diety TD.88137.....	32
Tabulka 3: Profil mastných kyselin diety TD.88137 .....	32
Tabulka 4: Rozpis složení separačního a zaostřovacího gelu pro elektroforézu .....	34
Tabulka 5: Parametry přenosu proteinů pomocí Trans-Blot Turbo Transfer System ....	35
Tabulka 6: Použité primární a sekundární protilátky pro imunodetekci a jejich ředění	36

## 12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Aorta .....	11
Obrázek 2: Stavba cévní stěny .....	12
Obrázek 3: Funkce zdravého endotelu .....	13
Obrázek 4: Hlavní mechanismy přispívající k endotelové dysfunkci snížením.....	18
Obrázek 5: Vývojová stádia aterosklerotické léze .....	21
Obrázek 6: ICAM-1 a VCAM-1 v patologii kardiovaskulárních onemocnění. ....	24
Obrázek 7: Strukturální znázornění endoglinu .....	25
Obrázek 8: Molekulární struktura eNOS.....	27

## 13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Exprese ICAM-1.....	38
Graf 2: Exprese VCAM-1 .....	39
Graf 3: Exprese ENG.....	40
Graf 4: Exprese ET-1.....	41
Graf 5: Exprese eNOS.....	42

## 14. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Park, K-H., Park, W.J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *Journal of Korean Medical Science*, 2015, 30(9): 1213.
- [2] Karetová, D. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína*, 2002, 4(3): 119–122.
- [3] Ghosh, A., et al. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *Journal of Biomedical Science*, 2017, 24(1): 50.
- [4] Vajner, L., et al. *Lékařská histologie II. Mikroskopická anatomie*. 2. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2019. s. 6–11. ISBN 978-80-246-3827-0.
- [5] White H. J., Bordes S. J., Borger J. *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Aorta* . [online]. Poslední aktualizace 25.7.2023. [cit. 10.4.2024] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537319/>
- [6] Čihák, R. *Anatomie 3*. 2. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. s. 80. ISBN 80-247-1132-X.
- [7] Martínek, J., Vacek, Z. *Histologický atlas*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. s. 11–12. ISBN 978-80-247-2393-8
- [8] Hronek, M., et al. *Praktická cvičení z morfologie a fyziologie pro posluchače farmaceutické fakulty*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2013. s. 16. ISBN 978-80-246-2293-4.
- [9] *About the Aorta* [online]. Dostupné z: <https://www.vcuhealth.org/pauley-heart-center/programs-and-expertise/aortic-program/about-the-aorta> [10.4.2024]
- [10] Vrablík, M., et al. Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Medicína pro praxi*, 2011. 8(3): 119–122.
- [11] Karásek, D., et al. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*, 2004, 6(9): 450–453.
- [12] Alem, Manal M. Endothelial Dysfunction in Chronic Heart Failure: Assessment, Findings, Significance, and Potential Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(13): 3198.
- [13] Krüger-Genge, A., et al. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4411.
- [14] Félétou, M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells— Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. *Morgan & Claypool Life Sciences*, 2011.

- [15] Bkaily, G., Jacques D. Morphological and Functional Remodeling of Vascular Endothelium in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 1998.
- [16] Reitsma, S., et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Archiv*, 2007, 454(3): 345–359.
- [17] Marti, C. N., et al. Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, and Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012, 60(16): 1455–1469.
- [18] Claesson-Welsh, L. Vascular permeability--the essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 2015, 120(3): 135–143.
- [19] Hellenthal, K. E. M., Brabenec, L., Wafner, N-M. Regulation and Dysregulation of Endothelial Permeability during Systemic Inflammation. *Cells*, 2022, 11(12): 1935.
- [20] Michiels, C. Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 196(3): 430–443.
- [21] Biel, V., et al. Funkce endotelu, její vztah k arteriální hypertenzi a možnosti její modulace. *Vnitřní lékařství*, 2018, 64(7–8): 762–770.
- [22] Nečas, E. *Obecná patologická fyziologie*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2000, s. 105–133. ISBN 80-246-0051-X.
- [23] Flammer, A. J., Lüscher, T.F. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2010, 459(6): 1005–1013.
- [24] Rajendran, P., et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, 9(10): 1057–1069.
- [25] Alberts, B., et al. Blood Vessels and Endothelial Cells. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* [online] Garland Science, 2002 [cit. 13.4.2024]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26848/>
- [26] Shaito, A., et al. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2022, 27(3): 105.
- [27] Bockus, L., Kim, F. Coronary endothelial dysfunction: from pathogenesis to clinical implications. *Open Heart*, 2022, 9(2): e002200.
- [28] Endemann, D.H, Schiffrin, E.L. Endothelial Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004, 15(8): 1983–1992.
- [29] Janaszak-Jasiecka, A., et al. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2023, 28(1): 21.

- [30] Jia, G., et al. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865(7): 1802–1809.
- [31] Campbell, L.A., Rosenfeld, M.E. Infection and Atherosclerosis Development. *Archives of medical research*, 2015, 46(5): 339–350.
- [32] Beaufreere, H. Atherosclerosis: Comparative Pathogenesis, Lipoprotein Metabolism, and Avian and Exotic Companion Mammal Models. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 2013, 22(4): 320–335.
- [33] Češka, R., Prusíková, M., Šnejdrlová, M. Predikce a prevence aterosklerózy a personalizovaná léčba dyslipidemií. *Kardiologická revue*, 2011, 13 (2): 81-86.
- [34] Vrablík, M. Atherosclerosis: from etiology to its possible influencing. *Vnitř Lék*, 2015, 61(11): 925-931.
- [35] Giannitsi, S. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation. *JRSM Cardiovascular Disease*, 2019, 8: 2048004019843047.
- [36] Gallo, G., Volpe, M. Savoia, C. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in Medicine*, 2022, 8: 798958.
- [37] Islam, M.S.SLAM, *Hypertension: from basic research to clinical practice*. 2. vydání. Springer International Publishing, 2017. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-44250-1.
- [38] Poredoš, P. State-of-the-Art Review: Endothelial Dysfunction in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2001, 7(4): 276–280.
- [39] Sing, V. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clinica Chimica Acta*, 2023, 548: 117487.
- [40] Bui, T.M., Wiesolek, H.L., Sumagin, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of leukocyte biology*, 2020, 108(3): 787–799.
- [41] Troncoso, M.F. VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2021, 1867(9): 166170.
- [42] Rossi, E., Bernabeu C. Novel vascular roles of human endoglin in pathophysiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2023, 21(9): 2327–2338.
- [43] Meurer, S.K., Weiskirchen, R. Endoglin: An ‘Accessory’ Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23): 9247.

- [44] Rossi, E., Lopes-Novoa J.M, Bernabeu, C. Endoglin involvement in integrin-mediated cell adhesion as a putative pathogenic mechanism in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1). *Frontiers in Genetics*, 2015, 5: 457.
- [45] Kapur, N.K., Morine K.J., Letarte, M. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vascular Health and Risk Management*, 2013, 9: 195–206.
- [46] Lee., Y., et al. S-endoglin expression is induced in hyperoxia and contributes to altered pulmonary angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia development. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 3043.
- [47] Schoonderwoerd, M.J.A, Goumans, M.T.H, Hawinkels, L.J.A.C. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 289.
- [48] Jenkins, H. N., et al. Endothelin-1 in the Pathophysiology of Obesity and Insulin Resistance. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 2020, 21(12): e13086.
- [49] Thorin, E., Clozel, M. The Cardiovascular Physiology and Pharmacology of Endothelin-1. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 2010, 60: 1–26.
- [50] Thorin, E., Webb, D. J. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 2010, 459(6): 951–958.
- [51] Banecki, K. M. R. M., Dora, K. A. Endothelin-1 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11295.
- [52] Vignon-Zellweger, N., et al. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sciences*, 2012, 91(13–14): 490–500.
- [53] Stauffer, B.L, Westby, C,M, DeSouza, C.A. Endothelin-1, aging and hypertension. *Current opinion in cardiology*, 2008, 23(4): 350–355.
- [54] Oliveira-Paula, G.H., Lacchini R., Tanus-Santos J.E. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide*, 2017, 63: 39–51.
- [55] Shu, X., et al. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 2015, 72(23): 4561–4575.
- [56] Li, Q., Yon, J., Cai, H. Mechanisms and Consequences of eNOS Dysfunction in Hypertension. *Journal of hypertension*, 2015, 33(6): 1128–1136.
- [57] Tenopoulou, M., Doulias, P. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Research*, 2020, 9: F1000 Faculty Rev-1190.
- [58] Oliveira-Paula, G. H., Lacchini, R., Tanus-Santos, J. E. Endothelial nitric oxide synthase: from biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 3): 584–599.

- [59] Gielis, J. F., et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 50(7): 765–776.
- [60] Fleming, I., et al. Phosphorylation of Thr<sup>495</sup> Regulates Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *Circulation Research*, 2001, 88(11): E68-75.
- [61] Atochin, D. N., Huanh, P. L. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 2010, 460(6): 965–974.
- [62] Miyamoto, J. Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 450.
- [63] Briggs, M. A., Petersen, K. S., Krisetherton, P. M. Saturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Replacements for Saturated Fat to Reduce Cardiovascular Risk. *Healthcare*, 2017, 5(2): 29.
- [64] Perna, M., Hewlings, S. Saturated Fatty Acid Chain Length and Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrients*, 2022, 15(1): 30.
- [65] Wali, J. A., et al. Cardio-Metabolic Effects of High-Fat Diets and Their Underlying Mechanisms—A Narrative Review. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1505.
- [66] Kuroda, R., et al. Unsaturated Free Fatty Acids Inhibit Ca<sup>2+</sup> Mobilization and NO Release in Endothelial Cells. *Kobe J Med Sci*, 2001, 47(5): 211-9.
- [67] Sun, J., et al. Free Fatty Acids Activate Renin-Angiotensin System in 3T3-L1 Adipocytes through Nuclear Factor-kappa B Pathway. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 2016: 1587594.
- [68] *TD.88137 Adjusted calories diet (42 % from fat)*. Envigo [online]. Indianapolis, 2016. Dostupné z: <https://insights.envigo.com/hubfs/resources/data-sheets/88137.pdf> [15.4.2024]
- [69] Medina-Leyte, D. J., et al. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 3850.
- [70] Roberts, Ch. K., et al. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *Journal of Applied Physiology*, 2005, 98(1): 203–210.
- [71] *Endothelial dysfunction and its role in cardiovascular disease* [online]. Dostupné z: [https://www.medpagetoday.com/pdf/amc/CVD\\_MONO2.pdf](https://www.medpagetoday.com/pdf/amc/CVD_MONO2.pdf) [7.5.2024]
- [72] Grover-Páez, F., Zavalza-Gómez, A. B. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2009, 84(1): 1–10.

- [73] Dow, C. A., et al. Influence of habitual high dietary fat intake on endothelium-dependent vasodilation. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 2015, 40(7): 711–715.
- [74] Quyyumi, A. A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine*, 1998, 105(1): 32S-39S.
- [75] Weil, B. R., et al. Enhanced endothelin-1 system activity with overweight and obesity. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2011, 301(3): H689–H695.
- [76] Bourgoin, F., et al. Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2008, 295(3): H1044–H1055.
- [77] López-Novoa, J.M., Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(4): H959-74.
- [78] Razny, U., et al. Increased nitric oxide availability attenuates high fat diet metabolic alterations and gene expression associated with insulin resistance. *Cardiovascular Diabetology*, 2011, 10(1): 68.